

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 189**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07K 14/62** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2014 PCT/US2014/036394**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14179586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2014 E 14791797 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2992094**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de diabetes tipo 1**

30 Prioridad:

**02.05.2013 US 201361818671 P**

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

**24.10.2018**

73 Titular/es:

**TOLERION (100.0%)  
321 Dedalera Drive  
Portola Valley, CA 94028, US**

72 Inventor/es:

**ROEP, BART, O.;  
ROBINSON, WILLIAM, H.;  
UTZ, PAUL;  
GARREN, HIDEKI y  
STEINMAN, LAWRENCE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 687 189 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de diabetes tipo 1

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en métodos para el tratamiento de diabetes mellitus dependiente de insulina en un sujeto.

**Antecedentes de la invención**

Una de las evidencias de diabetes tipo 1 (DT1) es una respuesta inflamatoria que destruye en última instancia las células beta del páncreas, un proceso denominado insulinitis. Se han detectado linfocitos T CD8 dirigidos a varios antígenos de islote incluyendo preproinsulina (PPI), ácido glutámico descarboxilasa (GAD), antígeno de insulinoma de tipo tirosina fosfatasa (IA2, también llamado ICA512), transportador de zinc ZnT8 y proteína relacionada con subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islote (IGRP), en la sangre y en islotes pancreáticos en individuos con DT1 (1-3). Así pues, se ha tratado de utilizar una terapia específica de antígeno para retrasar DT1 que incluye insulina administrada por vía parenteral y vía nasal (4-6). Sin embargo, el ensayo de insulina oral para retrasar DT1 falló, aunque se pudo constatar el retraso en un subgrupo de pacientes con altos niveles de anticuerpos de insulina (6,7). Otros ensayos clínicos dirigidos a GAD con alum resultaron infructuosos en la Fase 3 a la hora de reducir la pérdida de péptido C, un marcador de la función de células beta, posiblemente debido al uso de un adyuvante que no presentó eficacia en modelos murinos de DT1 (8). En cambio, se ha notificado el éxito de los resultados de un reciente ensayo en Fase 3 de un péptido de choque térmico (DiaPep277) para preservar el péptido C, el uso de insulina y HgbA<sub>1c</sub> (9). Cabe destacar que se ha demostrado la seguridad de estos ensayos que implican la inyección de auto-moléculas sin que se haya notificado hasta la fecha ningún evento adverso.

Un enfoque que ha tenido éxito en experimentos preclínicos en modelos de ratón con DT1 consistió en el uso de una vacuna de ADN que codifica la molécula de proinsulina entera, incluyendo péptido C, insulina A y cadenas B, obtenida por ingeniería genética (10-12). La tolerización a proinsulina previno y revertió insulinitis activa en ratones diabéticos no obesos (DNO) hiperglucémicos, un modelo de ratón de DT1 ampliamente estudiado (12).

Se han identificado en DT1 respuestas adaptativas a antígenos asociados a islote. Las muestras pancreáticas obtenidas de pacientes DT1 revelan un infiltrado linfocítico en islotes pancreáticos compuesto predominantemente de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, con moléculas HLA clase I reguladas a la alza (1,14). Estos hallazgos indican un papel patofisiológico clave de los linfocitos T citotóxicos en DT1. Asimismo, es probable que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> participen en la patogénesis de DT1, lo cual se corrobora además por la fuerte asociación de la susceptibilidad en DT1 con ciertos haplotipos de HLA clase II (14). Por último, se han encontrado autoanticuerpos para antígenos de islote pancreático en una abrumadora mayoría de los pacientes DT1 y aquellos con riesgo genético de desarrollar la enfermedad. Los anticuerpos para GAD, IA2 o insulina están presentes en un 95 % de los pacientes DT1 pre-diabéticos o de reciente aparición; un 80 % de los pacientes son positivos para dos o más de estos anticuerpos y un 25 % son positivos y tienen los tres anticuerpos. En los sujetos de control sanos, raramente están presentes autoanticuerpos asociados a DT1 múltiple (3).

La insulina es un autoantígeno específico de células β primarias y, generalmente, los autoanticuerpos de insulina son los primeros en aparecer en niños pequeños con DT1 (3,15). Asimismo, la mitad de los linfocitos T aislados de ganglios linfáticos de drenaje pancreático de pacientes con DT1 reconocen un epítipo de la cadena de insulina A, mientras que no se han observado linfocitos T de sujetos sanos que reconozcan dicho epítipo (16). Por último, se ha demostrado que los linfocitos T reactivos con insulina de pacientes DT1 presentan un fenotipo de linfocitos Th1 inflamatorios activado, mientras que los linfocitos T reactivos con insulina de controles sanos presentan un fenotipo regulador T protector (17).

Se han descrito métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes por administración de un ácido nucleico que codifica uno o más autoantígenos, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional Nos. WO 00/53019, WO 2003/045316 y WO 2004/047734. Aunque estos métodos han tenido éxito, son necesarias otras mejoras.

**Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para el tratamiento o prevención de diabetes mellitus dependiente de insulina en un sujeto, siendo dicha composición un auto-vector que tiene una secuencia de ácidos nucleicos idéntica en al menos un 95 % a SEQ ID NO: 1 (BHT-3021) para su uso en la reducción de la frecuencia de linfocitos T CD8 reactivos con proinsulina.

En algunas realizaciones, se administra el auto-vector en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto para las personas especializadas en la materia a partir de la descripción detallada y de las figuras.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama estructural de BHT-3021, BHT-3021 es un vector de expresión de plásmido bacteriano de 3,3 Kb que contiene las secuencias codificantes para el gen de proinsulina humana (hINS). Entre las características importantes funcionales y de control de BHT-3021 se incluyen el promotor/potenciador del gen inmediato-temprano citomegalovirus (CMV) humano, la señal de poliadenilación de gen de hormona del crecimiento bovino, el gen de resistencia a kanamicina y el origen de replicación de pUC para la propagación del vector en *E. coli*. Se ha modificado la cadena principal de BHT-3021 para reducir el número de secuencias CpG inmuno-estimuladoras y sustituir secuencias inmunosupresoras.

La Figura 2 presenta un esquema del diseño del ensayo de estudio. Se reclutaron 80 personas para el estudio. Se evaluaron cuatro niveles de dosis de BHT-3021: 0,3 mg, 1,0 mg, 3,0 mg y 6,0 mg. Una vez completada la fase de averiguación de la dosis del estudio (Fase de Escalada de Dosis), se reclutó a otros pacientes más para ampliar las cohortes de selección de dosis para obtener datos de seguridad y eficacia adicionales (Fase de expansión). En la parte de escalada de dosis se reclutó a los sujetos secuencialmente en las cohortes de 1 mg y después de 3 mg (asignados aleatoriamente con activo: placebo 2:1); se reclutaron simultáneamente cohortes para niveles de dosis 0,3 mg y 6 mg. Una vez completado el reclutamiento de escalada de dosis, se asignó aleatoriamente a los pacientes (activo: placebo 2:1) en la cohorte de expansión para recibir BHT-3021 a dosis de 0,3 mg, 1 mg o 3 mg o BHT-placebo.

La Figura 3 presenta la media del porcentaje de cambio en péptido C desde el valor basal. Se evaluó el péptido C para determinar si había o no una caída precipitada de esta medida de la función de célula beta durante 12 dosis semanales y más adelante. Se midió el péptido C tal como se describe en los métodos (18-20). N=14 para dosis de 0,3 mg; n=15 para dosis de 1,0 mg; n=13 para dosis de 3,0 mg; n=8 para dosis de 6,0 mg; n=23 para placebo. Se presenta la media del porcentaje de cambio desde el valor basal +/- Cl. W se refiere a la semana tras el inicio de 12 dosis semanales en el momento cero, mientras que M se refiere al mes tras el inicio de las 12 dosis semanales en el momento cero.

La Figura 4 presenta linfocitos T CD8 específicos de antígeno enumerados por tecnología de puntos cuánticos para múltiplo utilizando múltiplos de HLA clase I cargados con varios antígenos 21-24, En cada uno de los paneles se muestra el antígeno y el haplotipo de HLA. Las frecuencias de CTL (linfocito T citolíticos) se definen como el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de antígeno. Los cambios de CTL desde el valor basal hasta la semana 15 se presentan en el eje "y" y el % de cambio de péptido C desde el valor basal en la semana 15 se muestra en el eje "x". Los cambios de CTL fueron calculados sustrayendo los valores basales de los valores en la semana 15. Se realizaron los análisis en todos los pacientes tratados (0,3 mg: rombos, 1 mg: triángulos, 3 mg: cuadrados, 6 mg: círculos) y los tratados con placebo positivos para HLA-A2, -A3 y/o -B7 (A) y para antígenos de control (B). Se trazaron las estadísticas utilizando un análisis de regresión lineal.

La Figura 5 (A) presenta la media del porcentaje de cambio de péptido C desde el valor basal durante 14 meses. Se midió el péptido C tal como se describe en los métodos (18-20). A lo largo de 12 meses N=14 para dosis de 0,3 mg; n=15 para dosis de 1,0 mg; n=13 para dosis de 3,0 mg; n=8 para dosis de 6,0 mg; n=23 para placebo. Para 0,3 mg N=14 en M18 y N=7 en M24; 1,0 mg N=13 en M18 y N=7 en el mes 24; 3 mg N=12 en M18, N=9 en M24; 6,0 mg N=7 en M18 y n=6 en M24; Placebo n=3 en M18 y N=1 en M24. Se presenta la media del porcentaje de cambio desde el valor de referencia +/- Cl. La Figura 5(B) es un diagrama de dispersión para visualizar la media del cambio de cada paciente individual en los niveles de péptido C a todas las dosis en 15 semanas.

