

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 168**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2009** **E 09732817 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2281042**

54 Título: **Composición basada en microesferas para prevenir y/o revertir la diabetes autoinmune de nueva aparición**

30 Prioridad:

28.04.2008 US 48246 P

18.04.2008 US 46034 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.12.2015

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)

**One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US;**

**BAXTER HEALTHCARE SA (33.3%) y
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BROWN, LARRY, R.;
GIANNOUKAKIS, NICK y
TRUCCO, MASSIMO**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 554 168 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

Composición basada en microesferas para prevenir y/o revertir la diabetes autoinmune de nueva aparición

5 DECLARACIÓN DE INTERÉS GUBERNAMENTAL

Esta invención se ha realizado con ayuda gubernamental bajo el Número de Subvención R21 DK49835-01 concedida por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH). El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 10 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional US con nº de Serie 61/046,034, presentada el 18 de abril de 2008, y la Solicitud Provisional US con nº de Serie 61/048,246, presentada el 28 de abril de 2008.

ANTECEDENTES

- 15 En general, la presente descripción se refiere a un planteamiento antisentido para prevenir y/o revertir un estado de diabetes autoinmune en ratones NOD. Dicho planteamiento incluye el suministro de microesferas de oligonucleótidos AS vía inyección para lograr un efecto terapéutico que provoca una actividad moduladora negativa, en particular en un modelo de ratón diabético no-obeso (NOD). Las microesferas se producen utilizando condiciones totalmente acuosas e incorporan uno o más oligonucleótidos antisentido (AS).

- 20 Las micropartículas, microesferas y microcápsulas son partículas sólidas o semisólidas con un diámetro inferior a un milímetro, pudiendo dicho diámetro ser inferior a 100 micras, que se pueden formar con diversos materiales, incluyendo polímeros sintéticos, proteínas y polisacáridos. Las microesferas se han utilizado en muy diversas aplicaciones, principalmente en separación, diagnóstico y administración de fármacos.

- 25 Para producir estas partículas a partir de polímeros sintéticos, polímeros naturales, proteínas y polisacáridos se pueden utilizar diversas técnicas, 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 en 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 se describen en la Patente US nº 5.213.812 de Ruiz, Patente US nº 5.417.986 de Reid y col., Patente US nº 4.530.840 de Tice y col., 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 la Publicación de Solicitud de Patente Europea Número 248.531 del SouthernResearchInstitute; copolímeros en bloque tales como Tetronic® 908 y poloxámero 407 tal como se describen en la Patente US nº 4.904.479 de Illum; y polifosfacenos tal como se describen en la Patente US nº 5.149.543 de Cohen y col. Las microesferas producidas utilizando tales polímeros tienen una baja eficiencia de carga y, con frecuencia, sólo pueden incorporar un pequeño porcentaje del fármaco de interés en la estructura polimérica. Por consiguiente, habitualmente se deben administrar cantidades sustanciales de estos tipos de microesferas para lograr un efecto terapéutico. Además, estos polímeros son normalmente hidrófobos, lo que influye negativamente en la disolución del fármaco de interés. Los polímeros normalmente utilizados en este contexto incluyen ácido poliláctico-glicólico (PLGA).

- 40 Un objetivo de la comunidad médica es el suministro de ácidos nucleicos a las células de un animal para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo la diabetes. En muchas propuestas, los ácidos nucleicos se pueden suministrar a células cultivadas (*in vitro*) de forma relativamente eficaz con la adición de agentes de transfección. Además, *in vivo*, la presencia de nucleasas endógenas resulta en una alta tasa de degradación del ácido nucleico cuando éste se administra a animales.

- 45 Además de proteger el ácido nucleico frente a la digestión por nucleasas, un vehículo de suministro de ácido nucleico debetener una baja toxicidad, debe ser absorbido eficientemente por 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 puede producir efectos mutagénicos *in vivo*. La administración mediante la inclusión de ácido nucleico en complejos de lípidos de diferentes formulaciones (como liposomas o complejos de lípidos catiónicos) 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 aplicaciones

terapéuticas todavía no ha sido demostrada. Estos planteamientos anteriores pueden tener efectos contrarios al objetivo aquí buscado, incluyendo la estimulación del sistema inmunológico. Por ejemplo, cuando se incorpora PLGA en partículas, la presencia del PLGA estimula el sistema inmunológico.

- 5 Por consiguiente, existe la necesidad de abordar los problemas de la administración de ácidos nucleicos y la necesidad creciente 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 Woiszwill y col., y nº 5.578.709 de Woiszwill y la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2006/0024240 de Brown y col. se describen detalles relativos a la microesferas, en especial referentes a su preparación y propiedades.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

- 15 La invención está definida en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con la presente descripción, se administran oligonucleótidos en forma de microesferas. Se cree que este método de suministro impide el acceso de las nucleasas a los ácidos nucleicos dentro de la microesfera. El suministro en microesferas de oligonucleótidos antisentido (AS) se lleva a cabo para inducir tolerancia de células dendríticas, en particular en el modelo de ratón NOD. Las microesferas se producen utilizando condiciones acuosas de modo que se incorporan oligonucleótidos antisentido (AS). Estas microesferas se utilizan para inhibir la expresión genética y para prevenir y/o revertir un estado de diabetes autoinmune en ratones NOD *in vivo*.

- 20 En un aspecto de la descripción, se sintetizan tres oligonucleótidos AS dirigidos a los transcritos CD40, CD80 y CD86 y se prepara una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos, que se combina con una solución polimérica acuosa. Se forman microesferas que contienen los oligonucleótidos y éstas se administran a los ratones NOD por inyección.

- 25 En un aspecto de la descripción, se proporciona un método para revertir la diabetes de tipo 1 en un mamífero, que incluye la administración de una composición de microesferas, comprendiendo las microesferas de la composición oligonucleótidos antisentido con respecto a transcritos primarios seleccionados de entre el grupo consistente en los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de éstos, y que están dirigidos para unirse a los mismos. Los oligonucleótidos se pueden seleccionar entre el grupo consistente en las SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2 o SEQ ID Nº: 3 y combinaciones de los mismos, o de hecho cualquier otro oligonucleótido dirigido a CD40, CD80 y CD86.

- 30 En otro aspecto, se proporciona un método para tratar o revertir la diabetes de tipo 1 en un mamífero, que incluye la administración de una composición que contiene microesferas en una cantidad eficaz para tratar o revertir la diabetes de tipo 1, comprendiendo dichas microesferas oligonucleótidos antisentido con respecto a transcritos primarios seleccionados de entre el grupo consistente en los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de éstos, y que están dirigidos para unirse a los mismos, y comprendiendo dichos oligonucleótidos individualmente una secuencia de polinucleótidos seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6 y SEQ ID Nº: 7 y formas modificadas de las SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6 y SEQ ID Nº: 7, que están dirigidas y se unen a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86.

- 40 Otro aspecto de la descripción se refiere a un método para proteger las células beta del páncreas de un mamífero frente a la destrucción autoinmune, que consiste en inyectar al mamífero una composición de microesferas, comprendiendo las microesferas de la composición oligonucleótidos antisentido con respecto a transcritos primarios seleccionados entre el grupo consistente en los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de éstos, y que están dirigidos para unirse con los mismos.

- 45 Otro aspecto de la descripción consiste en un procedimiento para proteger células beta pancreáticas de un mamífero frente a la destrucción autoinmune, que incluye la administración a dicho mamífero de una composición que contiene microesferas en una cantidad eficaz para proteger las células beta pancreáticas, comprendiendo dichas microesferas oligonucleótidos antisentido con respecto a transcritos primarios seleccionados de entre el grupo consistente en los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de éstos, y que están dirigidos para unirse a los mismos, y comprendiendo dichos oligonucleótidos individualmente una secuencia de polinucleótidos seleccionada de entre el grupo consistente en SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6 y SEQ ID Nº: 7 y formas modificadas de SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6 y SEQ ID Nº: 7, que están dirigidas y se unen a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86.

- 50 Otro aspecto es un método para reducir la inflamación del páncreas por células T y/o la muerte de células beta pancreáticas en un mamífero, que incluye la administración al mamífero de una composición de microesferas, comprendiendo las microesferas de la composición oligonucleótidos antisentido con respecto a transcritos primarios seleccionados de entre el grupo consistente en los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de éstos, y que están dirigidos para unirse con los mismos, y administrándose la

composición en una cantidad eficaz para mejorar los síntomas de la diabetes de tipo 1 en el mamífero. En aspectos más definidos, la composición se administra después de la aparición clínica de la diabetes de tipo 1. En aspectos alternativos, la composición se administra antes de la aparición clínica de la diabetes de tipo 1. En estos aspectos terapéuticos, la administración de la composición normaliza los niveles de glucosa en sangre del mamífero en comparación con los niveles de glucosa en sangre del mamífero antes de la administración.

Otro aspecto más es un método para reducir la inflamación pancreática por células T o la muerte de células beta pancreáticas en un mamífero, que incluye la administración a dicho mamífero de una composición que contiene microesferas en una cantidad eficaz para reducir la inflamación pancreática por células T o la muerte de células beta pancreáticas, comprendiendo dichas microesferas de dicha composición oligonucleótidos antisentido con respecto a transcritos primarios seleccionados de entre el grupo consistente en los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de éstos, y que están dirigidos para unirse a los mismos, y comprendiendo dichos oligonucleótidos individualmente una secuencia de polinucleótidos seleccionada de entre el grupo consistente en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7 y formas modificadas de SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7, que están dirigidas y se unen a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para preservar una masa de células beta residuales en un mamífero con diabetes autoinmune preclínica de nueva aparición, que incluye la administración a dicho mamífero de una composición que contiene microesferas en una cantidad eficaz para preservar una masa de células beta residuales, manteniendo la administración de la composición la masa de células beta del mamífero en al menos aproximadamente un 15% de la masa presente antes de la aparición de la diabetes, comprendiendo dichas microesferas de dicha composición oligonucleótidos antisentido con respecto a transcritos primarios seleccionados de entre el grupo consistente en los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de éstos, y que están dirigidos para unirse a los mismos, y comprendiendo dichos oligonucleótidos individualmente una secuencia de polinucleótidos seleccionada de entre el grupo consistente en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7 y formas modificadas de SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7, que están dirigidas y se unen a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86.

La administración de la composición puede regenerar la población de células beta del mamífero o detener el deterioro de la población de células beta, o ambas cosas.

La composición se puede administrar en cualquier forma adecuada y en determinados aspectos ilustrativos se administra en forma inyectable. En aspectos específicos, la composición se administra en combinación con insulina. Cuando se aplica una terapia combinada, la insulina puede administrarse antes, durante o después de la administración de la composición de microesferas.

En diversas realizaciones, las microesferas de una composición incluyen oligonucleótidos antisentido que comprenden individualmente las secuencias de polinucleótidos de SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7. En otras realizaciones, las microesferas de una composición incluyen oligonucleótidos antisentido que consisten individualmente en las secuencias de polinucleótidos de SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7. En otras realizaciones, las microesferas de una composición incluyen oligonucleótidos antisentido que presentan una homología con la secuencia de polinucleótidos de al menos un 95% o más con respecto a SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7, y que están dirigidos y se unen a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86.

Otros aspectos adicionales se refieren a métodos para preservar una masa de células beta residuales en un sujeto con diabetes autoinmune preclínica de nueva aparición, que incluyen la administración al sujeto de una composición que contiene microesferas que comprenden oligonucleótidos antisentido con respecto a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y que están dirigidos para unirse a los mismos, manteniendo la administración de la composición la masa de células beta del mamífero en al menos aproximadamente un 15% de la masa presente antes de la aparición de la diabetes. El sujeto puede ser un sujeto humano. El sujeto puede ser un niño. El método de tratamiento puede implicar una administración reiterada de la composición, aumentando la administración reiterada la masa de células beta del mamífero.

En métodos definidos particulares, desde un 30% hasta un 70% p/p de las microesferas oligonucleótido. Normalmente, estas composiciones pueden incluir una relación en la composición de las microesferas CD40 antisentido:CD80 antisentido:CD86 antisentido igual a 1:1:1.

En otras realizaciones se proporciona una composición farmacéutica que comprende microesferas, incluyendo dichas microesferas oligonucleótidos antisentido que presentan individualmente las secuencias de polinucleótidos dadas en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7, secuencias de polinucleótidos que tienen una homología de la secuencia de polinucleótidos de al menos un 90% con respecto a SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7 y que están dirigidos y se unen a los

transcritos primarios CD40, CD80 y CD86, o formas modificadas de las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7 y que están dirigidas y se unen a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86. En algunos aspectos de estas realizaciones, las microesferas incluyen oligonucleótidos antisentido que tienen una homología de la secuencia de polinucleótidos de al menos un 95% o más con respecto a SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7, y que están dirigidos y se unen a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

- | | | |
|----|---------------|---|
| 15 | Fig. 1a y 1b: | micrografías electrónicas de barrido de microesferas de oligonucleótidos AS y polimerización de poli-L-lisina. |
| 15 | Fig. 2a y 2b: | gráficos que muestran las propiedades de una preparación de microesferas de acuerdo con la divulgación. La Fig. 2a es un gráfico que muestra la distribución granulométrica de una preparación de microesferas. La Fig. 2b muestra un gráfico de la carga superficial de una preparación de microesferas. |
| 20 | Fig. 3: | cromatograma RP-HPLC de los oligonucleótidos después de la desformulación de las microesferas. |
| 20 | Fig. 4: | gráfico que muestra la prevención de la diabetes en ratones NOD tratados múltiples veces con microesferas de oligonucleótido antisentido (AS-MSP) de la invención en comparación con animales tratados con microesferas de oligonucleótidos aleatorios o con solo el vehículo PBS. |
| 25 | Fig. 5: | gráfico que muestra la prevención de la diabetes en ratones NOD tratados una vez con AS-MSP de la invención en comparación con animales tratados con microesferas de oligonucleótidos aleatorios o con solo el vehículo PBS. |
| 30 | Fig. 6a-6d: | micrografías ópticas de secciones de tejido pancreático de ratones NOD de control teñidas con hematoxilina y eosina (Fig. 6a y c; H+E) o para insulina (Fig. 6b y 6d). |
| 30 | Fig. 7a-7d: | micrografías ópticas de secciones de tejido pancreático de ratones NOD tratados con AS-MSP, teñidas con hematoxilina y eosina (Fig. 7a y c; H+E) o para insulina (Fig. 7b y 7d). |
| 35 | Fig. 8: | análisis FACS de células T obtenidas de ratones tratados con el AS-MSP de la divulgación o de ratones control. |
| 35 | Fig. 9: | gráficos de la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) que demuestran la proliferación de células T de animales tratados con AS-MSP cultivadas con esplenocitos de acuerdo con la divulgación. |
| 40 | Fig. 10: | gráficos RFI que demuestran la proliferación de células T de ratones NOD tratados con AS-MSP y libres de diabetes en presencia de esplenocitos irradiados singénicos y ovoalbúmina <i>in vitro</i> . |
| 40 | Fig. 11: | gráficos RFI que demuestran la supresión de la proliferación de células T de ratones NOD tratados con AS-MSP y libres de diabetes en presencia de lisado de islote singénico <i>in vitro</i> . |
| 45 | Fig. 12: | gráfico de niveles de glucosa en sangre de ratones con diabetes de nueva aparición tratados con microesferas que contienen bien oligonucleótidos antisentido, bien oligonucleótidos aleatorios. |
| 45 | Fig. 13A: | muestra una línea temporal para los experimentos con ratones con diabetes de nueva aparición, las Fig. 13B y 13C son gráficos de niveles medios de glucosa en sangre de ratones con diabetes de nueva aparición tratados bien con AS-MSP, bien con controles. |
| 50 | Fig. 14A-C: | muestran la reversión del fenotipo de la diabetes de tipo 1 en ratones NOD. Estas figuras demuestran que con la administración de AS-MSP los niveles de glucosa en sangre de los mamíferos vuelven a valores normales en un plazo de 15 días (los niveles normales se muestran con la línea mixta aproximadamente a 200 mg/ml) y se mantienen normales incluso después de interrumpir la administración de AS-MSP (día 30). |
| 55 | Fig. 15: | modelo que representa la reversión terapéutica de la diabetes autoinmune. |
| 55 | Fig. 16: | representa la absorción de oligodesoxinucleótidos (ODN) por células dendríticas (DC) humanas. La Fig. 16A muestra la absorción de oligonucleótido AS CD86 marcado con FITC por hDC; la Fig. 16B muestra la absorción/procesamiento de ovoalbúmina DQ por hDC tratados con AS-ODN; y la Fig. 16C muestra el fenotipo por FACS de realizaciones de DC después de tratamiento con LPS. |
| 60 | Fig. 17: | representa la proliferación de células T de un voluntario humano sano al que se le había administrado recientemente una vacuna de recuerdo del tétanos cocultivada |

- 5 Fig. 18: muestra la proliferación de células T de voluntarios humanos sanos cocultivadas con DC autólogas derivadas de sangre periférica tratadas con AS-ODN en presencia o ausencia de ovoalbúmina intacta como antígeno nominal. Las barras de error indican el error estándar de la media de la respuesta de tres cocultivos independientes de células del mismo individuo.
- 10 Fig. 19: representa la proliferación de células T de voluntarios humanos sanos cocultivadas con DC alogénicas derivadas de sangre periférica tratadas con AS-ODN o DC alogénicas no tratadas. Las barras de error indican el error estándar de la media de la respuesta de tres voluntarios independientes, siendo el donante de DC el mismo.
- 15 Fig. 20: representa la expresión de proteínas después de la incubación de células dendríticas derivadas de monocitos humanos con ASO-MS.
- Fig. 21: muestra la disminución porcentual de la expresión de proteínas después del cultivo con ASO-MS humanas.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRADAS

- 20 Tal como se requiere, aquí se dan a conocer realizaciones detalladas de la presente invención; no obstante, se ha de entender que las realizaciones dadas son simplemente ejemplos de la invención, que se puede realizar de diversos modos. Por consiguiente, los detalles específicos dados aquí no deben interpretarse como limitativos, sino simplemente como base para las reivindicaciones y como base representativa para enseñar a los expertos en la técnica a emplear de diversos modos la presente divulgación prácticamente de cualquier modo apropiado.
- 25 La diabetes de tipo I es una enfermedad autoinmune donde se produce una inflamación progresiva del páncreas, y específicamente de las células beta endocrinas productoras de insulina. Antes de la aparición, la inflamación vuelve las células beta endocrinas disfuncionales. Una sola inyección de una formulación de microesferas retrasa considerablemente la aparición de la enfermedad en el modelo de ratón diabético no-obeso (NOD) de la diabetes autoinmune humana (de tipo 1). Aunque sin vincularse a ninguna teoría particular, se cree que las microesferas son absorbidas por células dendríticas residentes y migratorias en el sitio de inyección y después se mueven a los nodos linfáticos proximales antes de la aparición de la enfermedad. También se cree que en los receptores tratados se produce una disminución de la proliferación de células T dirigidas a antígenos de células beta putativas *in vitro*. Se puede producir un aumento en la prevalencia de células reguladoras T putativas CD4+ CD25+ en ratones NOD-scidinmunodeficientes reconstituidos con células T singénicas y células dendríticas y después tratados con las microesferas. Por tanto, una composición terapéutica basada en microesferas puede modular la actividad de células dendríticas y movilizar redes reguladoras para la profilaxis.
- 30 Sería deseable disponer de un tratamiento que previniera la aparición de la diabetes. También sería deseable disponer de una composición terapéutica que detuviera o revertiera la enfermedad después de la aparición clínica, una vez destruida una cantidad sustancial de células beta. La administración reiterada en ratones con diabetes de nueva aparición normaliza la hiperglucemia y revierte la enfermedad. Una reversión indica normalmente que el individuo, como un humano u otro mamífero, presenta casi una normalización de los niveles de glucosa en sangre. Sin establecer ninguna vinculación con una teoría particular, se cree que durante la "reversión" se resiste la inflamación de células T y la muerte celular inducidas por la enfermedad.
- 35 Una realización revierte la diabetes autoinmune insulino dependiente mediante la formulación e inyección de las microesferas de oligonucleótidos antisentido (AS) aquí descritas, dirigidas a los transcritos CD40, CD80 y CD86. Los Ejemplos dados en este documento incluyen ejemplos específicos de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra los transcritos. Se ha de entender que también se pueden diseñar otros oligonucleótidos antisentido eficaces en la unión con los transcritos CD40, CD80 y CD86 para lograr los efectos aquí descritos.
- 40 También se ha de entender que estos oligonucleótidos pueden incorporar modificaciones conocidas en la técnica, incluyendo, de forma no exclusiva, tiliación, metilación y metoxietilación, y que la localización y la cantidad de estas modificaciones pueden variarse para lograr un efecto óptimo. Estos oligonucleótidos están diseñados para inducir una tolerancia inmunológica que conduce a la reversión de la destrucción de las células beta productoras de insulina en el modelo de ratón NOD.
- 45 También están previstas formas modificadas de oligonucleótidos que incluyen aquellas con al menos un enlace internucleótido modificado. Las "formas modificadas" de oligonucleótidos incluyen, sin limitación, enlaces internucleósido modificados y/o bases modificadas.
- 50 En una realización, el oligonucleótido es total o parcialmente un ácido nucleico peptídico. Otros enlaces internucleósido modificados incluyen aquellos que comprenden una o más bases universales. El concepto
- 55 En una realización, el oligonucleótido es total o parcialmente un ácido nucleico peptídico. Otros enlaces internucleósido modificados incluyen aquellos que comprenden una o más bases universales. El concepto

"base universal" se refiere a moléculas capaces de sustitución para una unión con una cualquiera de A, C, G, T y U en ácidos nucleicos mediante la formación de enlaces de hidrógeno sin desestabilización estructural significativa.

- 5 Ejemplos específicos de oligonucleótidos incluyen aquellos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleósido no naturales. Oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen ningún átomo de fósforo en el esqueleto. Los oligonucleótidos modificados que no tienen ningún átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido se consideran dentro del significado de "oligonucleótido".

- 10 Esqueletos de oligonucleótido modificados que contienen un átomo de fósforo incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatosquirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros fosfonatos de alquilo, incluyendo 3'-alquilen fosfonatos de, 5'-alquilenfosfonatos y fosfonatosquirales, fosfinatos, fosforamidatos, incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos con enlaces 3'-5' normales, análogos de éstos con enlaces 2'-5', y aquellos de polaridad invertida, donde uno o
- 15 más enlaces internucleótido es un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. También están previstos oligonucleótidos que tienen polaridad invertida y que comprenden un enlace 3' a 3' en el enlace internucleótido más 3', es decir, un residuo nucleósido invertido simple que puede ser abásico (el nucleótido falta o hay un grupo hidroxilo en su lugar). También están previstas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Patentes de Estados Unidos representativas que describen la preparación de los enlaces que contienen fósforo arriba
- 20 indicados incluyen las Patentes US nº 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050.

- 25 Los esqueletos de oligonucleótido modificados que no incluyen ningún átomo de fósforo tienen esqueletos que están formados por enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósido de heteroátomo mixto y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósido heteroaromáticos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen aquellos con enlaces morfolino; esqueletos siloxano; esqueletos sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos formacetilo y tioformacetilo; esqueletos metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno;
- 30 esqueletos sulfamato; esqueletos metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos sulfonato y sulfonamida; esqueletos amida; y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂. Véanse, por ejemplo, las Patentes US nº 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437;
- 35 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439.

- En otras realizaciones se utilizan miméticos de oligonucleótido donde uno o más enlaces de azúcar y/o uno o más enlaces internucleótido de las unidades de nucleótido se han reemplazado por grupos "no naturales". Las bases del oligonucleótido se mantienen para hibridación con el polinucleótido diana. En un aspecto, esta
- 40 realización cuenta con un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se ha reemplazado por un esqueleto que contiene amina. Véanse por ejemplo las Patentes US nº 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262, y Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500.

- En otras realizaciones están previstos oligonucleótidos con esqueletos fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos conheteroátomos, e incluyendo -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-, descritos en las Patentes US nº 5.489.677 y 5.602.240.
- 45 También están previstos oligonucleótidos con estructuras de esqueleto morfolino, tal como se describen en la Patente US nº 5.034.506.

- En diversas formas, el enlace entre dos monómeros sucesivos en el oligo consiste en 2 a 4, preferentemente 3, grupos/átomos seleccionados de entre -CH₂-, -O-, -S-, -NR^H-, >C=O, >C=NR^H-, >C=S-, -Si(R^H)₂-, -SO-, -S(O)₂-, -P(O)₂-, -PO(BH₃)-, -P(O,S)-, -P(S)₂-, -PO(R^H)-, -PO(OCH₃)- y -PO(NHR^H)-, seleccionándose RH entre hidrógeno y alquilo(C₁₋₄) y R^H entre alquilo(C₁₋₆) y fenilo. Ejemplos ilustrativos de estos enlaces son: -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CO-CH₂-, -CH₂-CHOH-CH₂-, -O-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH= (incluyendo R⁵ cuando se utiliza como un enlace con un monómero sucesivo), -CH₂-CH₂-O-, -NR^H-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NR^H-, -CH₂-NR^H-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -NR^H-CS-NR^H-, -NR^H-C(=NR^H)-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-NR^H-O-CO-O-, -O-CO-CH₂-O-, -O-CH₂-CO-O-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CH=N-O-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-O-N= (incluyendo R⁵ cuando se utiliza como un enlace con un monómero sucesivo), -CH₂-O-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-O-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-NR^H-CH₂-, -O-NR^H-, -O-CH₂-S-, -S-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-S-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH= (incluyendo R⁵ cuando se utiliza como un enlace con un monómero sucesivo), -S-CH₂-CH₂-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-S-CH₂-, -CH₂-SO-CH₂-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -O-SO-O-, -O-S(O)₂-O-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-NR^H-, -NR^H-S(O)₂-CH₂-, -O-S(O)₂-CH₂-, -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-,
- 60

-S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -O-P(S)₂-S-, -S-P(O)₂-S-, -S-P(O,S)-S-, -S-P(S)₂-S-, -O-PO(R'')-O-, -O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(O-CH₂CH₃)-O-, -O-PO(O-CH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR'^N)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -CH₂-P(O)₂-O-, -O-P(O)₂-CH₂-, y -O-Si(R'')₂-O-; entre los cuales se tienen en cuenta -CH₂-CO-NR^H-, -CH₂-NR^H-O-, -S-CH₂-O-, -O-P(O)₂-O-P(-O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -NR^H-P(O)₂-O-, -O-P(O,NR^H)-O-, -O-PO(R'')-O-, -O-PO(CH₃-O-, y -O-PO(NHR'^N)-O-, seleccionándose RH entre hidrógeno y alquilo(C₁₋₄) y R'' entre alquilo(C₁₋₆) y fenilo. En Mesmaeker y col., Current Opinion in Structural Biology 1995, 5, 343-355, y Susan M. Freier y Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 1997, vol 25, pp 4429-4443 se dan otros ejemplos ilustrativos.

En la solicitud de patente US nº 20040219565 se describen detalladamente otras formas de oligonucleótidos modificados.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener una o más fracciones de azúcar sustituidas. En algunos aspectos, los oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N- alquino; u O-alquil-O-alquilo, pudiendo ser el alquilo, alqueno y alquinoalquilos C₁ a C₁₀ o alquenos y alquinos C₂ a C₁₀, sustituidos o no sustituidos. Otras realizaciones incluyen O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, teniendo n y m un valor entre 1 y aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de segmentación de ARN, un grupo reporter, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido y otras sustancias de propiedades similares. En un aspecto, una modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otras modificaciones incluyen 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en ejemplos más abajo, y 2'- dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilamino-etoxietil o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂, también descrito en ejemplos más abajo.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluor (2'-F). La modificación 2' puede ser en la posición arábica (arriba) o en la posición ribosa (abajo). En un aspecto, una modificación 2'-arábica es 2'-F. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, por ejemplo en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3'-terminal o en oligonucleótidos enlazados en 2'-5' y la posición 5' del oligonucleótido 5'-terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar como fracciones butilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Véanse, por ejemplo, las Patentes US nº 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; y 5.700.920.

En un aspecto, una modificación del azúcar incluye ácidos nucleicos bloqueados (*Locked Nucleic Acid* - LNA) donde el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar, formando así una fracción de azúcar bicíclica. El enlace es, en algunos aspectos, un grupo metileno (-CH₂)_n que conecta el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', siendo n igual a 1 o 2. En los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226 se describen LNA y la preparación de los mismos.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de base. Tal como se utiliza aquí, el concepto de bases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases modificadas incluyen otras bases sintéticas y naturales, como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros alquilderivados de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y -citosina, 5-propiniluracilo y -citosina y otros derivados alquínico de bases pirimidínicas, 6-azouracilo, -citosina y -timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras bases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas como fenoxazin-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), G-clamp como fenoxazin-citidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol-citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol-citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases modificadas también pueden incluir aquellas donde la base purínica o pirimidínica está reemplazada por otros heterociclos, por ejemplo 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras bases incluyen las descritas en la Patente US nº 3.687.808, las dadas a conocer en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por Englisch y col., Angewandte Chemie,

- International Edition, 1991, 30, 613, y las descritas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas bases son útiles para aumentar la afinidad de unión e incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 5-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha comprobado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C y en determinados aspectos están combinadas con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo. Véanse la Patente US nº 3.687.808. las Patentes U.S. nº 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.750.692 y 5.681.941.
- Una "base modificada" u otro término similar se refiere a una composición que se puede emparejar con una base natural (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo y/o timina) y/o que se puede emparejar con una base no natural. En determinados aspectos, la base modificada proporciona un diferencial T_m de 15, 12, 10, 8, 6, 4, o 2°C o menos. En los documentos EP 1 072 679 y WO 97/12896 se describen ejemplos de bases modificadas.
- El término "nucleobase" se refiere a las nucleobases naturales adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) y a las nucleobases no naturales, como xantina, diaminopurina, 8-oxo-N⁶-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N⁴,N⁴-etanocitosina, N',N'-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina (mC), 5-alquil(C³-C⁶)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las "nucleobases no naturales" descritas en Benner y col., Patente US nº 5.432.272 y Susan M. Freier y Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 1997, vol. 25, pp. 4429-4443. Por tanto, el término "nucleobase" no sólo incluye los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Otras nucleobases naturales y no naturales incluyen las descritas en la Patente US nº 3.687.808 (Merigan y col.), en el Capítulo 15 de Sanghvi, en Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke y B. Lebleu, CRC Press, 1993, en Englisch y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613-722 (véanse especialmente las páginas 622 y 623), en Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, páginas 858-859, y en Cook, Anti-Cancer Drug Design 1991, 6, 585-607. También está previsto que el concepto "base nucleosídica" o "unidad de base" incluya compuestos tales como compuestos heterocíclicos que pueden servir como nucleobases, incluyendo determinadas "bases universales" que no son bases nucleosídicas en el sentido más clásico, pero sirven como bases nucleosídicas. Como bases universales se mencionan en especial 3-nitropirrol, indoles opcionalmente sustituidos (por ejemplo 5-nitroindol) e hipoxantina opcionalmente sustituida. Otras bases universales deseables incluyen derivados de pirrol, diazol o triazol, incluyendo las bases universales conocidas en la técnica.
- En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención están modificados en una posición de base. En otros aspectos, los oligonucleótidos están modificados en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más posiciones de base. La invención tiene en cuenta cualquier modificación siempre que el oligonucleótido resultante mantenga la capacidad de unirse a su transcrito diana.

Otras secuencias adicionales contempladas por la presente invención incluyen, de forma no exclusiva, las mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre de secuencia	Secuencia antisentido	SEQ ID
CD80 279-301:5'UTR humano	5' AC AAT CCA ATT GCT CAC GTA GAA 3'	8
CD80 274-292:5'UTR humano	5' T TGC TCA CGT AGA AGA CCC 3'	9
CD80 950-968 humano	5' T TGG GAA ACT GGT GTG TTG 3'	10
CD80 1130-1152 humano	5' AG ATT AAG GTA ATG GCC CAG GAT 3'	11
CD80 1007-1025 ratón	5' T ATT ACT GCG CCG AAT CCT 3'	12
1 CD80 645-665 rata/humano	5' CG GTT CTT GTA CTC GGG CCA 3'	13
2 CD80 649-667 rata/humano	5' G TCC GGT TCT TGT ACT CGG 3'	14
CD40 517-535 humano	5' T TGG AGA AGA AGC CGA CTG 3'	15
CD40 792-810 humano	5' C TGC ACT GAG ATG CGA CTC 3'	16
CD40 873-891 rata/humano	5' A GAT GCG ACT CTC TTT GCC 3'	17
CD86 264-286 humano	5' CA AAA TAC TAC TAG CTC ACT CAG 3'	18
CD86 277-295 humano	5' T GGT CCT GCC AAA ATA CTA 3'	19
CD86 686-704 humano	5' C AGT TCT GTG ACA TTA TCT 3'	20

La diabetes de tipo 1 se manifiesta mediante la destrucción autoinmune de las células beta productoras de insulina pancreática, en los ratones NOD y también en humanos. En el momento de la aparición clínica, los humanos tienen típicamente un 10-20% o menos de masa de células beta residuales. La disponibilidad de

algo de esta más residual puede conducir a mantener niveles de insulina adecuados para regular los niveles de glucosa. Además, la reversión de la destrucción de células beta puede conducir a la regeneración parcial de la población de células beta. Las micropartículas que contienen oligonucleótidos de la presente divulgación están previstas para interferir en la destrucción autoinmune de las células beta.

- 5 Se ha de entender que las células dendríticas (DC) se pueden activar para que sean células presentadoras de antígenos potentes halladas en todos los tejidos y que están presentes bajo la piel. Estas células dendríticas presentadoras de antígenos actúan como disparadores de la respuesta inmunitaria, incluyendo respuestas autoinmunes, a través de la activación de células T, en particular en nodos linfáticos. Aunque no se desea una vinculación con ninguna teoría particular, se cree que CD40, CD80 y CD86 son importantes para la respuesta autoinmune, y se considera que la disminución de estas moléculas promueve la hiporresponsividad autoinmune. Además, determinadas citoquinas, como interferones e interleuquinas, se reducen a consecuencia de la hiporresponsividad.

- 15 Para producir las microesferas utilizadas para el tratamiento de la diabetes autoinmune en ratones, uno, dos o tres oligonucleótidos AS se pueden disolver en solución acuosa y combinar con uno o más polímeros solubles en agua y un polication. Normalmente, la solución se incuba a aproximadamente 60-70°C, se enfría a aproximadamente 23°C y el polímero en exceso se retira.

- 20 Los ácidos nucleicos comprenden típicamente entre aproximadamente el 30 y aproximadamente el 100 por ciento en peso de las microesferas y tiene un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 50 micras, normalmente no superior a aproximadamente 20 micras, y puede no ser superior a aproximadamente 10 micras. Normalmente se preparan como se indica a continuación. Se prepara una solución acuosa del o de los oligonucleótidos. Cuando se deben preparar microesferas que contienen tres oligonucleótidos, se combinan partes alícuotas de tres soluciones de oligonucleótidos. Cada solución contiene uno de estos tres tipos de oligonucleótido. En general, la solución final que contiene los oligonucleótidos contiene aproximadamente 10 mg/ml de oligonucleótido.

- 25 En ejemplos específicos, la formulación de microesferas contiene una carga de oligonucleótidos de un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% p/p o más. En estas realizaciones, las composiciones tienen un contenido de poli-L-lisina del 6-10% p/p. Además, el contenido de humedad de las microesferas varía y puede ser de aproximadamente el 4%. En un aspecto, los oligonucleótidos están presentes en una relación 1:1:1 CD40 antisentido:CD80 antisentido:CD86 antisentido. Otras formulaciones adicionales previstas por la invención comprenderán autoantígenosputativos. Éstos pueden incluir, de forma no exclusiva, insulina humana intacta, ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y proteína 2 asociada con insulinoma (IA-2).

- 30 Éstos se combinan con partes alícuotas de una solución madre de polication. Ejemplos de policationes son polilisina y poliornitina. Otros incluyen polietilenoimina (PEI), prolamina, protamina, polivinilpirrolidona (PVP), poliarginina, vinilamina, y derivados de polisacáridos con carga positiva, como quitosano de carga positiva, y combinaciones de los mismos. La solución de polication puede estar en relaciones volumétricas polication:oligonucleótido entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 4:1. Los policationes normalmente utilizados incluyen poli-L-lisina-HBr (hasta 70.000 dalton, disponible de Bachem) y poli-L-ornitina-HBr (por ejemplo 11.900 dalton, disponible de Sigma).

- 40 También se preparan soluciones poliméricas. Éstas pueden funcionar como agentes potenciadores de la separación de fases. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen polímeros lineales o ramificados, copolímeros y copolímeros en bloque. Estos polímeros pueden ser solubles en agua, semisolubles en agua, miscibles con agua, o solubles en un disolvente miscible con agua. Ejemplos de polímeros incluyen aditivos farmacéuticamente aceptables tales como polietilenglicol (PEG) de diversos pesos moleculares, como PEG 200, PEG 300, PEG 3350, PEG 8000, PEG 10000, PEG 20000, etc., y poloxámeros de diversos pesos moleculares tales como Poloxámero 188 y Pluronic FI27 o Pluronic F68. Un polímero comúnmente utilizado es polivinilpirrolidona (PVP). Otro polímero es hidroxietilalmidón. También se pueden utilizar otros polímeros anfífilos solos o en combinación. El agente potenciador de la separación de fases también puede ser un no-polímero, como una mezcla de propilenglicol y etanol.

- 50 En una realización típica se puede preparar una solución polimérica de polivinilpirrolidona y/o polietilenglicol y combinar con las otras soluciones. Un calentamiento, enfriamiento, centrifugación y lavado múltiples veces proporciona una suspensión acuosa que normalmente se congela y liofiliza para formar un polvo seco de microesferas que comprenden oligonucleótidos y policationes.

- 55 Las microesferas son adecuadas para la administración *in vivo* a través de una vía inyectable, incluyendo las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, epidural, intra-arterial, intra-articular y similares. Otras vías de administración aplicables incluyen las vías tópica, oral, rectal, nasal, pulmonar, vaginal, bucal, sublingual, transdérmica, transmucosa, óptica o intraocular. Para los fines de esta divulgación, resulta ventajosa la vía de administración por jeringuilla. Por tanto, en un aspecto, las micropartículas o microesferas se pueden aspirar en una jeringuilla e inyectar a través de agujas finas. Una vía de

administración adecuada es una inyección con una aguja de orificio fino, incluyendo inyección subcutánea, ocular y similares. El concepto "aguja de orificio fino" se refiere a agujas con un tamaño al menos Gauge 20, normalmente entre aproximadamente Gauge 22 y aproximadamente Gauge 30 o más. En un aspecto, la aguja de orificio fino tiene una finura al menos Gauge 24, una finura al menos Gauge 26 y al menos Gauge 28.

En un aspecto, las micropartículas o microesferas pueden ser inyectadas en una concentración de al menos, pero no de forma exclusiva, 10 µg de oligonucleótido por ml de la composición inyectada. Por ejemplo, entre aproximadamente 150 y aproximadamente 500 mg de oligonucleótido se pueden inyectar en un volumen de suministro no mayor de aproximadamente 1 ml, y por regla general inferior a aproximadamente 2 ml en muchas aplicaciones. La dosificación se puede dividir en dos o tres o más dosis a lo largo del día, o se puede administrar en una única dosis diaria.

En diversos aspectos, las micropartículas o microesferas pueden ser inyectadas en una concentración de al menos, pero no de forma exclusiva, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1.000 mg por ml de la composición inyectada. En otros aspectos, las micropartículas o microesferas pueden ser inyectadas en una concentración de al menos aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg por ml o más de la composición inyectada. En aspectos relacionados, las micropartículas o microesferas pueden ser inyectadas en una concentración de al menos aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1.000 mg por ml de la composición inyectada.

La administración por inyección se realiza durante un período de tiempo de inyección normal. Típicamente, estos períodos de tiempo, sin limitación, no son superiores a aproximadamente 20 segundos o menos.

Sin establecer ninguna vinculación con una teoría particular, se cree que las microesferas que contienen los oligonucleótidos antisentido aquí ilustradas sub-regulan las moléculas de superficie celular CD40, CD80 y CD86. Las microesferas se inyectan y se cree que las células dendríticas absorben activamente las microesferas de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos suprimen la expresión de las moléculas de superficie celular CD40, CD80 y CD86 en células dendríticas. La administración de estas microesferas de oligonucleótidos antisentido después del desarrollo en el ratón NOD revierte eficazmente la diabetes.