La Figura 6 presenta el uso de HgbA<sub>1c</sub> e insulina total media en varias dosis de BHT-3021 frente a BHT-placebo. (A) En eje "y" se muestra hemoglobina A1C y en el eje "x", el tiempo en meses (M). (B) En el eje "y" se muestra la media del uso de insulina total en UI/mg/kg y en el eje "x" se muestra el tiempo en semanas. Los datos de 104 semanas no son estadísticamente significativos tal como se menciona en el texto. Asimismo N=3 en las semana 104, tal como se menciona en la leyenda de la Figura para la Figura 5A.

La Figura 7 presenta los cambios en los linfocitos T específicos de antígeno a lo largo del tiempo para epítomos relacionados con la vacuna y de relación viral. Linfocitos T CD8 específicos de antígeno contra epítomos relacionados con la vacuna (proinsulina e insulina) y epítomos específicos de virus (EBV, CMV y sarampión); o (B) Se enumeró proinsulina solamente con múltiplos de péptido-HLA en el valor basal y las semanas 8, 15, 24, 36 y 52. Se calcularon deltas sustrayendo los valores basales de los valores en cada momento temporal.

La Figura 8 presenta las frecuencias de linfocitos T CD8 específicos de antígeno en pacientes tratados (círculos negros) y placebo (círculos sin rellenar) en la semana 0. Los linfocitos T CD8 específicos de antígeno fueron enumerados con tecnología de puntos cuánticos para múltiplo utilizando múltiplos de HLA clase I cargados con varios antígenos 21-24. Las frecuencias de CTL se definen como porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de antígeno. PI: proinsulina; Ins: Insulina; PPI: preproinsulina.

La Figura 9 presenta el número de puntos ELISpot positivos de IL-10 e interferón-gamma en comparación con el valor basal para 4 subgrupos de linfocitos T específicos de antígeno diferentes. El cambio en el número de puntos específicos de IL-10 (A) e interferón gamma (B) se mide en el eje "y", en comparación con los cambios entre la semana 0 y la semana 15, ambos para pacientes tratados con BHT-placebo y para pacientes tratados con BHT-3021,

### Descripción detallada

En la diabetes tipo 1 se produce una intensa respuesta inflamatoria que destruye las células beta en los islotes de Langerhans en el páncreas, el sitio en el que se produce y libera la insulina. La proinsulina es una diana principal de la respuesta inmune adaptativa en la diabetes de tipo 1 (DT1). La presente invención proporciona un plásmido de ADN que codifica proinsulina obtenido por ingeniería genética (BHT-3021) que preserva la función de células beta en pacientes DT1 por reducción de linfocitos T CD8 específicos de insulina. BHT-3021 está diseñado para disminuir la respuesta autoinmune específica de antígeno contra proinsulina en DT1. Se obtuvo el plásmido por ingeniería genética con un reducido número de motivos hexanucleótidos pro-inflamatorios, denominados motivos CpG. Las secuencias hexanucleótido de CpG activan respuestas inmunes innatas a través de la unión a receptor de tipo Toll y otros sensores de ADN (13). Se reemplazaron todas las secuencias CpG no esenciales por motivos GpG, que compiten con los motivos CpG. Este enfoque de vacuna de plásmido específica de antígeno tiene la ventaja teórica de disminuir la respuesta autoinmune al mismo tiempo que deja intacto otras funciones fisiológicas, deseables e importantes del sistema inmune, como las respuestas reguladoras inmunes contra proinsulina, la vigilancia inmune contra tumores y las respuestas inmunes contra agentes infecciosos.

La presente invención proporciona métodos de tratamiento, reducción, prevención e inhibición de diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) mediante la administración de un auto-vector que codifica y es capaz de expresar proinsulina humana. Tal como se ha descrito, en DMDI, antes del inicio de la diabetes manifiesta, tiene lugar un largo período presintomático durante el cual existe una pérdida gradual de la función de células  $\beta$  pancreáticas. Entre los marcadores que se pueden evaluar se incluyen, sin limitación, los niveles en sangre o suero del péptido C como indicativos de la función de células  $\beta$  pancreáticas, la presencia de insulinitis en el páncreas, el nivel y frecuencia de células de islote, anticuerpos contra la superficie de célula de islote, la presencia y concentración de autoanticuerpos contra autoantígenos dirigidos en DMDI, expresión aberrante de moléculas MHC Clase II en células beta pancreáticas, concentración de glucosa en la sangre y concentración en plasma de insulina. Un aumento del número de linfocitos T en el páncreas, anticuerpos de célula de islote y glucosa en sangre son indicativos de la enfermedad, al igual que la disminución de la concentración de insulina.