Los siguientes ejemplos ilustran determinadas características y ventajas de la invención para ilustrar adicionalmente la misma. Los ejemplos no deben considerarse como limitadores o restrictivos de otro modo en relación con la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se sintetizaron tres oligonucleótidos AS dirigidos a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86. Las secuencias de oligonucleótidos AS utilizadas en este ejemplo son las siguientes, indicando los asteriscos los sitios de tioación en el esqueleto:

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'

Se preparó una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos combinando partes alícuotas de tres soluciones de oligonucleótidos, conteniendo cada una un tipo de oligonucleótido, para formar una solución de 10 mg/ml de los tres tipos de oligonucleótidos. Se preparó una solución de 10 mg/ml de poli-L-lisina·HBr en agua desionizada (poli-L-lisina·HBr hasta 70.000 dalton, deBachem, King of Prussia, PA). La poli-L-lisina·HBr se añadió a la solución de oligonucleótidos en una relación volumétrica 1:1. La mezcla se sometió a vórtex suave. Una solución polimérica al 25% que contenía un 12,5% de PVP (polivinilpirrolidona, 40.000 dalton, SpectrumChemicals, Gardena, CA) y un 12,5% PEG (polietilenglicol, 3.350 dalton, SpectrumChemicals, Gardena, CA) en acetato de sodio M (Spectrum, Gardena, CA) a pH 5,5 se añadió en una relación volumétrica 2:1 de la siguiente manera: 0,75 ml de oligonucleótidos AS, 0,75 ml de poli-L-lisina·HBr, 3,0 ml de PEG/PVP, volumen total de 4,50 ml.

El lote se incubó durante 30 minutos a 70°C y después se enfrió a 23°C. Al enfriar, la solución se volvió turbia y se formaron microesferas. Después, la suspensión se centrifugó y el exceso de PEG/PVP se retiró. La pella resultante se lavó resuspendiéndola en agua desionizada, seguido de centrifugación y retirada del sobrenadante. El proceso de lavado se repitió tres veces. La suspensión acuosa se congeló y se liofilizó para formar un polvo seco de microesferas que contenía oligonucleótidos y poli-L-lisina.

Las Fig. 1a y b presentan micrografías electrónicas de barrido (SEM) representativas de microesferas con una relación 1:1 poli-L-lisina:oligonucleótido en dos ampliaciones diferentes. Se produjeron microesferas con un tamaño de 0,5-4 µm, con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 2,5 µm. La Fig. 2a muestra la distribución de tamaños de una preparación de microesferas producida de acuerdo con la invención, revelada mediante difusión de láser luminoso. La Fig. 2b muestra la determinación de la carga superficial de una preparación de microesferas (potencial Zeta) mediante difusión de luz. La Fig. 3 muestra un método HPLC en fase inversa (RP) utilizado para cuantificar la carga y evaluar la integridad de los componentes de oligonucleótido antisentido de las microesferas después de desformulación. Las microesferas se formularon utilizando oligonucleótidos CD86, CD40, CD80 y poli-L-lisina (PLL; MW 30-70 kD). Después, las microesferas se desformularon utilizando desplazamiento competitivo de los oligonucleótidos de ADN de la PLL con ácido poli-L-aspártico (PAA). El PAA se seleccionó como reactivo de ácido poliamínico que no absorbe a 260 nm y no interfiere con la cuantificación de oligonucleótidos a 260 nm. En perfiles de RP-HPLC como la Fig. 3, el área por debajo de cada pico es proporcional a la cantidad de cada oligonucleótido cargado en la microesfera. Como muestra la Fig. 3, las alturas de pico indican una carga aproximadamente igual de cada oligonucleótido en microesferas. La carga calculada de oligonucleótidos en microesferas oscilaba entre aproximadamente el 65% y aproximadamente el 80% en peso. La Fig. 3 también muestra que la integridad de los oligonucleótidos no resultó afectada por el proceso de formulación de las microesferas, tal como indica la distribución estrecha de los picos después de desformulación.

Ejemplo 2

En este ejemplo se muestran los resultados de ensayos que cubren aspectos de prevención de la invención. Como muestra la Fig. 4, una única administración de AS-MSP en ratones NOD de 5-8 semanas de edad retrasa la aparición de la diabetes. A dos grupos de ratones NOD hembra (5-8 semanas de edad) se les administró una única inyección subcutánea de oligonucleótidos antisentido formulados en las microesferas de la invención (AS-MSP). La formulación se inyectó en una cantidad que se consideraba que contenía 50 µg de una mezcla 1:1:1 de cada oligonucleótido antisentido (anti-CD40, anti-CD80 y anti-CD86). A otros grupos de ratones se les inyectaron microesferas de secuencia aleatoria (SCR-MSP) o vehículo PBS (NOD de control). La glucosa en sangre se midió semanalmente mediante punción en la vena caudal. La diabetes se confirmaba después de dos lecturas consecutivas de > 280-300 mg/dl. La Fig. 4 muestra la supervivencia acumulada de dos cohortes tratadas independientemente.

La Fig. 5 muestra que la administración múltiple de AS-MSP a ratones NOD de 5-8 semanas de edad previene la aparición de la diabetes. A unos ratones NOD hembra (5-8 semanas de edad) se les administraron ocho inyecciones subcutáneas individuales consecutivas (una vez por semana) de oligonucleótido antisentido formulado en microesferas de acuerdo con la invención. Las inyecciones (50 µg de una mezcla 1:1:1 de cada oligonucleótido antisentido u oligonucleótido aleatorio) se administraron una vez por semana durante ocho semanas y se interrumpieron en la semana 13. A otros grupos de ratones se les inyectaron microesferas de secuencia aleatoria (SCR-MSP) o vehículo PBS (NOD de control). La Fig. 5 muestra la supervivencia acumulada de los animales tratados.

Las Fig. 6a y 6b muestran secciones de tejido pancreático de ratones que no habían recibido tratamiento y por tanto progresaron espontáneamente a la autoinmunidad (ratones NOD diabéticos), teñidas con hematoxilina y eosina (H+E; Fig. 6a) o teñidas para insulina (Fig. 6b). Las Fig. 6c y 6d muestran secciones de tejido pancreático de ratones tratados con formulaciones de SCR-MSP (las inyecciones comenzaron en paralelo con los grupos tratados con AS-MSP específicas). Estas secciones también se tiñeron con hematoxilina y eosina (H+E; Fig. 6c) o teñidas para insulina (Fig. 6d). Todos los ratones tratados con SCR-MSP desarrollaron diabetes.

Las Fig. 7a y 7b muestran secciones de tejido pancreático de ratones tratados cuando tenían menos de 8 semanas de edad (modelo de prevención) y tratados con las microesferas antisentido de la invención teñidas con hematoxilina y eosina (H+E; Fig. 7a) o teñidas para insulina (Fig. 7b).

- 5 Como muestra la Fig. 8, las células T de ratones NOD tratados con AS-MSP presentan una mayor prevalencia de células T_{reg} putativas Foxp3⁺ CD25⁺. La Fig. 8A muestra la regulación utilizada para análisis FACS. La Fig. 8B muestra los porcentajes de células T Foxp3⁺ CD25⁺ enriquecidas a partir del bazo y la Fig. 8C los porcentajes de los nodos linfáticos reunidos para ratones sin diabetes tratados con AS-MSP seleccionados de forma aleatoria de la cohorte libre de diabetes AS-MSP o de animales tratados con microesferas de secuencia aleatoria (SCR-MSP) o con vehículo PBS.
- 10 La Fig. 9 muestra que las células T de ratones NOD sin diabetes tratados con AS-MSP proliferan cuando se cultivan conjuntamente con esplenocitosalogénicos. Las células T de ratones NOD sin diabetes tratados con AS-MSP se obtuvieron mediante columnas de enriquecimiento y se cocultivaron con esplenocitos sometidos a irradiación γ de ratones Balb/c, C57BL6 o NOD sin diabetes singénicos (10 semanas de edad). La proliferación se midió cuatro días después utilizando el reactivo Cyquant. La indicación Spl se refiere a esplenocitos irradiados alogénicos.
- 15

Como muestra la Fig. 10, las células T de ratones NOD sin diabetes tratados con AS-MSP proliferan en presencia de esplenocitos irradiados singénicos y ovoalbúmina *in vitro*. Las células T se enriquecieron a partir del bazo o los nodos linfáticos reunidos de ratones sin diabetes tratados con AS-MSP seleccionados de forma aleatoria a partir de la cohorte libre de diabetes AS-MSP.

- 20 La Fig. 11 muestra que las células T de ratones NOD sin diabetes tratados con AS-MSP presentan una supresión de la proliferación en presencia de lisado de islote singénico *in vitro*. Las células T se enriquecieron a partir del bazo o los nodos linfáticos reunidos de ratones sin diabetes tratados con AS-MSP seleccionados de forma aleatoria a partir de la cohorte libre de diabetes AS-MSP tal como se describe en la Fig. 4. Esplenocitos de NOD irradiados (de ratones NOD de 10 semanas de edad sin diabetes) se utilizaron como células presentadoras de antígenos y cultivos paralelos se pulsaron con lisado NIT-1 (1 μ g/pocillo) (o vehículo PBS).
- 25

- Una de las principales preocupaciones para la eventual traducción de terapias supresoras de la diabetes en ensayos con humanos es la especificidad de antígeno (y por tanto la especificidad celular) del método de tratamiento y si el tratamiento confiere una supresión global y no específica. Para abordar estas cuestiones, ratones no diabéticos seleccionados aleatoriamente fueron sacrificados de las cohortes mostradas en la Fig. 4 para determinar la proliferación de células T esplénicas y de nodos linfáticos a aloantígeno, antígeno nominal (en forma de ovoalbúmina intacta) y a antígeno derivado de células beta singénicas en forma de lisado celular de la línea celular de insulinoma NIT-1 derivada de NOD. Aunque la insulina y la ácido glutámico-descarboxilasa (GAD) son antígenos candidatos viables con implicación mecanística y teleológica, la naturaleza del antígeno iniciador sigue estando poco clara. No obstante, es razonable considerar que debería ser residente en células beta. Por tanto, la línea celular NIT-1, que se deriva de un insulinoma NOD, se utilizó como fuente de antígeno de células beta en cocultivos de células T de ratones NOD sin diabetes tratados con las AS-MSP para determinar la posibilidad de una hiporresponsividad específica de antígeno. A partir de estos estudios se ha visto que la proliferación de células T a nominal y aloantígeno se mantiene, mientras que en cocultivos con lisado celular NIT-1 se produce una hipoproliferación de células T.
- 30
- 35
- 40

- Además, al determinar el perfil de citoquina en los sobrenadantes de cocultivo se observó una disminución significativa de la producción de TNF α por células T de ratones NOD sin diabetes tratados con AS-MSP incluso en presencia de lisado NIT-1. Aunque la producción de IFN γ había disminuido ligeramente en los cocultivos de células T de los ratones tratados con AS-MSP, no era estadísticamente distinguible de los cocultivos con células T de ratones tratados con PBS en presencia de lisado NIT-1. Por último, en el ensayo no se pudo detectar la presencia de IL-4, IL-10 o TGF β en los sobrenadantes.
- 45

Ejemplo 3

- También se ensayó la capacidad de las microesferas de oligonucleótidos antisentido para revertir los síntomas de la diabetes en ratones NOD de aparición temprana. La Fig. 13A muestra una línea de tiempo para estos experimentos. Los ratones NOD de aparición temprana se seleccionaron analizando los niveles de glucosa en sangre e identificando los animales que tenían un nivel de glucosa en sangre superior a 400 mg/dl. A los animales seleccionados se les administraron pellas de insulina para normalizar los niveles de glucosa en sangre a menos de 300 mg/dl. Después se retiró la insulina y se inició una serie de inyecciones parenterales de microesferas. A seis animales se les inyectaron dos veces por semana microesferas que contenían los oligonucleótidos antisentido CD40, CD80 y CD86. A otros diez animales se les inyectaron microesferas que contenían una mezcla de oligonucleótidos con secuencias aleatorias que no están dirigidas contra CD40, CD80 y/o CD86. Cada inyección para los dos grupos de animales contenía 50 μ g de oligonucleótidos en microesferas en 100 microlitros de solución de inyección. Dos de los animales del grupo
- 50
- 55

aleatorio fueron sacrificados antes del final del experimento debido a su mal estado físico. Después de comenzar el protocolo de inyección, dos veces por semana se tomaron muestras de los niveles de glucosa en sangre. Los animales no estuvieron en ayunas durante el experimento. Los resultados se muestran en los gráficos de la Fig. 12, donde el indicador (1) significa administración de pella de insulina y el indicador (2) significa retirada de la pella de insulina e iniciación de inyecciones de MSP dos veces por semana. Se ha de señalar que el valor máximo de glucosa en sangre indicado en la Fig. 12 es de 700 mg/dl, que corresponde a la lectura máxima del aparato medidor utilizado, entendiéndose que un punto de dato de 700 mg/dl indica una lectura de glucosa en sangre de 700 mg/dl o superior. Todos los animales del grupo que recibió las microesferas que contenían la mezcla de oligonucleótidos antisentido CD40, CD80, CD86 (ASMSP1 a ASMSP6) mostraron niveles de glucosa considerablemente más bajos que los animales que recibieron las microesferas con oligonucleótidos aleatorios (SCRMSPP1 a SCRMSPP10). Además, cuatro de seis animales del grupo de ASMSP mostraron un nivel de glucosa en sangre por debajo de 400 mg/dl, considerado normalmente como un indicador umbral de la aparición de la diabetes.

La Fig. 13A muestra la línea de tiempo para los experimentos. También se muestran gráficos de los niveles medios de glucosa en sangre sin ayunar (Fig. 13B) y los niveles medios de glucosa en sangre ayunando (Fig. 13C) de cada grupo ($\pm$ SEM, error típico de la media). A algunos ratones se les retiró la administración de ASMSP, tal como muestra la Fig. 13A. Tal como muestran las Fig. 13B y 13C, múltiples rondas de administración de AS-MSP en ratones hembra NOD con diabetes de nueva aparición mejora los niveles de glucosa en sangre y conduce a una euglucemia en ayuno estable incluso después de la retirada de las AS-MSP en relación con los animales no tratados (control), los animales tratados con PBS o los animales tratados con microesferas de oligonucleótidos aleatorios (SCR-MSP).

Las Fig. 7c y 7d muestran secciones de tejido pancreático de ratones NOD que fueron tratados con formulaciones antisentido después de la aparición de la diabetes y que mostraron una reversión de la enfermedad. Las secciones están teñidas con hematoxilina y eosina (H+E; Fig. 7c) o teñidas para insulina (Fig. 7d).

Tres oligonucleótidos AS diferentes se pueden incorporar en microesferas de acuerdo con los métodos aquí descritos y estas microesferas pueden utilizarse como una composición para prevenir y/o revertir la diabetes autoinmune de nueva aparición a través de la inducción de células dendríticas inmunorreguladoras. De hecho, una sola inyección de la composición retrasó la aparición de la enfermedad y la administración reiterada a ratones con diabetes de nueva aparición normalizó la hiperglucemia, lo que sugiere la reversión de la enfermedad. En estos estudios se administró diariamente insulina hasta que el nivel de glucosa en sangre cayó por debajo de 300 mg/dl. Después se interrumpió la administración de insulina y luego se administraron AS-MSP vía subcutánea. En un ejemplo de régimen de dosificación, a los animales se les administraron 2 mg de AS-MP por kg de peso corporal dos veces por semana durante 3-4 semanas. Se controlaron los ratones NOD sin diabetes.

En las Fig. 14A-C se demuestra que la administración de AS-MSP a ratones NOD devuelve los niveles de glucosa en sangre de dichos ratones a niveles normales y la normalización de dichos niveles de glucosa se mantiene durante un período de tiempo prolongado. Como muestran las Fig. 14B y 14C, las AS-MSP fueron administradas entre los días 0-30 después de interrumpir la administración de insulina. El nivel de glucosa en sangre volvió al nivel normal antes del día 15 después de interrumpir la insulina y se mantuvo en un nivel normal hasta el final del período de control (día 55).

La Fig. 15 muestra un diagrama que demuestra el impacto de la reversión terapéutica de la diabetes autoinmune. Si el tratamiento con microesferas se administra en el "período de gracia" de nueva aparición mostrado en la Fig. 15, se prevé que habrá una conservación del 10-20% de células beta que permanecen funcionales, conduciendo así a un control de la diabetes y una reducción de la dependencia del paciente de la insulina.

Se ha de entender que las realizaciones de la presente invención descritas son ilustrativas de algunas de las aplicaciones de los principios de la presente invención. Los especialistas en la técnica pueden realizar numerosas modificaciones sin salirse del espíritu y el alcance real de la misma. Diversas características aquí descritas pueden ser utilizadas en cualquier combinación y no están limitadas a las limitaciones concretas explicadas aquí específicamente.

Ejemplo 4

En los estudios abajo descritos se utilizaron las siguientes secuencias antisentido humanas:

h-CD40 AS: 5' ACT GGG CGC CCG AGC GAG GCC TCT GCT GAC 3'(SEQ ID NO: 4)

h-CD80 AS: 5' TTG CTC ACG TAG AAG ACC CTC CCA GTG ATG 3' (SEQ ID NO: 5)

h-CD86 AS: 5' AAG GAG TAT TTG CGA GCT CCC CGT ACC TCC 3'(SEQ ID NO: 6)

NH-CD80 AS: 5' TTG CTC ACG TAG AAG ACC CTC CAG TGA TG 3'(SEQ ID NO: 7)

Se obtuvieron DC humanas de sangre periférica mediante centrifugación Ficoll-Hypaque de sangre, separación de las células adherentes de las no adherentes sobre placas con propagación subsiguiente de las células adherentes en medio GM-CSF/IL-4 en AIM V (Thornton y col., 2000, J Immunol 164:183-190; Thornton y col., 1998, J ExpMed 188:287-296; Medarova y col., 2005, Diabetes 54:1780-1788; Petrovsky y col., 2003, Cancer Res 63:1936-1942; Gmyr y col., 2001, CellTransplant 10:109-121), y se utilizaron para todos los experimentos abajo descritos. Las células T se enriquecieron a partir de las células no adherentes recogidas durante la propagación de DC después de selección en columnas CD3. Todas las células fueron obtenidas de voluntarios sanos.

- 10 **Absorción de ODN por DC humanas:** Las DC humanas absorben rápidamente (antes de cinco horas) NF-kappaB y AS-ODN sin alterar la viabilidad y función celular conforme a la evaluación por tinción con PI/Annexin V, expresión de CD86, CD80, CD40 y MHC de clase II y absorción/procesamiento de DQ-Ovoalbúmina TM. La Fig. 16A muestra la absorción de oligonucleótidos antisentido CD86 marcados con FITC por DC humanas antes de 24 horas después de la adición al medio (3,3 µM final). La inmadurez de DC se asocia con su capacidad para la fagocitosis de partículas suministradas de forma exógena y el procesamiento endosomal/lisosomal. La Fig. 16B demuestra que las AS-ODN DC pudieron absorber proteína suministrada de forma exógena (DQ-Ovoalbúmina) y, más importante, su fluorescencia indica que el antígeno se procesó dentro de compartimentos endocíticos (la DQ-Ovoalbúmina intacta no tiene fluorescencia, pero la procesada sí). Al mismo tiempo, las DC tratadas con AS-ODN (mezcla de los tres oligonucleótidos antisentido) mostraban niveles en la superficie celular de CD86 y CD80 drásticamente suprimidos sin ningún cambio en ICAM-1 o HLA de clase I y clase II, importante para presentación de antígeno incluso con estimulación por lipopolisacárido (LPS); un tratamiento que aumenta drásticamente los niveles en superficie celular de CD80 y CD86. En primer lugar, 1×10^5 DC humanas se trataron con la mezcla AS-ODN (3,3 µM final de cada oligonucleótido) durante un período de 24 horas y luego se trataron con LPS (10 µg/ml) o vehículo PBS durante otras 24 horas. Después, las células se tiñeron con los anticuerpos fluorescentes indicados o con controles de isotipo. Luego se llevaron a cabo análisis FACS (Fig. 16C).

- 30 **Respuestas a vacunación y antígeno nominal:** células dendríticas humanas derivadas de PBMC tratadas con AS-ODN (SEQ ID N° 4, 6 y 7) presentaban una activación normal de células T singénicas y en células T singénicas en cocultivo con toxoide tetánico (habiendo sido obtenidas las células T de individuos vacunados recientemente); Fig. 17. Además, las AS-ODN DC estimularon las respuestas de células T normales cuando las DC se pulsaron con ovoalbúmina, un antígeno nominal, Fig. 18. En los dos ensayos se realizaron comparaciones con cocultivos con DC no tratadas como estimuladores. Se establecieron cocultivos en los que la relación 1:1 DC:células T consistía en 1×10^4 células. La proliferación se midió con el reactivo CyQuant el día 5 de cocultivo. Durante el período de cocultivo se suministró antígeno exógeno (toxoides tetánico u ovoalbúmina intacta) en una concentración final de 5 µg/ml.

- 40 **Respuestas a aloantígeno:** En la Fig. 19 se muestra que las AS-ODN DC proporcionaron estímulos de proliferación más débiles a células T alogénicas en cultivo. La proliferación de células T en cocultivos con AS-ODN DC era menor en comparación con cocultivos con DC de control como estimuladores. Se establecieron cocultivos en los que la relación 1:1 DC:células T consistía en 1×10^4 células. La proliferación se midió con el reactivo CyQuant el día 5 de cocultivo.

- Evaluación detallada de fenotipo de DC *in vitro* en DC tratadas con AS-ODN:** Las Tablas 2 y 3 (mostradas más abajo) demuestran los efectos de DC preparadas con ODN antisentido CD40, CD80 y CD86 en la prevención de la maduración de DC estimulada por LPS (incremento de proteínas de coestimulación) en muestras de dos voluntarios sanos medida mediante FACS.

- 45 Se obtuvieron leucocitos de dos voluntarios sanos y se utilizaron para generar bien DC de control, bien AS-ODN DC (de cada uno de los dos voluntarios). Después, las DC se activaron para maduración con LPS (lipopolisacárido) para ver si se producía un incremento de CD40, CD80, CD86 mediante análisis FACS. En las DC de control, el LPS estimuló el incremento de CD40, CD80, CD86 en la superficie, pero no pudo hacerlo en las AS-ODN DC. Esto confirma que los AS-ODN suprimen la expresión de CD40, CD80, CD86

incluso en presencia de una potente señal de maduración (LPS), que normalmente incrementa su expresión en la superficie. Los datos se muestran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2

Condición	Marcador CD	% Células positivas (M1)
Control- nooligos ni LPS	CD86	56,50
Control- nooligos ni LPS	CD80	8,50
Control- nooligos ni LPS	CD40	5,10
Solo LPS	CD86	59,20
Solo LPS	CD80	37,10
Solo LPS	CD40	20,50
Oligo + LPS	CD86	34,80
Oligo + LPS	CD80	14,80
Oligo + LPS	CD40	5,50

5

Tabla 3

Condición	Marcador CD	% Células positivas (M1)
Control- nooligos ni LPS	CD86	59,90
Control- no oligos ni LPS	CD80	18,60
Control- no oligos ni LPS	CD40	7,00
Solo LPS	CD86	63,00
Solo LPS	CD80	51,50
Solo LPS	CD40	33,10
Oligo + LPS	CD86	48,90
Oligo + LPS	CD80	33,10
Oligo + LPS	CD40	11,40

Ejemplo 5

10 Se produjeron microesferas que comprenden secuencias (tal como se describe en el Ejemplo 4) de oligonucleótidos antisentido complementarios a moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 humanas de la siguiente manera:

15 Aproximadamente 6,0 mg de poli-L-lisina en solución acuosa se calentaron a 70°C en un baño de agua dentro de un tubo cónico de 15 ml. Una cantidad de 6,9 mg de una mezcla de oligonucleótidos antisentido CD40, CD80 y CD86 (SEQ ID N°: 4, 6 y 7 tal como se describe en el Ejemplo 4) en solución acuosa se calentó a 70°C en un baño de agua dentro de un tubo cónico de 15 ml. Una solución de 12,5% PEG/12,5% PVP también se calentó a 70°C en un baño de agua. La poli-L-lisina se añadió con pipeta a la solución de oligonucleótidos antisentido. La suspensión resultante se mezcló agitándola brevemente con movimientos circulares con la punta de la pipeta. A continuación, el tubo se devolvió rápidamente al baño de agua de 70°C y se incubó durante 5 minutos. Después se añadió la solución de PEG/PVP a la solución de ASO/PLL. Ésta se mezcló agitándola brevemente con movimientos circulares con la punta de la pipeta.

20 Después, el tubo se devolvió rápidamente al baño de agua de 70°C y se incubó durante 5 a 10 minutos. A continuación, la formulación se enfrió a 4°C aplicando una velocidad de enfriamiento de 1°C/minuto. Después, las muestras se lavaron sobre hielo.

25 Después, las muestras se centrifugaron a 4.750 rpm durante 10-30 minutos a 4°C. Luego se retiró el sobrenadante y las microesferas se resuspendieron con un volumen igual de H₂O a 4°C. Las microesferas se lavaron después otras 3 veces por centrifugación, lavado y resuspensión a 4.750 rpm durante 5-10 minutos a 4°C, retirando el sobrenadante, resuspendiendo las microesferas y resuspendiendo con un volumen igual de H₂O a 4°C.

30 Tras el cuarto paso de centrifugación, las microesferas estaban resuspendidas a una concentración de aproximadamente 10 mg por ml. Después, las muestras se congelaron sobre hielo seco o en un congelador a -80°C durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se liofilizaron hasta sequedad a lo largo de un período de aproximadamente 24 horas.

Ejemplo 6

Un lote a escala de gramos producido para estudios de toxicología animal de la siguiente manera:

Formulación de microesferas (MS): Más abajo se describe un proceso de producción típica para las microesferas de oligonucleótidos antisentido (ASO MS) utilizando antisentido (SEQ ID N° 4, 6 y 7) tal como se describe en el Ejemplo 4. Una cantidad de 10 g de carga de producción de oligonucleótidos antisentido (ASO) se produjo utilizando tres alícuotas de producción de 2 l con 2,3 mg/ml de ASO inicial (13,8 g).

Volumen reacción total (ml)	Conc. ASO (mg/ml)	Conc. PLL (mg/ml)	Velocidad enfriamiento (baño)	T incubación polímero/ASO (min)	Conc. PEG y PVP (%)
2000 ml	2,3	2	0,9 °C/min	10	8,33

5

Para la carga de 2 l se utilizó un recipiente abierto de acero inoxidable (*stainlesssteel* - SS) de 3 l. En un frasco estéril de 1000 ml se introdujo la solución de poli-L-lisina (PLL) y agua libre de nucleasa y la mezcla se calentó a 70°C. El cóctel de ASO se introdujo en un frasco estéril de 250 ml y se calentó a 70°C. La solución de PEG/PVP se añadió al recipiente de 3 l y se calentó a 70°C. El cóctel ASO se añadió a la mezcla caliente de PLL/agua y se formó un complejo ASO/PLL. El complejo se mantuvo a 70°C durante cinco minutos y después se añadió al recipiente de 3 l que contenía PEG/PVP agitando con un levitador de paleta plana. La solución se mantuvo a 70°C durante 10 minutos. Toda la formulación se enfrió de 70°C a 2°C a una velocidad de ~0,9°C/minuto. La suspensión se transfirió para la retirada y el lavado del polímero.

10

Retirada/lavado de polímero: Todas las manipulaciones abiertas se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar. La suspensión de ASO-MS se transfirió a cuatro tarros cónicos de polipropileno previamente esterilizados de 500 ml. Los frascos se centrifugaron a 3.700 rpm (fuerza 3.200g) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró y después se añadió a los frascos agua USP filtrada por un filtro de 0,2 µm y previamente enfriada (4°C) (el mismo volumen que el sobrenadante retirado). Las pellas se resuspendieron agitando los frascos manualmente y utilizando sonicación en agua fría. Este proceso se repitió otras 3 veces, con un tiempo de centrifugación de 10 minutos en lugar de 60 minutos. La resuspensión final se realizó en ~500 ml de agua USP filtrada y el volumen total se añadió a una cubeta de liofilización.

15

20

Liofilización: El secado final hasta un polvo seco se llevó a cabo por liofilización. Las ASO-MS se liofilizaron a granel en cubetas de acero inoxidable desinfectadas de 25 x 40 cm (10 x 16") (1 por carga). Las 3 cargas se congelaron a -40°C sobre la balda del SP Industries (FTS) FreezeDryer FD-165. Después, las cargas se dispusieron de vuelta en el liofilizador y se liofilizaron durante tres días. El ciclo utilizado incluía un paso de congelación a -40°C durante 4 horas, un paso de secado principal a -10°C durante 48,5 horas, una rampa lenta hasta un paso de secado secundario de 20°C durante 2 horas, una rampa lenta hasta un paso de mantenimiento a -5°C, y después una rampa lenta hasta un paso de mantenimiento final de 20°C. En este punto, el liofilizador se rellenó con aire de espacio libre filtrado por un filtro de 0,2 µm y las bandejas se transfirieron a una campana de flujo laminar para la recolección.

25

30

Recolección/envasado: Las ASO-MS se recolectaron en un frasco de vidrio de 100 ml con tapa esterilizado en autoclave. Se tomaron muestras de un total de 24 partes alícuotas en viales de vidrio con tapa de 10 ml o 20 ml esterilizados en autoclave (basado en la carga de dosis) para el estudio de determinación del intervalo de dosis. También se tomaron muestras de material adicionales para ensayos analíticos, carga biológica, endotoxina y otras aplicaciones. Todas las operaciones de recolección y toma de muestras se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar utilizando componentes previamente esterilizados o desinfectados.

35

Preparación del vehículo de resuspensión: Un polvo de glicina se disolvió en agua USP. Las ASO-MS se diseñarán para resuspenderlas en el vehículo en el momento de la dosificación.

Materiales: Siempre que fue posible se utilizaron materias primas de calidad USP. Antes de la producción se prepararon dos soluciones: la mezcla de ASO activos y agua USP filtrada para el lavado. Las dos soluciones se formularon de la siguiente manera: 1) 12,5% polietilenglicol (PEG), 12,5% polivinilpirrolidona (PVP), acetato de sodio 0,1M, pH 5,6; y 2) 15 mg/ml poli-L-lisina. Las dos soluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm en botellas esterilizadas en autoclave en una campana de flujo laminar. El cóctel de ASO activos se preparó resuspendiendo los polvos de ASO individuales (HuCD40, HuCD80 y HuCD86) en agua libre de nucleasa y determinando la concentración. Las soluciones de ASO individuales se mezclaron en proporción equimolar y se diluyeron hasta una concentración de 2,7 mM (27,45 mg/ml).

40

45

Limpieza de entorno/proceso: El producto de ASO MS se produjo en un espacio limpio ISO 8 (clase 100.000). En la medida admisible se mantuvo el cierre máximo de proceso. Todas las operaciones de proceso que requerían una exposición al entorno se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar en el espacio limpio. La calibración y certificación de los sistemas HVAC y la instrumentación de utilidad se mantendrán actuales. Además, se llevaron a cabo programas de mantenimiento preventivo para los espacios libres y los instrumentos asociados de acuerdo con procedimientos establecidos. La limpieza y desinfección rutinaria se mantuvo vigente y durante toda la campaña se utilizaron vestimentas completas adecuadas.

50

- Los equipos y componentes en contacto con el producto se compraron estériles o se desinfectaron en autoclave de laboratorio durante ≥ 30 minutos a 121°C , o se desinfectaron utilizando hidróxido de sodio y agua depurada USP. En los casos posibles se utilizaron componentes estériles desechables. Las superficies que no entraban en contacto con producto se desinfectaron utilizando isopropanol al 70% y esterilizador en frío de Spor-Klenz.

Descripción de muestras (análisis y/o control): Los siguientes análisis (Tabla 4 más abajo) se llevaron a cabo para caracterizar el material.

Tabla 4

Análisis	Método	Especificaciones objetivo
Identidad (3 ASO)	IPRP-HPLC	$33 \pm 6\%$ (cada ASO)
Ensayo (ASO total)	Espectrofotometría UV	0,65 - 0,78 mg/mg
Ensayo PLL	Análisis de aminoácidos	0,22 - 0,30 mg/mg
Contenido de PEG 3350	RP-HPLC/ELSD	$< 10 \mu\text{g/mg}$
Contenido de PVP K30	RP-HPLC/ELSD	$< 10 \mu\text{g/mg}$
Contenido de humedad	Karl Fischer	Informe
Contenido de sodio	Adsorción atómica	$< 10 \mu\text{g/mg}$
Distrib. granulométrica	Difracción Láser - Sympatec	V_{50} 1-5 micras
Distrib. granulométrica	Tiempo de vuelo - Aerosizer	Informe
Tamaño/morfología part.	SEM	Informe
Carga biológica	USP <85>	Informe
Toxina final	USP <61>	Informe

10 Ejemplo 7

También se llevaron a cabo estudios preclínicos adicionales con el fin de demostrar que los AS-ODN en microesferas (incluyendo las secuencias antisentido SEQ ID N° 4, 6 y 7 descritas en el Ejemplo 4) no son tóxicos en primates no humanos y para confirmar el tráfico de nodos linfáticos pancreáticos y la acumulación de oligonucleótidos radiomarcados o marcados con fluorescencia en microesferas.

- 15 Los experimentos iniciales utilizaron Fluospheres comerciales de Invitrogen, que se considera que se comportan de forma idéntica a las microesferas (MSP) aquí descritas. Se aislaron nodos linfáticos y bazo de sujetos de estudio que presentaban MSP acumuladas para identificar los tipos celulares que las absorben, así como su capacidad funcional.

- 20 Los resultados de estos experimentos mostraron que los AS-ODN en microesferas no son tóxicos y que la acumulación de MSP se observó en nodos linfáticos, páncreas, riñones e hígado. Sorprendentemente, esta acumulación de MSP reflejaba, al menos en parte, lo observado en experimentos similares realizados utilizando ratones.

Ejemplo 8

- 25 **Disminución de proteínas de dianas ASO-MS.** Se generaron células dendríticas derivadas de monocitos por centrifugación sobre un gradiente Ficoll, adherencia de monocitos a plástico y diferenciación de células en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 7 días. Después de 7 días se añadieron a las células ASO-MS (concentración final - $20 \mu\text{g/ml}$, secuencias expuestas en SEQ ID N° 4, 6 y 7 tal como se describe en el Ejemplo 4) o medio solo. Las células se cultivaron a partir de 7-14 días y después se recogieron para análisis mediante citometría de flujo. Las células se incubaron con anticuerpos dirigidos contra CD80 humano, CD86 humano y CD40 humano o controles de isotipo correspondientes durante 30 minutos a 4°C y después se lavaron con tampón PBS/FCS. Las células se resuspendieron en tampón PBS/FCS y se analizaron en un citómetroFACSCalibur. El FACSCalibur se calibra diariamente con perlas Calibrite de BD Bioscience. Los datos se analizaron con *software* CellQuest en cuanto al porcentaje de células positivas para cada proteína. Los datos se presentan como el porcentaje medio de células positivas en cada grupo (Fig. 20) o la
- 30 disminución porcentual de células de control/no tratadas (Fig. 21) $\pm$ desviación estándar, calculada en Excel 2007. Las células de dos donantes diferentes se analizaron en dos días de cultivo diferentes entre el período de los días 7-14.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Brown y col.

5 <120> Composición BASADA EN MICROESFERAS PARA PREVENIR Y/O REVERTIR LA DIABETES AUTOINMUNE DE NUEVA APARICIÓN

<130> 31203/44745

10 <150> 61/046,034
<151> 18-04-2008

<150> 61/048,246
<151> 28-04-2008

15 <160> 20

<170> Patent In versión 3.5

20 <210> 1
<211> 31
<212> ADN
<213> Mus musculus

25 <400> 1
cacagccgaggcaaagacacccatgcagggc a 31

<210> 2
<211> 29
<212> ADN
30 <213> Mus musculus

<400> 2
gggaaagccaggaatctagagccaatgga 29

35 <210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Mus musculus

40 <400> 3
tgggtgctccgtaagttctggaacacgtc 30

<210> 4
<211> 30
45 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4
actgggcgcccgagcgaggcctctgctgac 30

50 <210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

55 <400> 5
ttgctcacgtagaagaccctcccagtgatg 30

<210> 6
60 <211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
65 aaggagtatttgcgagctccccgtacctcc 30

<210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 ttgctcacgtagaagaccctccagtgatg 29

 10 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 8
 acaatccaattgctcacgtagaa 23

 <210> 9
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 ttgctcacgtagaagaccc 19
 25
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 10
 ttgggaaactggtgtgttg 19

 <210> 11
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 40 agattaaggtaatggcccag gat 23

 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Mus musculus

 <400> 12
 tattactgcgccgaatcct 19

 50 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattusnorvegicus

 55 <400> 13
 cggttctgtactcggcca 20

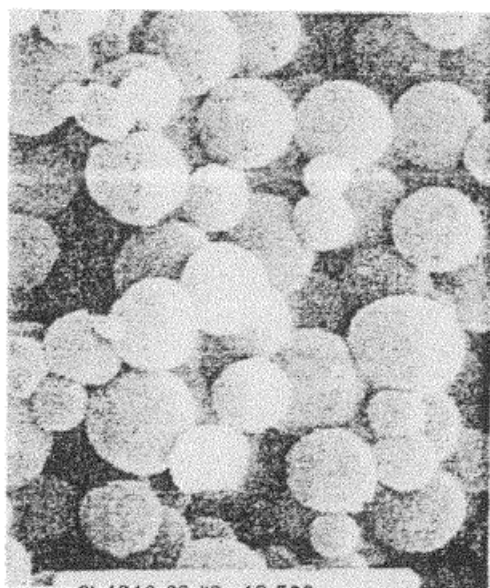
 <210> 14
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Rattusnorvegicus

 <400> 14
 gtccggttctgtactcgg 19
 65
 <210> 15

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 15
 ttggagaagaagccgactg 19
 <210> 16
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 ctgcactgagatgcgactc 19
 15 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Rattusnorvegicus
 20 <400> 17
 agatgcgactctcttgcc 19
 <210> 18
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 30 caaaatactactagctcactcag 23
 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 tggctctgccaataacta 19
 40 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 20
 cagttctgtgacattatct 19

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende:
 - i. un oligonucleótido antisentido que es SEQ ID N°: 4, o un oligonucleótido antisentido que presenta una homología de secuencia de polinucleótido de al menos un 90% con respecto a SEQ ID N°: 4, y que está dirigido y se une al transcrito primario CD40 humano;
 - ii. un oligonucleótido antisentido que es SEQ ID N°: 6, o un oligonucleótido antisentido que presenta una homología de secuencia de polinucleótido de al menos un 90% con respecto a SEQ ID N°: 6, y que está dirigido y se une al transcrito primario CD86 humano; y
 - iii. un oligonucleótido antisentido que es SEQ ID N°: 7, o un oligonucleótido antisentido que presenta una homología de secuencia de polinucleótido de al menos un 90% con respecto a SEQ ID N°: 7, y que está dirigido y se une al transcrito primario CD80 humano; estando dichos oligonucleótidos formulados en microesferas.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque los oligonucleótidos antisentido tienen individualmente una homología de secuencia de polinucleótido de al menos un 95% con respecto a cualquiera de SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 6 o SEQ ID N°: 7.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque al menos un 70% p/p de dichas microesferas son oligonucleótidos, siendo opcionalmente la proporción de oligonucleótidos antisentido individuales en dicha composición CD40 antisentido:CD80 antisentido:CD86 antisentido igual a 1:1:1.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque incluye oligonucleótidos antisentido que comprenden individualmente las secuencias de polinucleótido SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 7.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un humano.
6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 en un humano, siendo administrada dicha composición antes o después de la aparición clínica de la diabetes de tipo 1.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 6 para su uso en la normalización de los niveles de glucosa en sangre en dicho humano en comparación con los niveles de glucosa en sangre de dicho humano antes de la administración.
8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso en la regeneración de la población de células beta en dicho humano.
9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso en la conservación de la masa de células beta residuales en un humano, manteniendo el uso de la composición la masa de células beta del humano en al menos aproximadamente un 15% de la masa presente antes de la aparición de la diabetes, o para su uso en la protección de las células beta pancreáticas de un humano, o para su uso en la reducción de la inflamación pancreática mediada por células T en un humano o de la muerte de células pancreáticas.
10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, caracterizada porque se administra en combinación con insulina, siendo administrada opcionalmente la insulina antes, al mismo tiempo o después de la administración de dicha composición.
11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque se administra en una forma inyectable.
12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque está formulada para una administración reiterada.
13. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la preparación de un medicamento para tratar la diabetes de tipo 1 en un humano, administrándose dicha composición antes o después de la aparición clínica de la diabetes de tipo 1.