El ratón diabético no obeso (DNO) es un modelo de animal con muchas características clínicas, inmunológicas e histopatológicas en común con DMDI humana. Los ratones DNO desarrollan espontáneamente inflamación de los islotes y destrucción de células  $\beta$ , lo cual conduce a hiperglucemia y diabetes manifiesta. Los linfocitos T tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> son necesarios para que se desarrolle la diabetes, si bien sigue sin estar claro el papel de cada uno de ellos. Se ha demostrado que la administración de insulina o GAD, como proteínas, en condiciones tolerizantes a ratones DNO previene la enfermedad y regula a la baja las respuestas a los otros autoantígenos.

Las combinaciones de autoanticuerpos con varias especificidades presentes en suero son muy sensibles y específicas para diabetes mellitus de tipo I humana. Por ejemplo, la presencia de autoanticuerpos contra GAD y/o IA-2 es sensible en un 98 % y específica en un 99 % para la identificación de diabetes mellitus tipo I en suero de control. En parientes de primer grado no diabéticos de pacientes con diabetes tipo I, la presencia de autoanticuerpos específicos para dos de tres autoantígenos, que incluyen GAD, insulina e IA-2, transmite un valor predictivo positivo de >90 % para el desarrollo de DM tipo 1 en 5 años.

Los autoantígenos diana en diabetes mellitus dependiente de insulina humana incluyen por ejemplo, autoantígenos de insulina, incluyendo insulina, cadena B de insulina, proinsulina y preproinsulina; tirosina fosfatasa IA-2; IA-2 $\beta$ ; ácido glutámico descarboxilasa (GAD) tanto las formas 65 kDa como 67 kDa; carboxipeptidasa H; proteínas de choque térmico (HSP); glima 38; antígeno de célula de islote 69 kDa (ICA69); p52; dos antígenos gangliósidos (GT3 y GM2-1); proteína relacionada con glucosa-6-fosfatasa específica de islote (IGRP); y un transportador de glucosa de célula de islote (GLUT 2).

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento, prevención, reducción, inhibición y/o retraso, p.ej., de los síntomas o la gravedad de DMDI en un paciente que comprende la administración de un auto-vector modificado que codifica y es capaz de expresar proinsulina humana que tiene una secuencia de ácidos nucleicos idéntica en al menos un 95 % a BHT- 3021 (SEQ ID NO: 1). La administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del auto-vector modificado a un paciente provoca la supresión de una respuesta inmune contra el autoantígeno asociado con DMDI, en virtud de lo cual se trata o previene la enfermedad. El auto-vector puede co-administrarse o co-formularse con uno o más cationes divalentes presentes en concentraciones por encima de las fisiológicas. Sorprendentemente, la co-administración del auto-vector con uno o más cationes divalentes a una concentración total por encima de los niveles fisiológicos mejora uno o más entre la eficiencia de transfección, expresión (es decir, transcripción o traducción) de autoantígeno codificado y supresión terapéutica de

una respuesta inmune no deseada en comparación con la co-administración de un auto-vector en presencia de uno o más cationes divalentes a una concentración igual o por debajo de los niveles fisiológicos.

## II. Definiciones

A no ser que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden normalmente las personas especializadas en la materia a la que pertenece la presente invención. Las referencias que se enumeran a continuación proporcionan técnicamente una definición general de muchos de los términos utilizados en el presente documento: Hale y Margham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (HarperPerennial, 1991); King y Stansfield, *A Dictionary of Genetics* (Oxford University Press, 4ª ed. 1990); *Stedman's Medical Dictionary* (Lippincott Williams & Wilkins, 27ª ed. 2000); y *Hawley's Condensed Chemical Dictionary* (John Wiley & Sons, 13ª ed. 1997). Tal como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos y expresiones tienen los significados que se les atribuye a no ser que se especifique de otra forma.

Los términos "intrón" o "secuencia intrónica", tal como se utiliza en el presente documento, se refieren a las secuencias de polinucleótidos intermedias dentro de un gen o una porción de un gen presentes en un auto-vector que están situadas aguas arriba o entre "exones", secuencias de polinucleótidos que están retenidas durante el procesamiento de ARN y que generalmente codifican un polipéptido. Los intrones no funcionan en la codificación de la síntesis de proteína y se empalman desde un ARN antes de su traducción en un polipéptido.

"Potenciador" se refiere a regiones de polinucleótido que actúan en cis- de aproximadamente 10-300 pares de base que actúan en un promotor para potenciar la transcripción desde dicho promotor. Los potenciadores son relativamente independientes en orientación y posición y se pueden situar 5' o 3' en la unidad de transcripción dentro de los intrones o dentro de la propia secuencia de codificación.

Los términos "vacuna de ADN", "inmunización de ADN" y "terapia de polinucleótido", tal como se utilizan indistintamente en el presente documento se refieren a la administración de un polinucleótido a un sujeto con el fin de modular una respuesta inmune. La "vacuna de ADN" con plásmidos que expresan antígenos microbianos extraños es un método muy conocido para inducir inmunidad antiviral o antibacteriana protectora. Para los fines de la presente invención, la "vacuna de ADN", "inmunización de ADN" o "terapia de polinucleótido" se refiere a la administración de polinucleótidos que codifican uno o más auto-polipéptidos que incluyen uno o más epítopos autoantigénicos asociados con una enfermedad. La "vacuna de ADN" sirve para modular una respuesta inmune en curso para suprimir la destrucción autoinmune para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmune. La modulación de una respuesta inmune en reacción con la "vacuna de ADN" puede incluir linfocitos autorreactivos variables desde una respuesta tipo Th1 hasta la de tipo Th2. La modulación de la respuesta inmune puede tener lugar sistemáticamente o solamente localmente en el órgano diana bajo ataque autoinmune.

"Auto-vector" significa uno o más vector(es) que en conjunto comprenden un polinucleótido ya sea de ADN o ARN que codifica una o más auto-proteína(s), polipéptido(s), péptido(s), p.ej., uno o más autoantígenos. Polinucleótidos, tal como se utiliza en el presente documento, es una serie de ácidos desoxirribonucleicos, incluyendo ADN, o ácidos ribonucleicos, incluyendo ARN, y sus derivados, que codifican una auto-proteína, polipéptido o péptido de la presente invención. Se inserta la auto-proteína, el polipéptido o el péptido que codifica la secuencia en el auto-casete de expresión de plásmido apropiado. Una vez insertado el polinucleótido que codifica la auto-proteína, el polipéptido o el péptido en el auto-casete de expresión, se hace referencia al vector como "auto-vector". En el caso en el que se administre un polinucleótido que codifica más de una auto-proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s), un solo auto-vector puede codificar varias auto-proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) distintos. En una realización, el ADN que codifica varias auto-proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) se codifica secuencialmente en un solo auto-plásmido utilizando secuencias internas de reentrada al ribosoma (IRES) u otros métodos para expresar múltiples proteínas desde una sola molécula de ADN. Los auto-vectores de expresión de ADN que codifican la(s) auto-proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) se preparan y se aíslan aplicando las técnicas normalmente disponibles para aislar ADN de plásmido, como pueden ser las distribuidas en el mercado por Qiagen Corporation. Se purifica el DNA para eliminar endotoxina bacteriana para su administración a seres humanos como agente terapéutico. Alternativamente, se codifica cada una de las auto-proteínas, polipéptidos o péptidos en un vector de expresión de ADN por separado.

El término "cadena principal de vector" se refiere a la porción de un vector de plásmido distinto a la secuencia que codifica un auto-antígeno, proteína, polipéptido o péptido.

"Autoantígeno", tal como se emplea en el presente documento se refiere a una molécula endógena, normalmente, una proteína o fragmento de la misma que provoca una respuesta inmune patogénica. Cuando se hace referencia al autoantígeno o epítipo del mismo como "asociado con una enfermedad autoinmune", se entiende que significa que el autoantígeno o epítipo participa en la patofisiología de la enfermedad ya sea induciendo la patofisiología (es decir, asociado con la etiología de la enfermedad) mediando o facilitando un proceso patofisiológico; y/o siendo la diana de un proceso patofisiológico. Por ejemplo, en enfermedad autoinmune, el sistema inmune se dirige de forma aberrante a autoantígenos causando lesiones y disfunción de células y tejidos en los que se expresa o está presente

el auto-antígeno. En condiciones fisiológicas normales, el sistema inmune hospedador ignora los autoantígenos por eliminación, inactivación o falta de activación de las células inmunitarias que tienen capacidad para reconocer el autoantígeno a través de un proceso denominado "tolerancia inmunitaria".

5 Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que el término "epítipo" significa una porción de un polipéptido que tiene una forma o estructura en particular que los linfocitos B o linfocitos T del sistema inmune del animal reconocen. "Epítipo autoantigénico" o "epítipo patogénico" se refiere a un epítipo de un autoantígeno que provoca una respuesta inmune patogénica.

10 "Auto-proteína", "auto-polipéptido", "auto-péptido" o "auto-antígeno" se utilizan en el presente documento indistintamente para referirse a cualquier proteína, polipéptido o péptido, o fragmento o derivado de los mismos, que: está codificado dentro del genoma del animal; se produce o se genera en el animal; puede modificarse después de la traducción en algún momento durante la vida del animal; y está presente en el animal no-fisiológicamente.

15 "Modulación", "que modula" o "que altera una respuesta inmune", tal como se utilizan en el presente documento se refieren a cualquier alteración de una respuesta inmune existente o posible contra auto-moléculas, incluyendo, p.ej., ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos, hidratos de carbono, auto-polipéptidos, complejos de proteína o complejos de ribonucleoproteína, que tiene lugar como resultado de la administración de un polinucleótido que codifica un auto-polipéptido. Dicha modulación incluye cualquier alteración en cuanto a la presencia, capacidad o función de  
20 cualquier célula inmunitaria que participa o es capaz de participar en una respuesta inmune. Las células inmunitarias incluyen linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales, células presentadoras de antígeno profesionales, células presentadoras de antígeno no profesionales, células inflamatorias o cualquier otra célula capaz de participar o influir en la respuesta inmune. "Modulación" incluye cualquier cambio impartido en una respuesta inmune existente, una respuesta inmune en desarrollo, una posible respuesta inmune o la capacidad de  
25 inducir, regular, influir o responder a una respuesta inmune. Modulación incluye cualquier alteración de la expresión y/o función de genes, proteínas y/u otras moléculas en células inmunes como parte de una respuesta inmune.