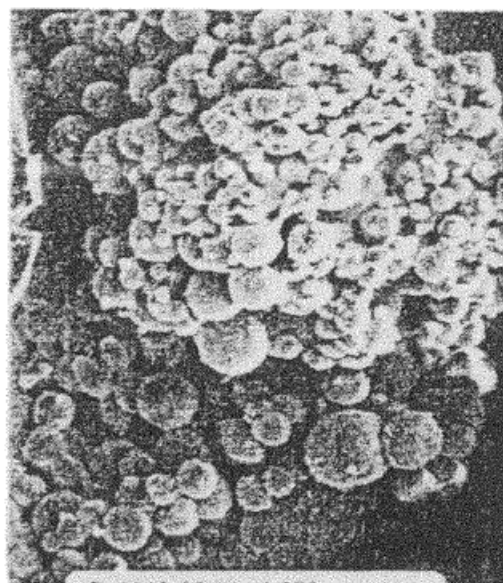
6) 1010-03 #2 x12,500

Terapéutica Epic: Oligo 2
contiene L/N 1007-02-VBL

Centro EM, NU 10/23/03

SEM, 10KV 1 μ m

FIG. 1A



2) 1218-03 #1 x1,250

Terapéutica Epic: VBON-1215-01

Centro EM, NU 12/29/03

SEM, 10KV 10 μ m

FIG. 1B

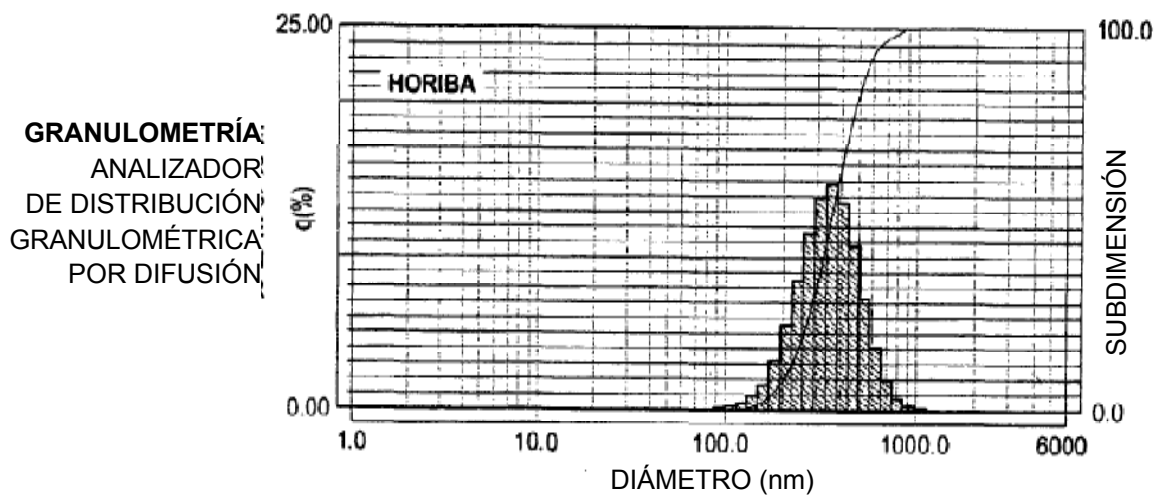


Figura 2A

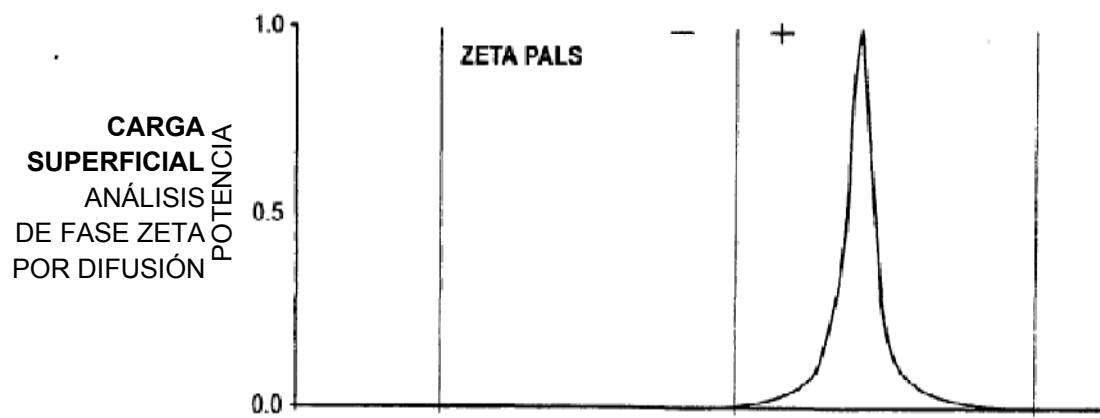


Figura 2B

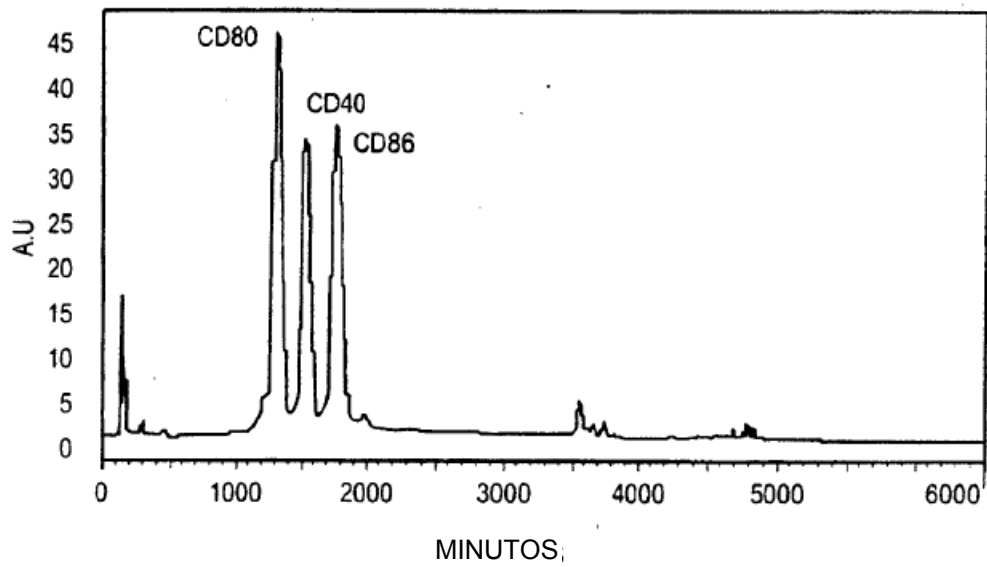


Figura 3

SUPERVIVENCIA DE RATONES NOD Tx CON 1 INYECCIÓN DE MSP

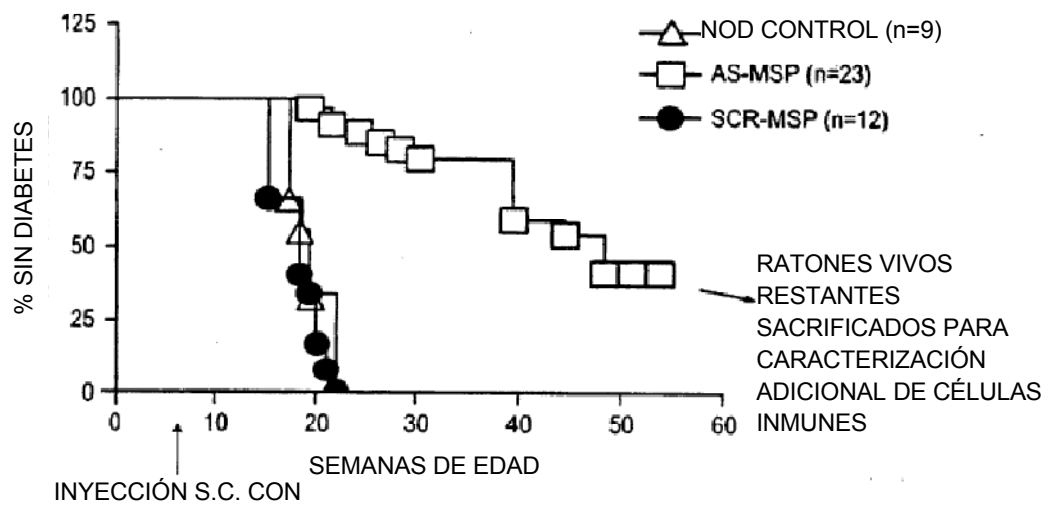


Figura 4

SUPERVIVENCIA DE RATONES NOD Tx CON 8 INYECCIONES DE MSP

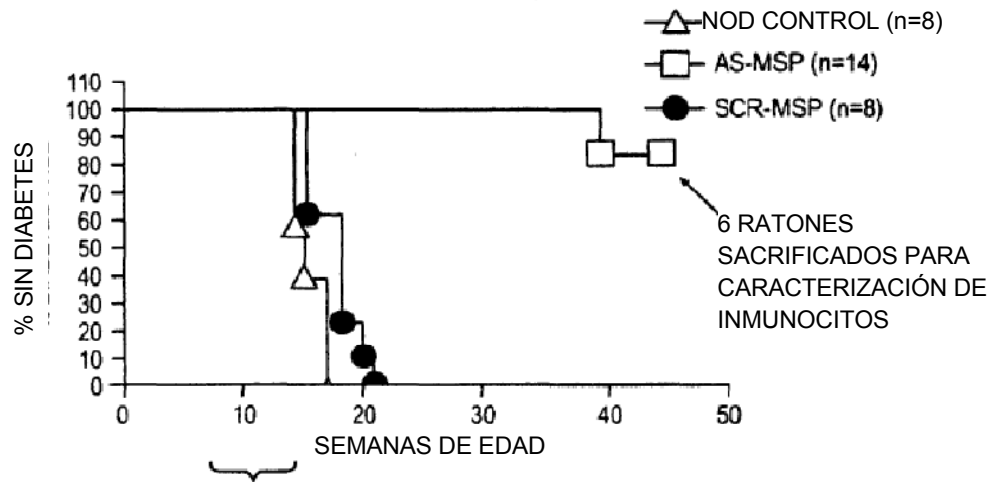
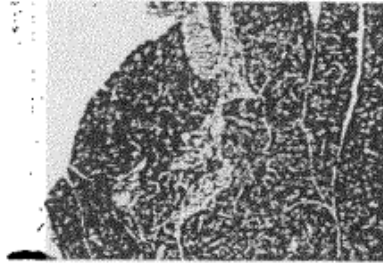


Figura 5

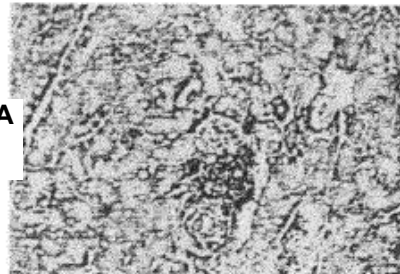
Figura 6A

NOD DIABÉTICO

H+E



**TINCIÓN PARA
INSULINA**

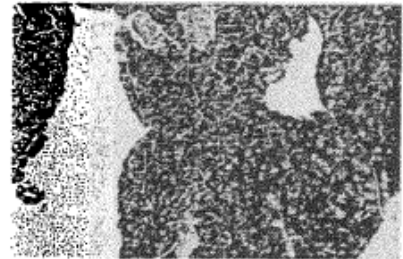


NOD DIABÉTICO

Figura 6B

Figura 6C

**SCR-MSP NOD
(HIPERGLUCÉMICO)**

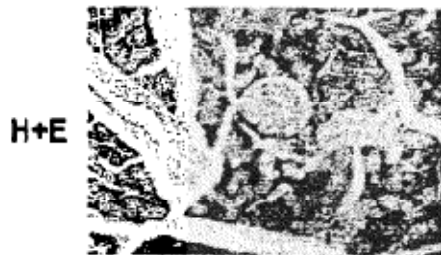


**SCR-MSP NOD
(HIPERGLUCÉMICO)**

Figura 6D

Figura 7A

**RATONES NOD SIN DIABETES TRATADOS
CON ASMSP (Tx< 8 SEMANAS DE EDAD)**



INSULINA

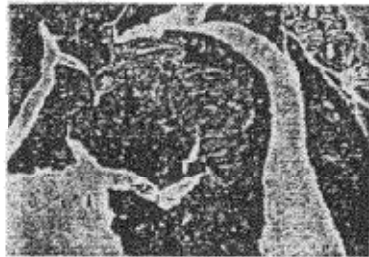


Figura 7B

Figura 7C

**RATONES NOD SIN DIABETES TRATADOS CON
AS-ODN DC (Tx 10 VECES DESPUÉS DE LA
APARICIÓN DE LA DIABETES)**

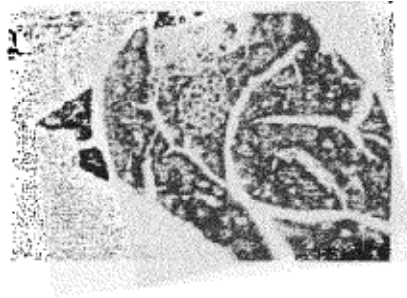


Figura 7D

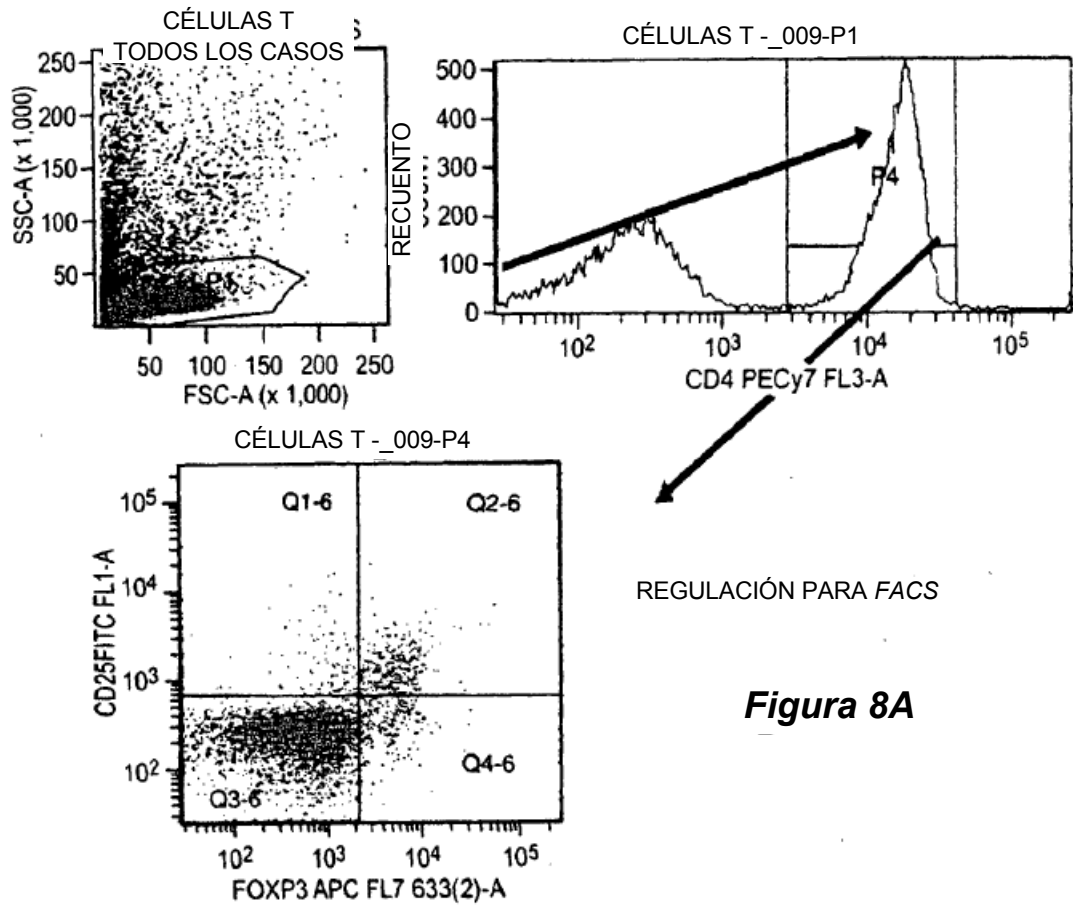


Figura 8A

Figura 8B

CÉLULAS T ESPLÉNICAS

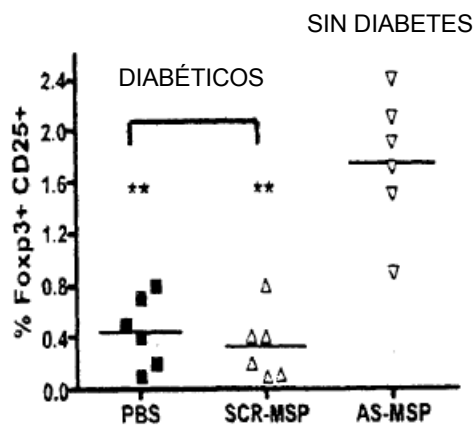
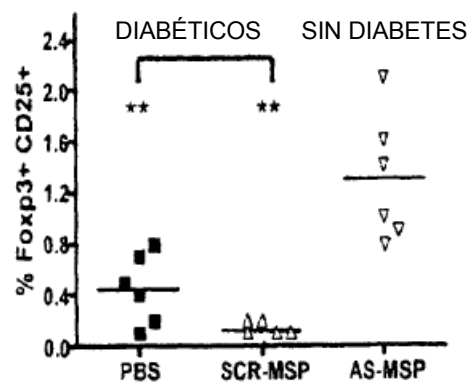


Figura 8C ;