"Modulación de una respuesta inmune" incluye por ejemplo lo siguiente: eliminación, supresión o secuestro de  
30 células inmunitarias; inducción o generación de células inmunitarias que pueden modular la capacidad funcional de otras células, como linfocitos autorreactivos, células presentadoras de antígeno (CPA) o células inflamatorias; inducción de un estado de falta de respuesta de células inmunitarias (es decir, anergia); aumento, disminución o cambio de la actividad o función de células inmunitarias o su capacidad para ello, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, alteración del patrón de proteínas expresadas por estas células. Entre los ejemplos se incluyen la alteración de la producción y/o secreción de ciertas clases de moléculas como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento,  
35 factores de transcripción, quinasas, moléculas co-estimuladoras u otros receptores de la superficie celular; o cualquier combinación de estos eventos moduladores.

"Sujetos" se referirá a cualquier animal, como por ejemplo un ser humano, un primate no humano, un caballo, una vaca, un perro, un gato, un ratón, una rata, una cobaya o un conejo.

40 "Tratar", "tratamiento" o "terapia" de una enfermedad o trastorno significará la ralentización, detención o reversión del progreso de la enfermedad, tal como lo evidencia una disminución, cese o eliminación de cualquiera de los síntomas clínicos o de diagnóstico, a través de la administración de un polinucleótido que codifica un auto-polipéptido, ya sea en solitario o combinado con otro compuesto, tal como se describe en el presente documento. "Tratar", "tratamiento"  
45 o "terapia" significa también una disminución de la gravedad de los síntomas en una enfermedad o trastorno agudo o crónico o una disminución de la tasa de recaída, como por ejemplo en el caso del curso de una enfermedad autoinmune o recidivante o una disminución de la inflamación en el caso de un aspecto inflamatorio de una enfermedad autoinmune. En algunas realizaciones, el tratamiento de una enfermedad significa revertir, detener o paliar de la progresión de la enfermedad, idealmente hasta el punto de eliminar la propia enfermedad. Tal como se  
50 utiliza en el presente documento, mejorar una enfermedad y tratar una enfermedad son equivalentes.

"Prevenir", "profilaxis" o "prevención" de una enfermedad o trastorno, tal como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a la administración de un polinucleótido que codifica un auto-polipéptido, ya sea en solitario o combinado con otro compuesto, tal como se describe en el presente documento, para evitar que tenga lugar o se  
55 inicie una enfermedad o trastorno o algunos o todos los síntomas de una enfermedad o trastorno o reducir la probabilidad de que se inicie una enfermedad o trastorno.

Una "cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz" de un auto-vector se refiere a una cantidad del auto-vector que es suficiente para tratar o prevenir la enfermedad como, por ejemplo, mejorar o eliminar los síntomas y/o causas de  
60 la enfermedad. Por ejemplo, las cantidades terapéuticamente eficaces entran dentro de un amplio intervalo y se determinan a través de ensayos clínicos y, para un paciente en particular, se determinan sobre la base de factores que el profesional clínico especializado conoce, incluyendo, p.ej., la gravedad de la enfermedad, el peso del paciente, la edad y otros factores.

65 La expresión "desprovisto de endotoxinas" se refiere a un vector o composición de la invención sustancialmente desprovisto de endotoxina, p.ej., tiene una contaminación de endotoxinas por debajo de los niveles detectables. Un

vector o composición que está desprovisto de endotoxina puede describirse por lo que respecta a la concentración umbral de endotoxina detectable, según se mide utilizando un ensayo de coágulo de gel de lisado de amebocitos de limulus (LAL) conocido en la técnica. Por lo que respecta a la concentración de umbral, un vector o composición está desprovisto de endotoxina si la cantidad de endotoxina contaminante está por debajo del límite de detección (p.ej., 5 menos de aproximadamente 0,10 unidades de endotoxina/ml o UE/ml). En la medida en que se pueda detectar la endotoxina, un vector o composición está sustancialmente desprovisto de endotoxina si la cantidad de endotoxina contaminante está por debajo de aproximadamente 2,5 UE/ml. Existen numerosas empresas que ofrecen servicios de pruebas disponibles en el mercado para determinar el nivel de endotoxina en una preparación, entre las que se incluyen p.ej., Nelson Laboratories, Salt Lake City, UT; Boehringer Ingelheim, Austria; MO BIO Laboratories, 10 Carlsbad, CA; NovaTX, Conroe, TX; y Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA. Asimismo, los kits de detección de coágulo de gel LAL también están disponibles para su adquisición por ejemplo distribuidos por Lonza, en la web internacional lonza.com y Charles River Laboratories, en la web internacional criver.com.

### 15 III. Descripción de las realizaciones

#### A. Auto-vector BHT-3021

En algunas realizaciones, la presente invención utiliza un auto-vector que tiene una secuencia de ácidos nucleicos idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 1 (BHT-3021). El auto-vector BHT-3021 comprende una cadena principal de vector de expresión BHT-1 y un polinucleótido que codifica proinsulina humana. El auto-vector BHT-3021 comprende también un promotor de CMV, que conduce la expresión de proinsulina humana; las secuencias de poliA y terminación de hormona del crecimiento bovino; y un origen de replicación de pUC y un gen de resistencia a 20 kanamicina (Kanr), que se encargan de la propagación y selección del vector respectivamente.

La cadena principal del vector BHT-3021 es un vector pVAX1 modificado en el que están mutados uno o más dinucleótidos CpG de la fórmula 5'-purina-pirimidina-C-G-pirimidina-pirimidina-3' por sustitución de la citosina del dinucleótido CpG con un nucleótido no-citosina. El vector pVAX1 es conocido en la técnica y está distribuido en el mercado por Invitrogen (Carlsbad, CA). En una realización ilustrativa, el vector pVAX1 modificado tiene las siguientes sustituciones de citosina por no-citosina dentro del motivo CpG: citosina por guanina en los nucleótidos 784, 1161, 1218 y 1966; citosina por adenina en los nucleótidos 1264, 1337, 1829, 1874, 1940 y 1997; y citosina por 30 timina en los nucleótidos 1158, 1963 y 1987; con las mutaciones adicionales citosina por guanina en los nucleótidos 1831, 1876, 1942 y 1999, (Las designaciones numéricas del nucleótido tal como se han expuesto corresponden al sistema de numeración para pVAX1 proporcionado por Invitrogen).

La invención contempla, vectores BHT-3021 en los que se ha añadido, suprimido o sustituido nucleótidos que no cambian la función del vector BHT-3021, p.ej., para expresar proinsulina e inhibir la respuesta autoinmune. Por consiguiente, la invención contempla el uso de un auto-vector que comprende un polinucleótido que codifica proinsulina humana que comparte al menos de aproximadamente 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de la 35 secuencia de ácidos nucleicos con la SEQ ID NO: 1, tal como se mide aplicando un algoritmo conocido en la técnica, p.ej., BLAST o ALIGN, ajustado con parámetros normales. La identidad de secuencia puede determinarse p.ej., con respecto a la longitud total de la cadena principal de BHT, la longitud total del autoantígeno de proinsulina o la longitud total del vector BHT-3021,

Las técnicas para la construcción de vectores y transfección de células son muy conocidas en la técnica y las 45 personas especializadas en la materia estarán familiarizadas con el material de las fuentes convencionales en el que se describen condiciones y procedimientos específicos. El auto-vector BHT-3021 se prepara y se aísla empleando técnicas comúnmente disponibles para el aislamiento de ácidos nucleicos. Se purifica el vector para que esté desprovisto de endotoxinas bacterianas para su administración a seres humanos como agente terapéutico.

Los auto-vectores modificados de la presente invención se pueden formular como sales de polinucleótido para su 50 uso como productos farmacéuticos. Las sales de polinucleótido se pueden preparar con bases orgánicas o inorgánicas no tóxicas. Entre las sales básicas inorgánicas se incluyen sodio, potasio, zinc, calcio, aluminio, magnesio, etc., Las bases no tóxicas orgánicas incluyen sales de aminos primarias, secundarias y terciarias, etc. Dichas sales de auto-polinucleótido de ADN pueden formularse en forma liofilizada para su reconstitución antes de la administración, como por ejemplo como una solución estéril acuosa o salina. Alternativamente, se pueden 55 formular las sales de auto-polinucleótido de ADN en soluciones, suspensiones o emulsiones que implican vehículos de base acuosa u oleosa para su administración. En una realización, se liofiliza el ADN en solución salina tamponada con fosfato con niveles fisiológicos de calcio (0,9 mM) y se reconstituye después con agua estéril antes de su administración. Alternativamente, se formula el ADN en soluciones que contienen cantidades más altas de Ca<sup>++</sup>, entre 1 mM y 2 mM. El ADN se puede formular también en ausencia de especies de iones específicos.

#### B. Composiciones

Se describe asimismo una composición que comprende un auto-vector de SEQ ID NO: 1 (BHT-3021). La 65 composición se puede formular en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende calcio en una concentración aproximadamente igual a los niveles fisiológicos (p.ej.,

aproximadamente 0,9 mM). En algunos casos, la composición farmacéutica comprende además un catión divalente en una concentración por encima de los niveles fisiológicos. En algunos casos, el catión divalente es calcio. En algunos casos, el auto-vector se formula con calcio en una concentración comprendida entre 0,9 mM (1x) y aproximadamente 2 M; en algunos casos, la concentración de calcio está comprendida entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 8,1 mM (9x); en algunos casos, la concentración de calcio está comprendida entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 5,4 mM (6x). En algunos casos, la composición farmacéutica está desprovista de endotoxina.