CÉLULAS T DE NODOS
LINFÁTICOS REUNIDOS



CÉLULAS T DERIVADAS DE BAZO

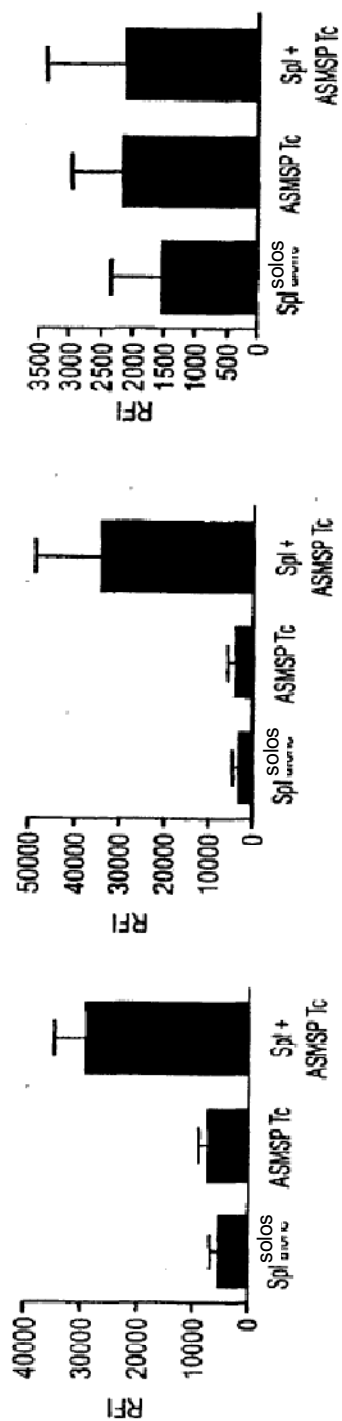


Figura 9A

CÉLULAS T DERIVADAS DE NODOS LINFÁTICOS REUNIDOS

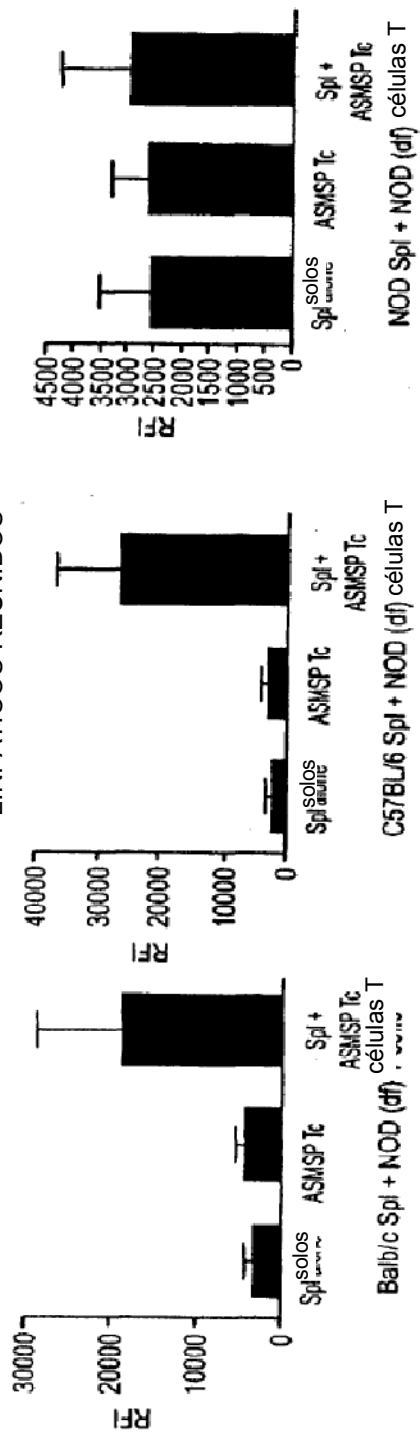


Figura 9B

Figura 10A

CÉLULAS T ESPLÉNICAS

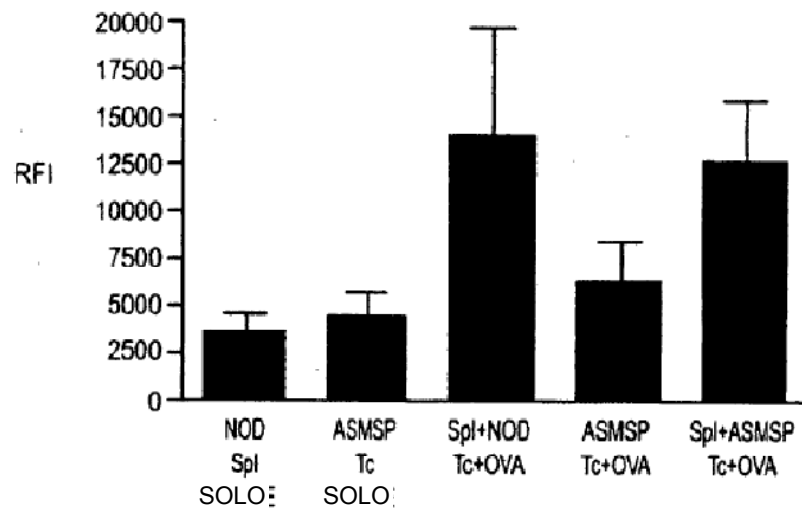


Figura 10B

CÉLULAS T DE NODOS
LINFÁTICOS REUNIDOS

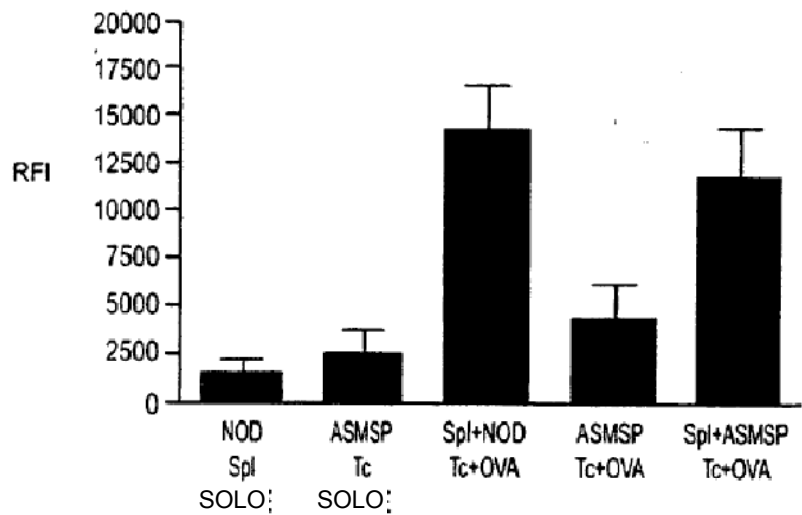


Figura 11A

CÉLULAS T ESPLÉNICAS

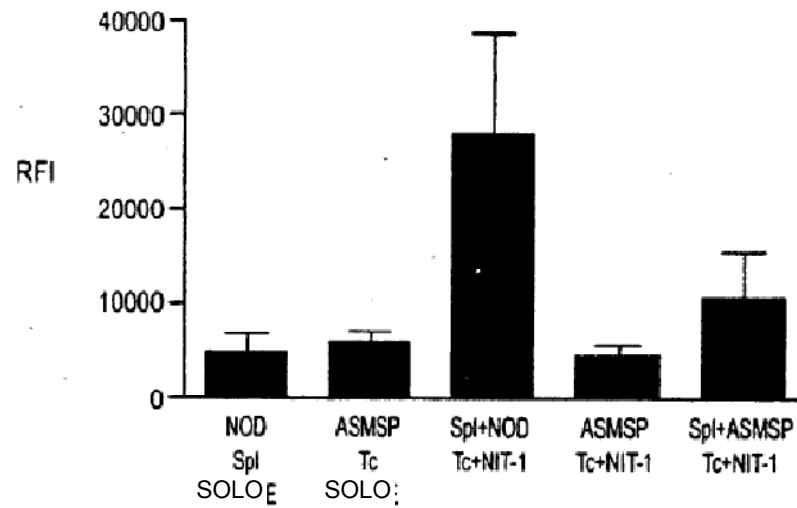


Figura 11B

CÉLULAS T DE NODOS
LINFÁTICOS REUNIDOS

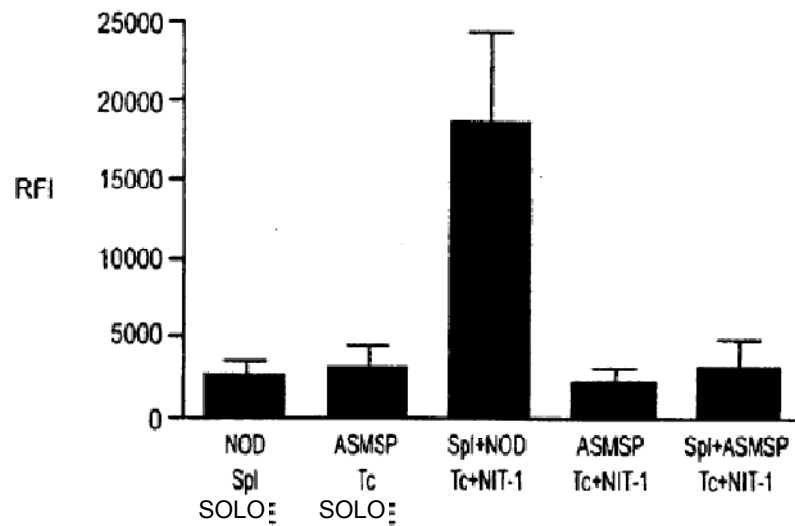


Figura 12A

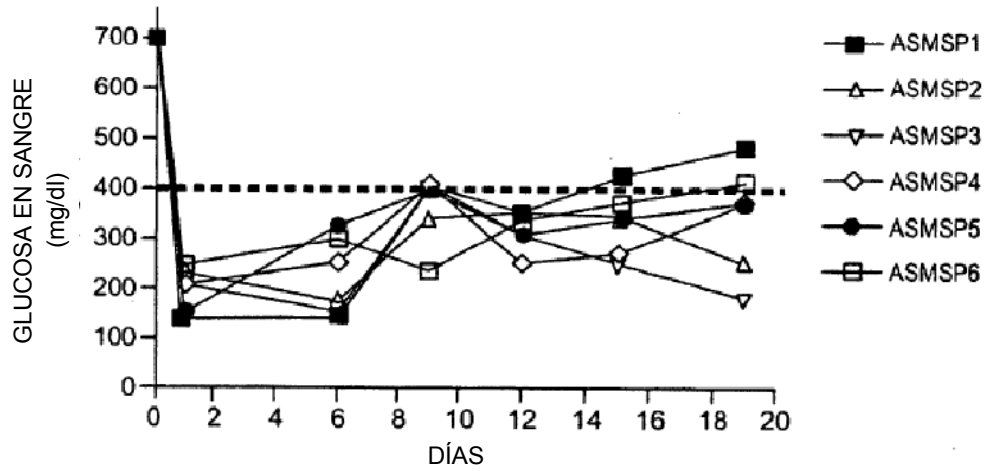


Figura 12B

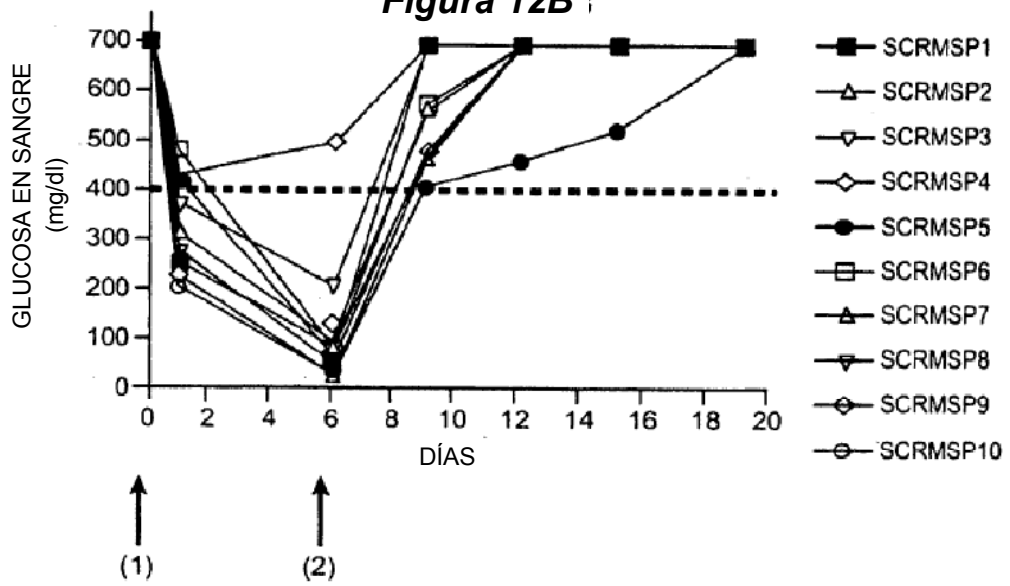


Figura 13A

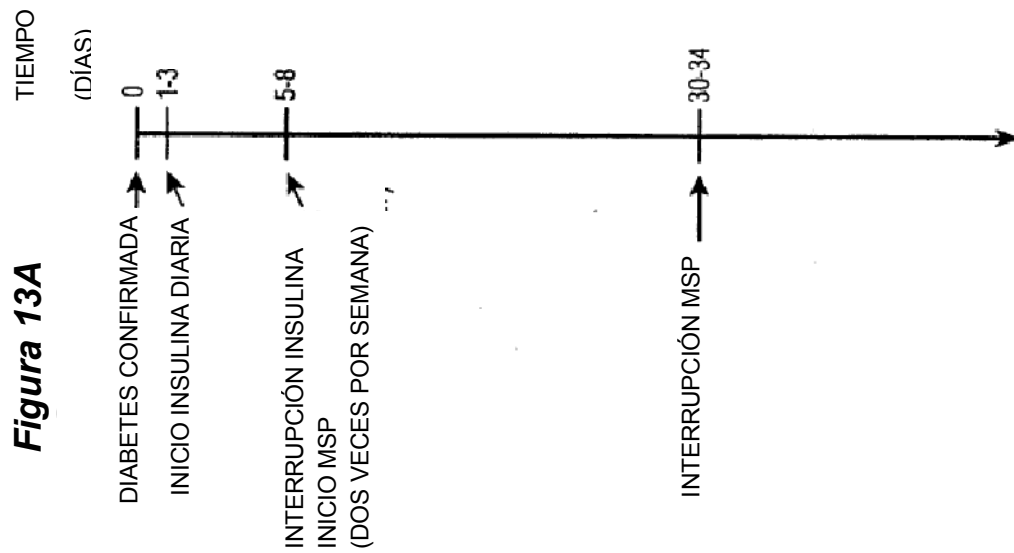


Figura 13B

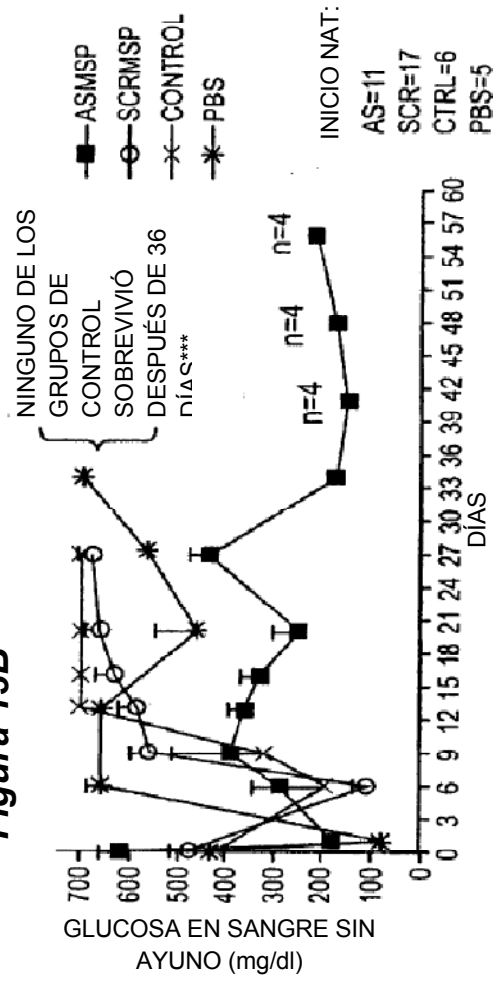


Figura 13C

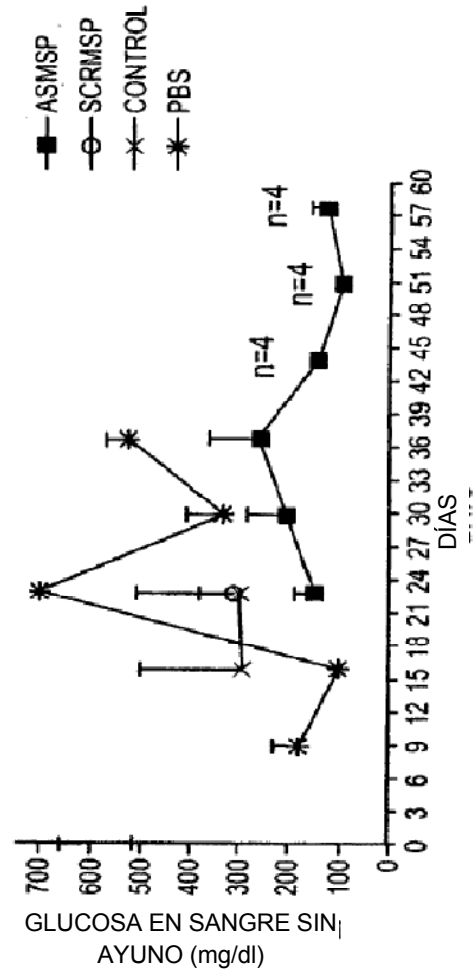


Figura 14A

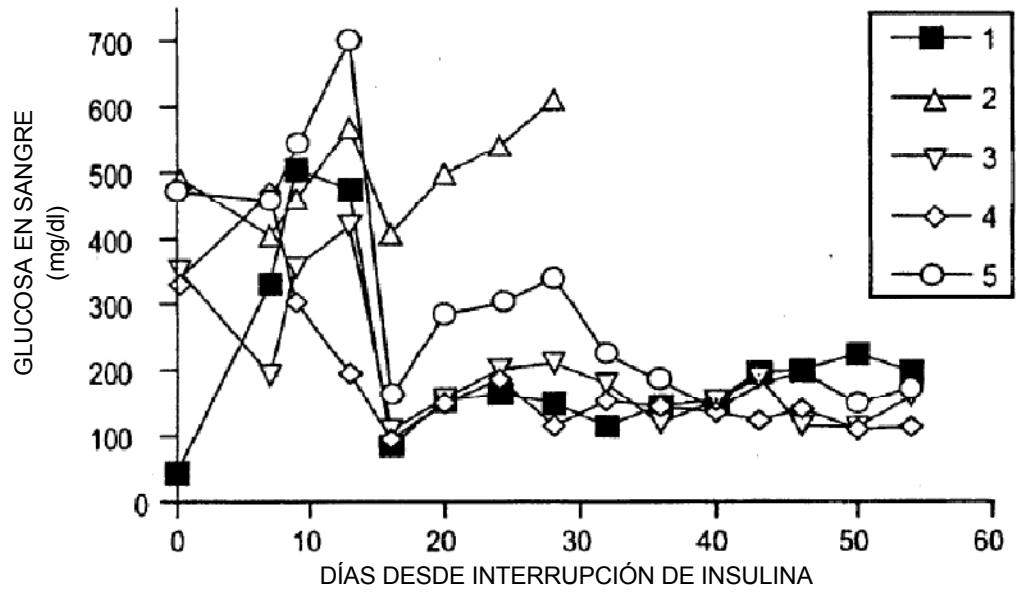


Figura 14B

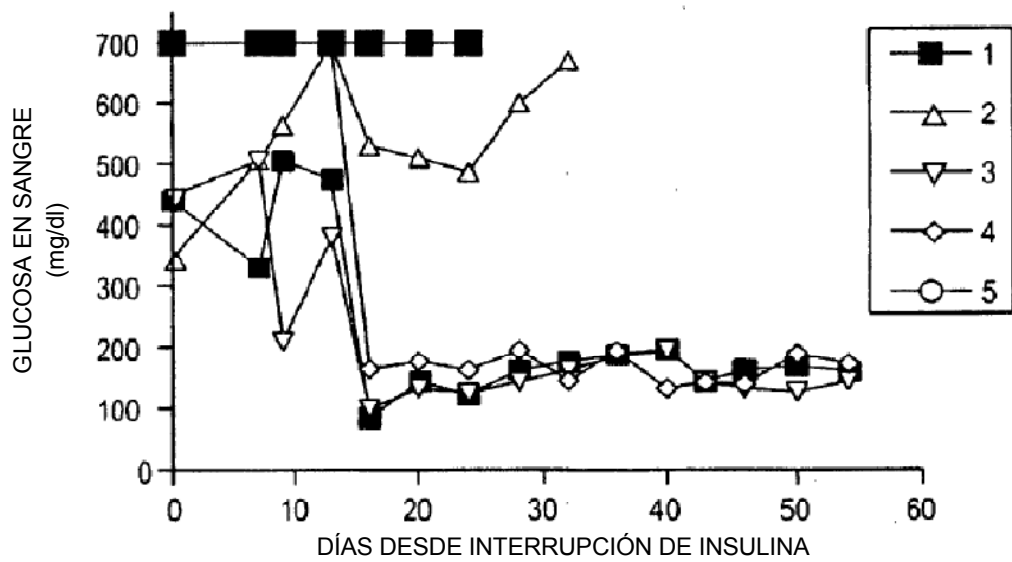
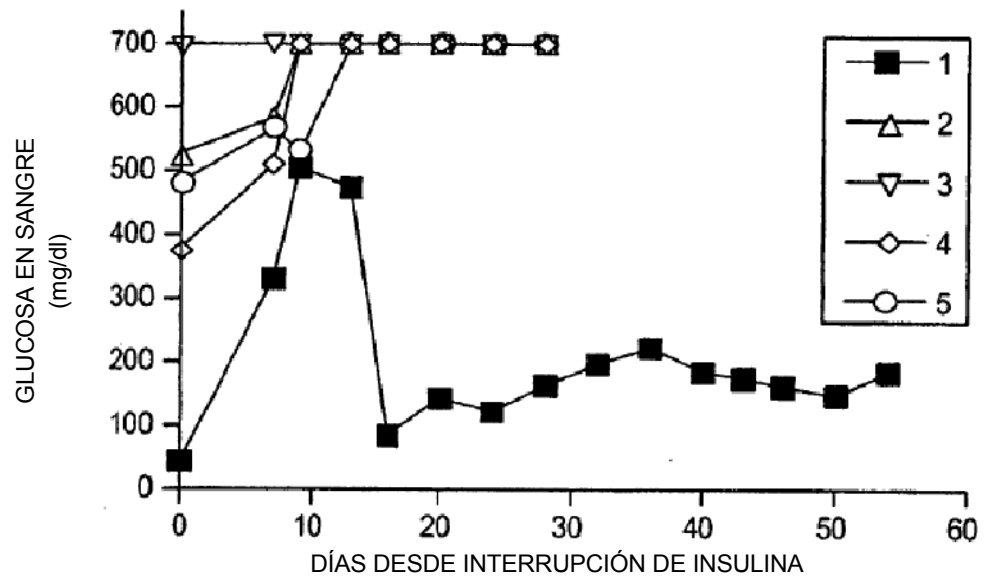


Figura 14C :



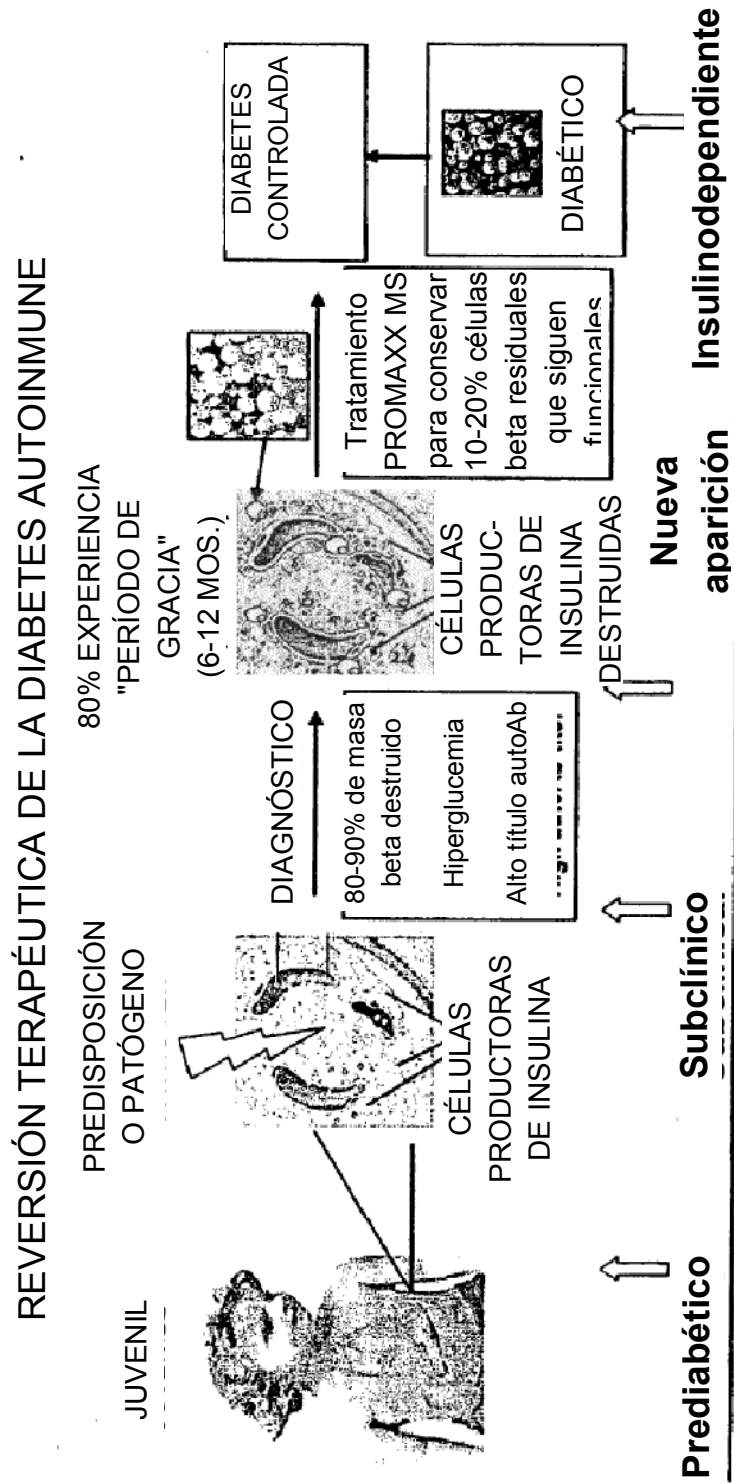


Figura 15

Absorción de oligonucleótido AS CD86 marcado con FITC por hDC

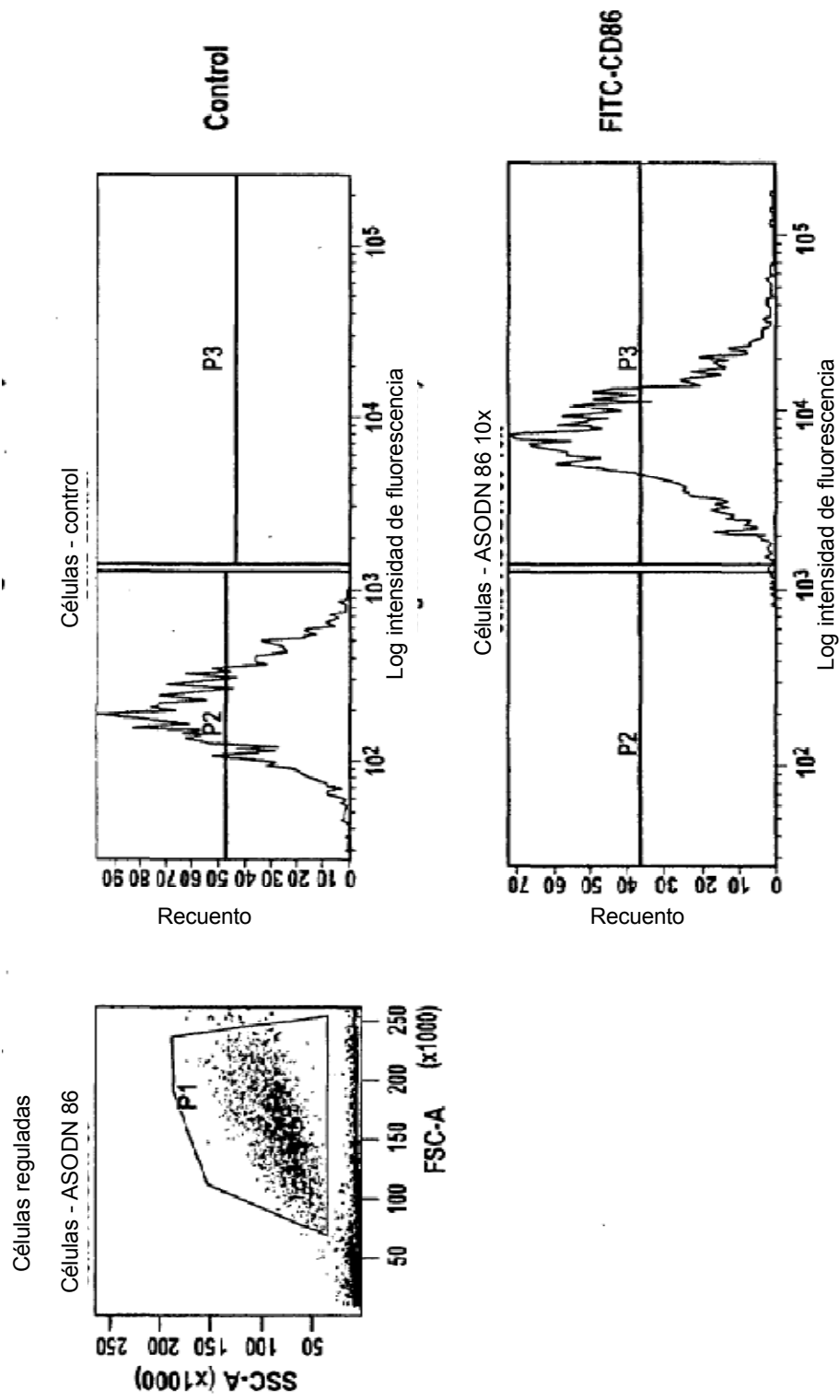


Figura 16A

Absorción/procesamiento de DQ-Ovoalbúmina por hDC tratadas con AS-ODN

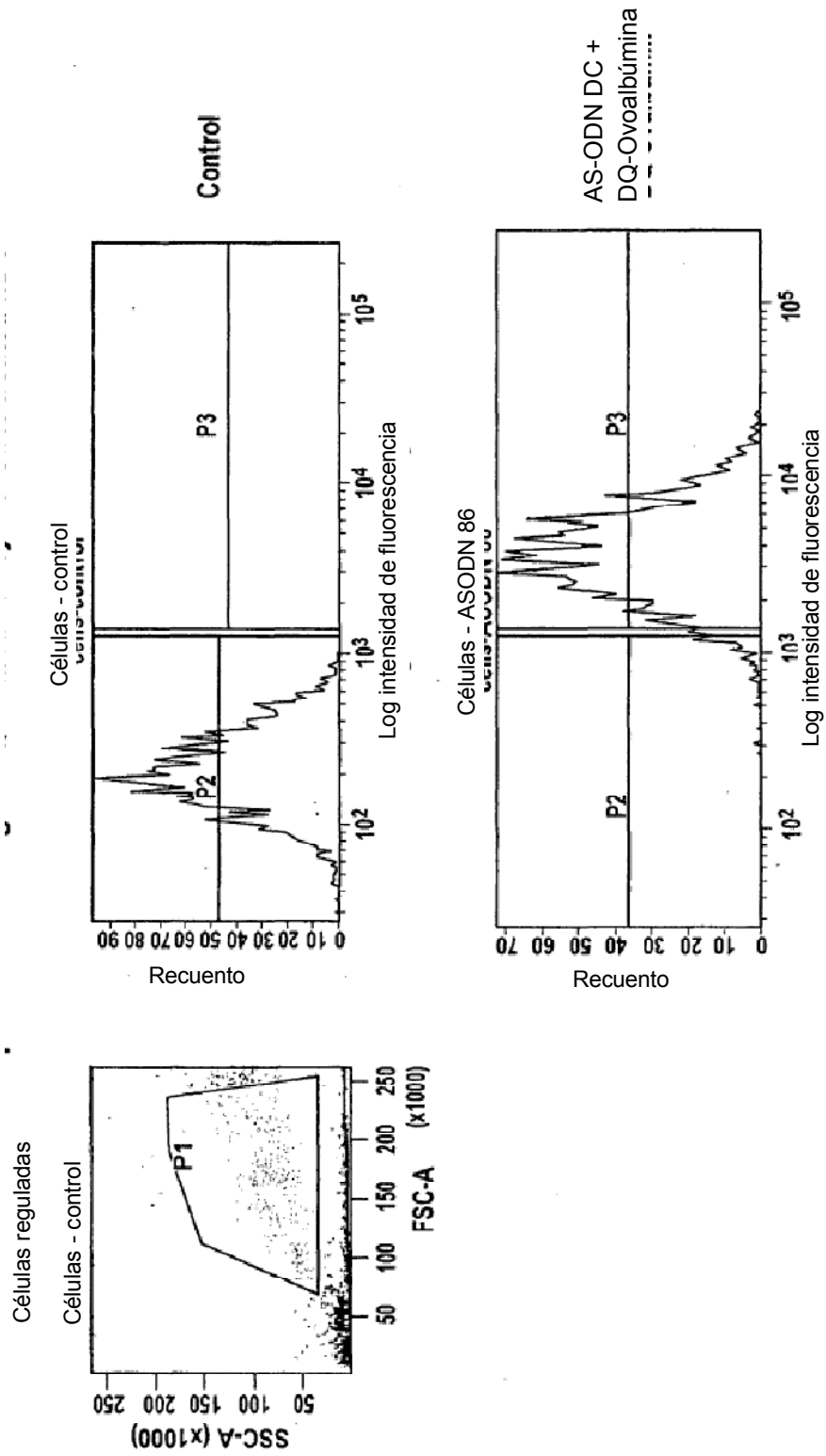


Figura 16B

Absorción/procesamiento de DQ-Ovoalbúmina por hDC tratadas con AS-ODN

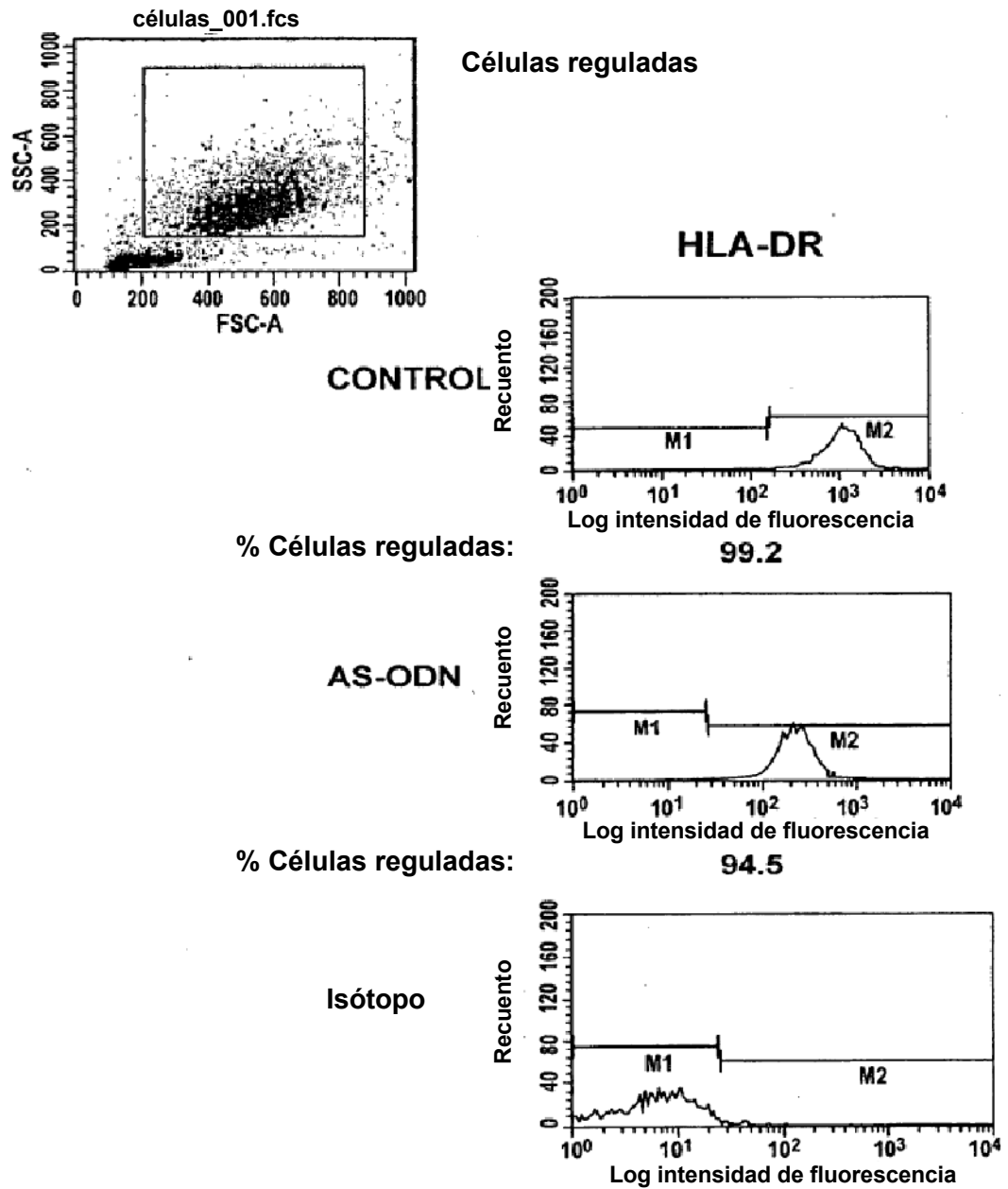


Figura 16C

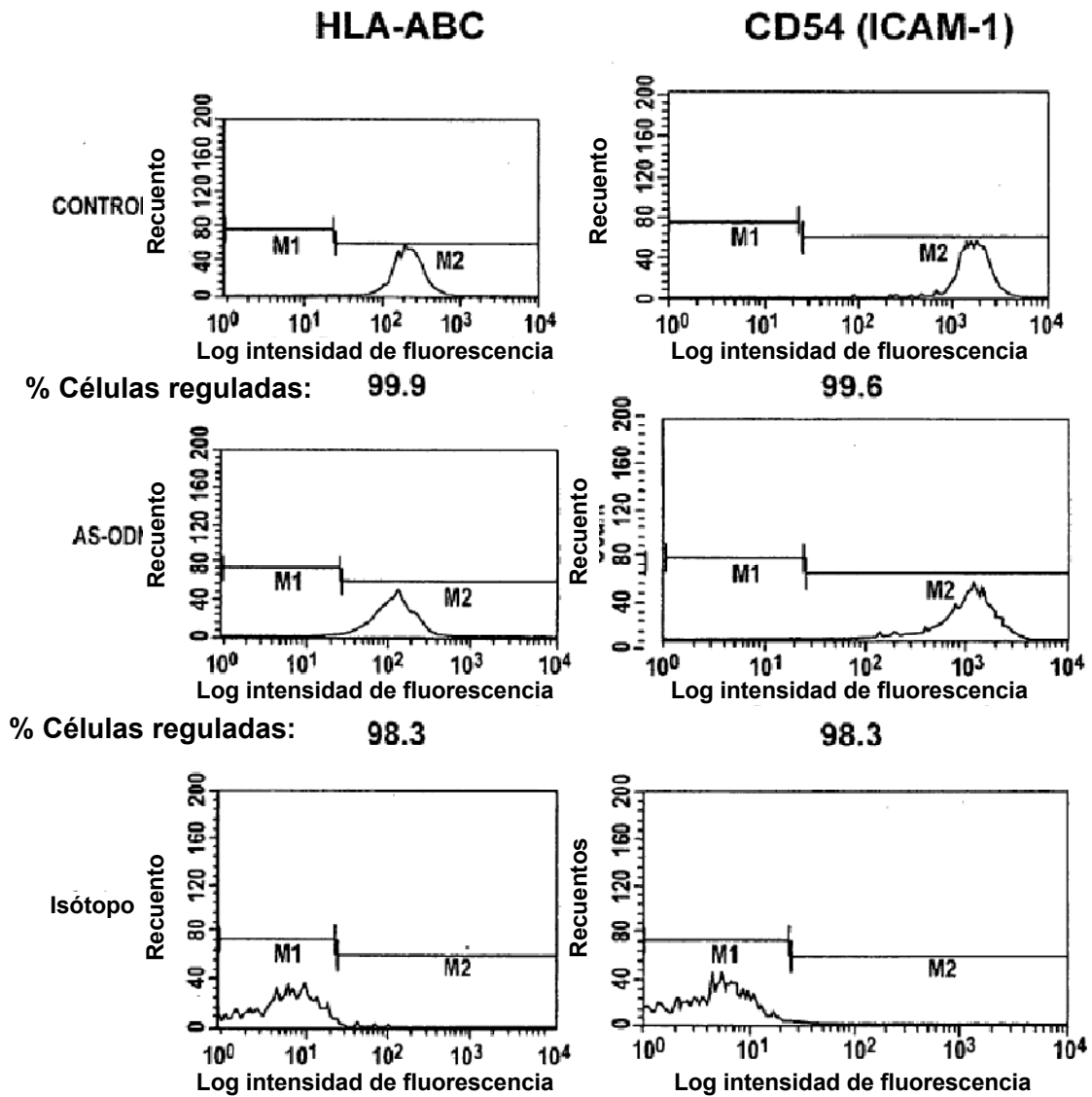


Figura 16C (continuación 1)

Fenotipo mediante FACS de realizaciones de DC después de LPS Tx

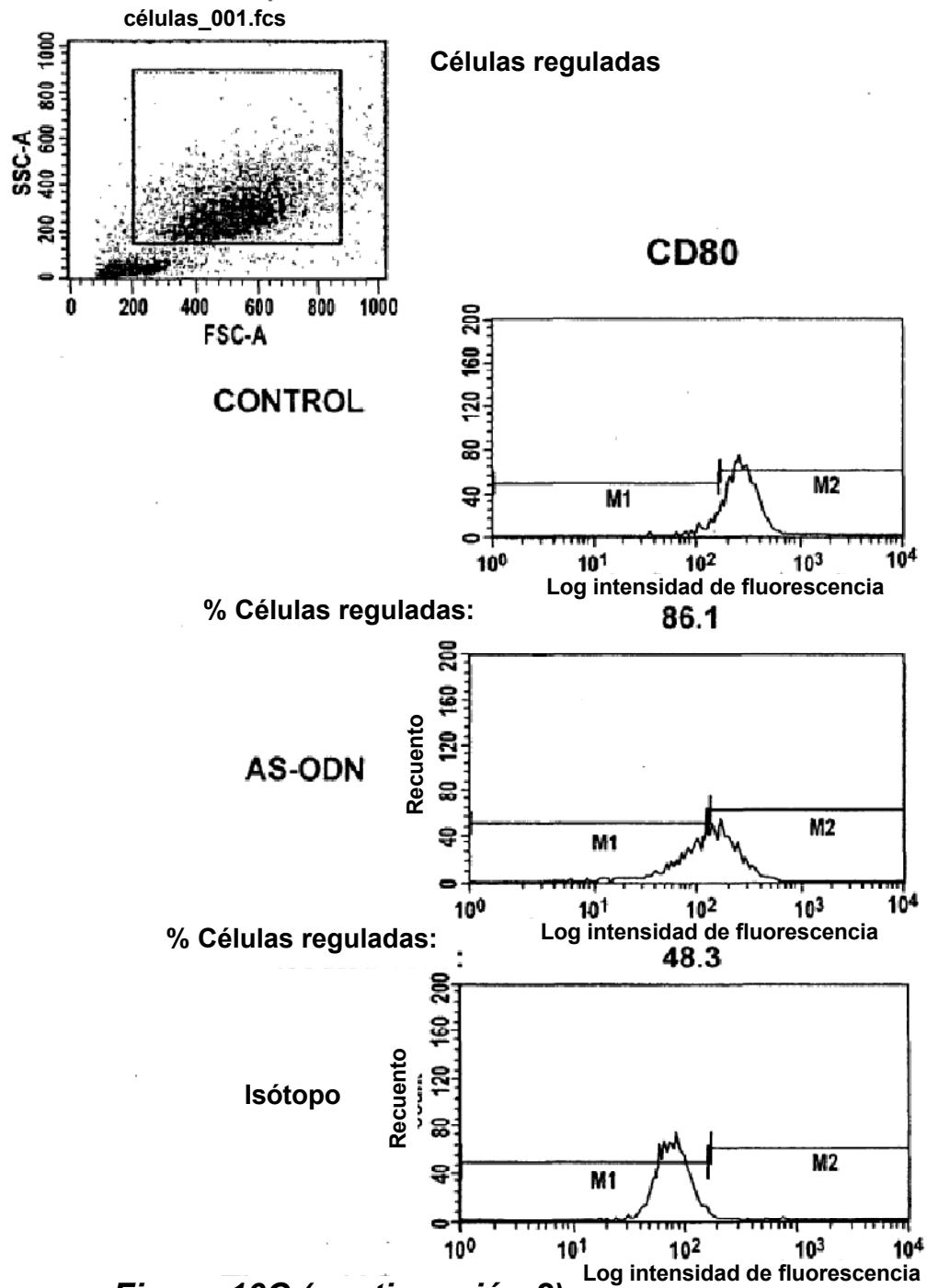


Figura 16C (continuación 2)

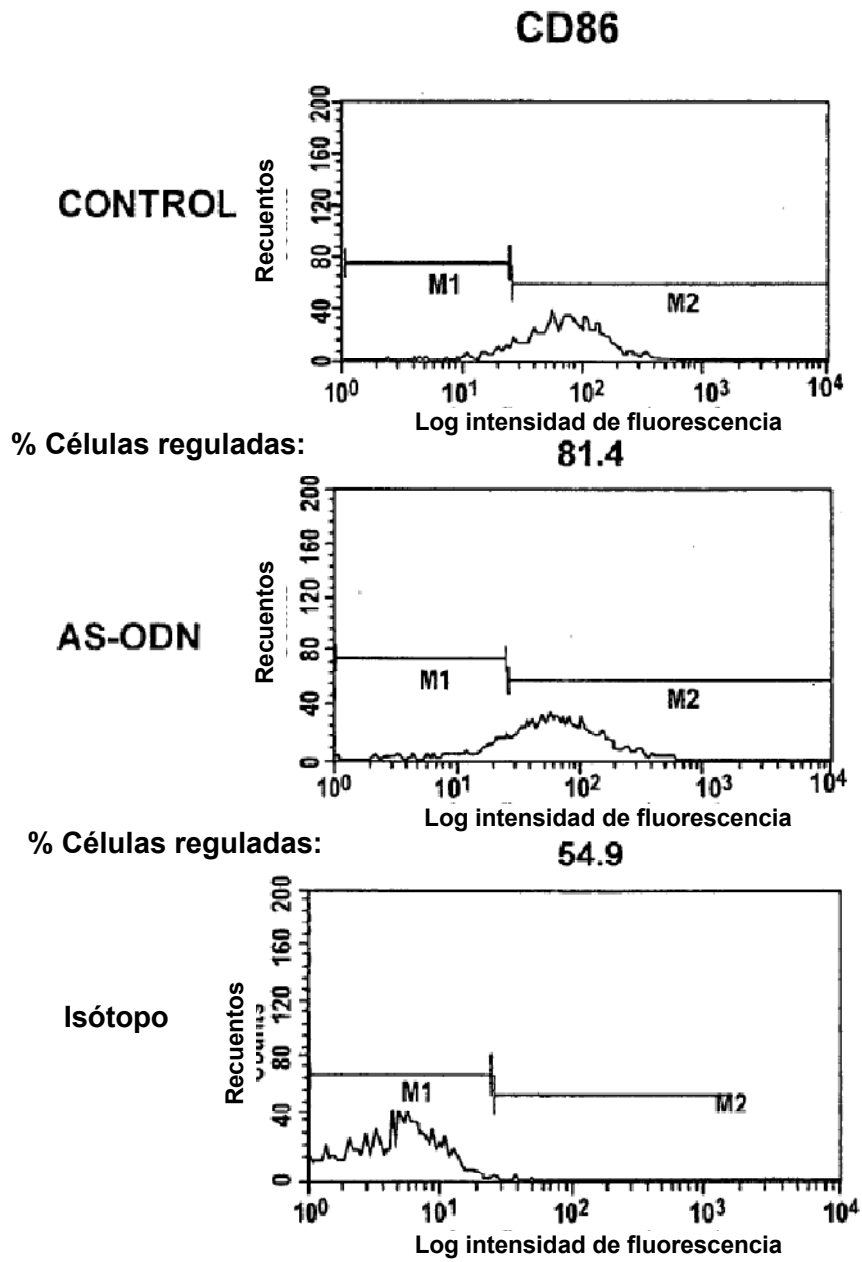


Figura 16C (continuación 3)

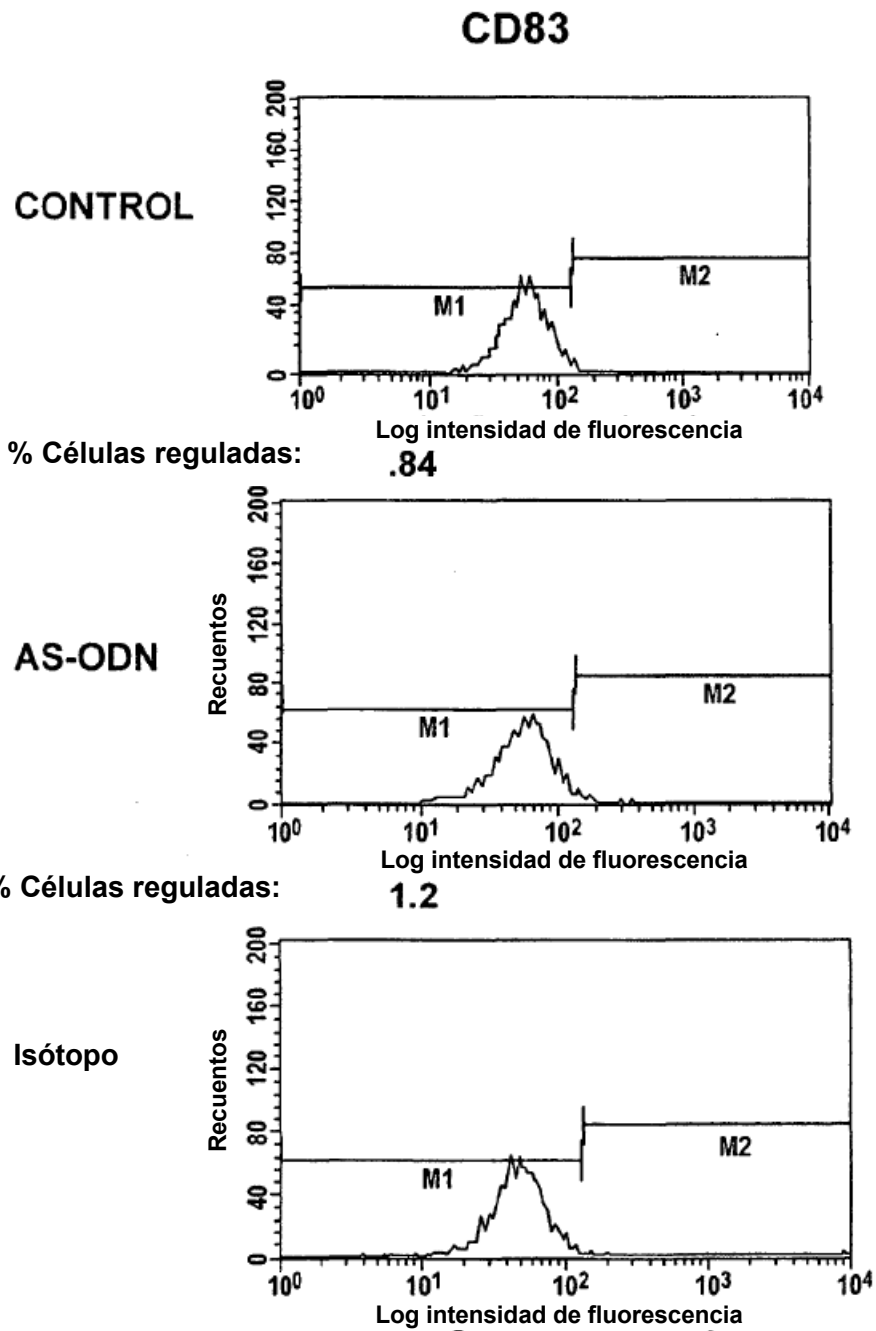
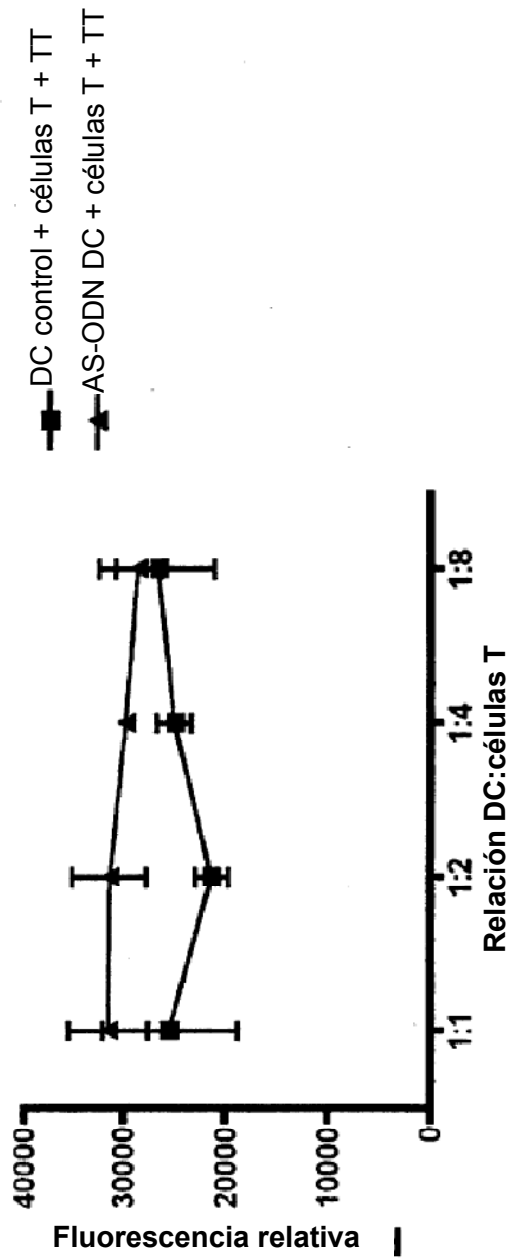


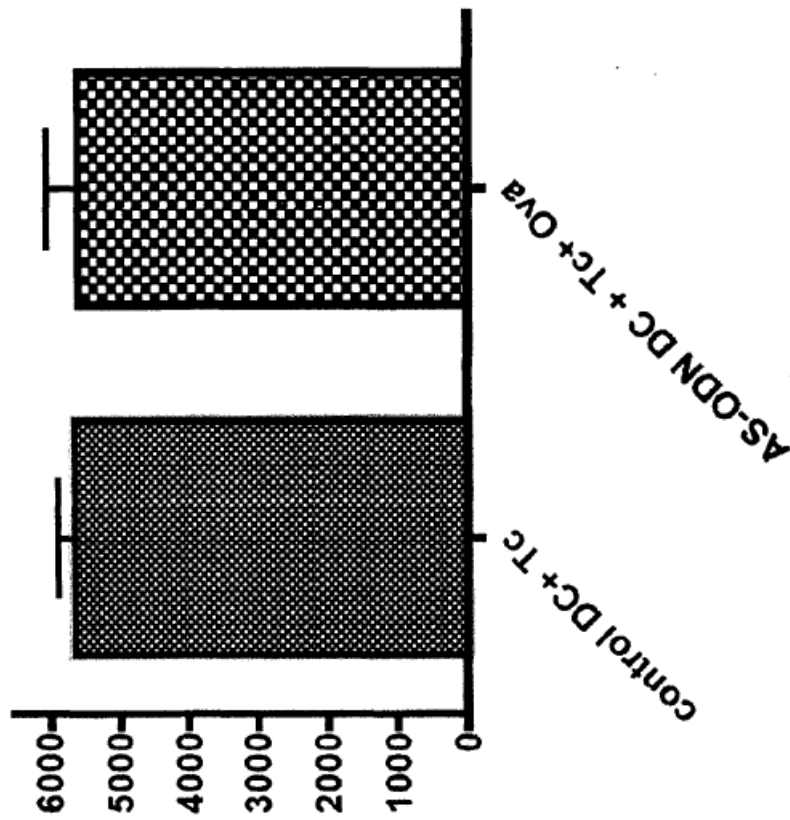
Figura 16C (continuación 4)

Proliferación de células T singénicas en cocultivos *in vitro* de DC pulsadas con toxoide tetánico



Proliferación de células T de un voluntario humano sano, al que se le había administrado recientemente una vacuna de recuerdo del tétanos cocultivada con DC derivadas de sangre periférica tratadas con AS-ODN en presencia de toxoide tetánico. Las barras de error indican el error estándar de la media de la respuesta de tres cocultivos independientes de células del mismo individuo.

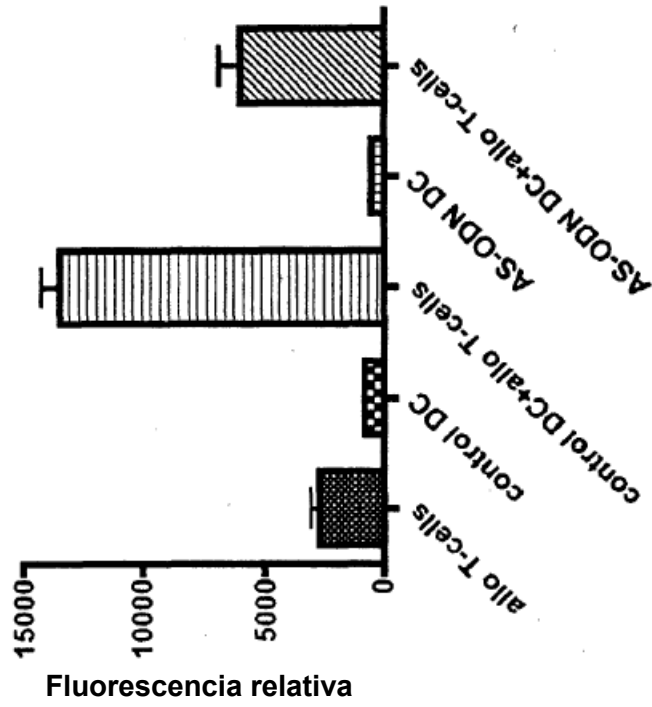
FIGURA 17



Proliferación de células T de voluntarios humanos sanos cocultivadas con DC autólogas derivadas de sangre periférica tratadas con AS-ODN en presencia o ausencia de ovoalbúmina intacta como antígeno nominal. Las barras de error indican el error estándar de la media de la respuesta de tres cocultivos independientes de células del mismo individuo.

FIGURA 18

Proliferación de células T alogénicas en cocultivos *in vitro* de DC



proliferación de células T de voluntarios humanos sanos cocultivadas con DC alogénicas derivadas de sangre periférica tratadas con AS-ODN o DC alogénicas no tratadas. Las barras de error indican el error estándar de la media de la respuesta de tres voluntarios independientes, siendo el donante de DC el mismo.

FIGURA 19

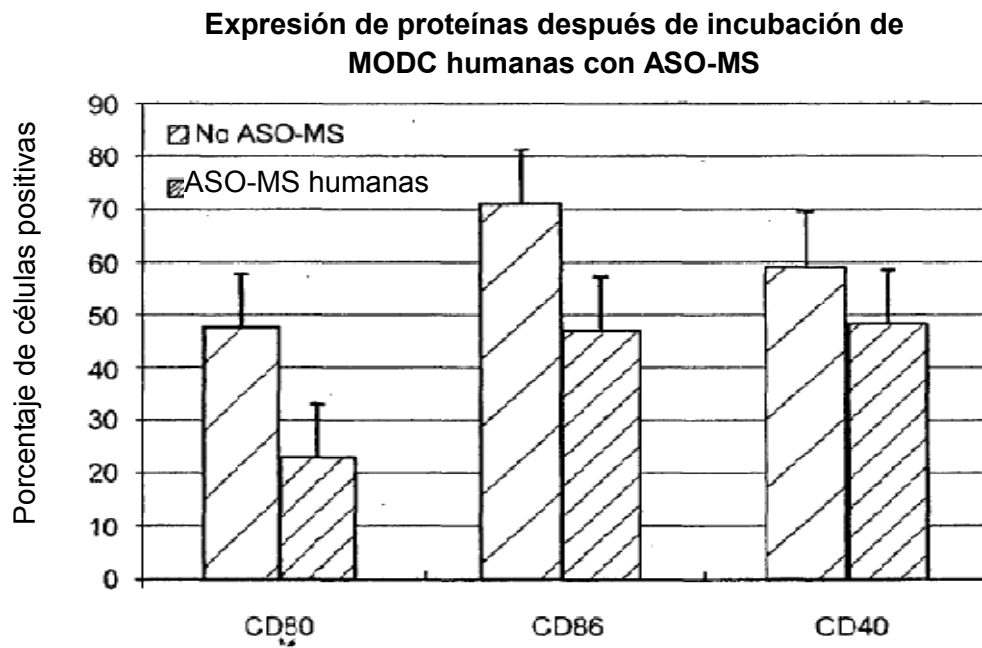


Figura 20

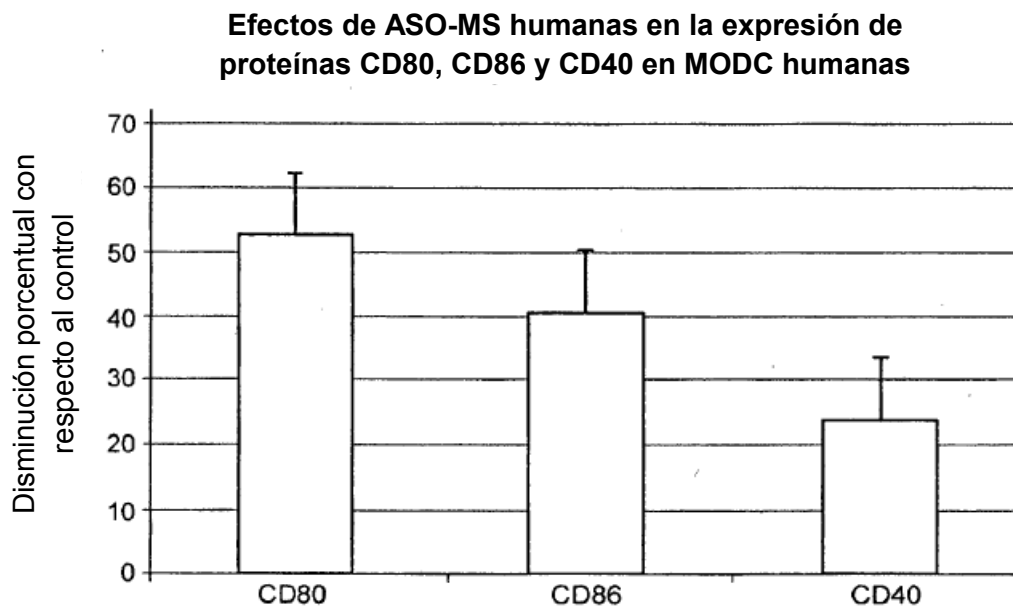


Figura 21