En algunos casos, el auto-vector se formula con uno o más cationes divalentes a una concentración total por encima de los niveles fisiológicos para inyección en un animal para que los linfocitos T hospedadores del animal lo capten. En algunos casos, se pueden utilizar uno o más cationes divalentes fisiológicamente aceptables, p.ej.,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  u otros y mezclas de los mismos, en algunos casos, pueden estar presentes magnesio, calcio o mezclas de los mismos extracelularmente en aproximadamente 1,5 mM y 1 mM, respectivamente. Se pueden utilizar mezclas de dos o más cationes divalentes en combinaciones que equivalente a las concentraciones totales de aproximadamente 0,9, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 45, 65, 90, 130, 170, 220, 280, 320, 350, 500, 750, 1000, 1500 mM, etc. y hasta aproximadamente 2M.

En cierto caso preferente, el contraión puede incluir  $\text{PO}_4$ , Cl, OH,  $\text{CO}_2$  o mezclas de los mismos. En otros casos, las formulaciones pueden hacer que ADN forme partículas o precipitados con distribuciones del tamaño en las que el tamaño medio, o el 80 % de las partículas está por encima de aproximadamente 0,1, 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 8, 15, 20, 35, 50, 70 o 100 micrómetros. Se puede evaluar el tamaño de dichas partículas por centrifugación, análisis de citometría de flujo, yoduro de propidio o un marcado por tinción similar o dispersión dinámica de la luz.

Es posible incorporar una composición farmacéutica que comprende BHT-3021 en diversas formulaciones para administración terapéutica. Más en particular, es posible formular una combinación, tal como se describe en el presente documento, en composiciones farmacéuticas, en combinación o por separado, formulándolas con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, grajeas, geles, suspensiones espesas, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores y aerosoles. Como tal, la administración de BHT-3021 se puede conseguir de diversas maneras, incluyendo administración oral, bucal, parental, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, transdérmica, intra-rectal, intra-vaginal, etc. Por otra parte, el compuesto puede administrarse de manera local, en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o prolongada.

Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Ed., University of the Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins (2005). Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden fabricarse de una manera conocida entre las personas especializadas en la materia, es decir, a través de procesos de mezclado convencional, disolución, granulación, fabricación de grajeas, levigación, emulsificación, encapsulación, inmovilización o liofilización. Los métodos y excipientes expuestos a continuación son simplemente ilustrativos sin ser exhaustivos en absoluto.

En algunas realizaciones, el auto-vector puede formularse para administración intramuscular, subcutánea o parenteral, por inyección, p.ej., inyección de bolo o infusión continua. Para inyección, es posible formular BHT 3021 en preparaciones disolviéndolas, suspendiéndolas o emulsionándolas en un disolvente acuoso o no acuoso, como por ejemplo aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácido alifático sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilen glicol; y, si se desea, con aditivos convencionales, como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes. En algunas realizaciones, se puede formular el auto-vector en soluciones acuosas, como por ejemplo, en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hanks, solución de Ringer o solución de tampón salino fisiológico. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en formas de dosis unitarias, p.ej., en ampollas o envases multi-dosis, añadiendo un conservante. Las composiciones pueden adoptar la forma de suspensión, solución o emulsión en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Para administración oral, puede formularse fácilmente BHT-3021 combinando el agente de inhibición con vehículos farmacéuticamente aceptables perfectamente conocidos en la especialidad. Dichos vehículos permiten que se puedan formular los compuestos como comprimidos, píldoras, grajeas, cápsulas, emulsiones, suspensiones lipófilas e hidrófilas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones, y similares, para que el paciente que se esté tratando los ingiera por vía oral. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mezclando los compuestos con un excipiente sólido, opcionalmente, moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla del granulado, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grajeas. Entre los excipientes adecuados se incluyen en particular cargas como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, carboximetil

celulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes como una polivinil pirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal de los mismos como alginato sódico.

### C. Métodos de administración

5 El auto-vector puede administrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el auto-vector BHT-3021 puede administrarse en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que comprende calcio en una concentración aproximadamente igual a los niveles fisiológicos (p.ej., aproximadamente 0,9 mM). En algunas realizaciones, se administra el auto-vector BHT-3021 en un vehículo o excipiente farmacéuticamente  
10 aceptable que comprende un catión divalente en una concentración por encima de los niveles fisiológicos. En algunas realizaciones, el catión divalente es calcio. En algunas realizaciones, el calcio está en una concentración por encima de aproximadamente 2 mM; en algunas realizaciones, el calcio se encuentra en una concentración de aproximadamente 5,4 mM. En algunas realizaciones, el auto-vector BHT-3021 está desprovisto de endotoxina. En algunas realizaciones, el auto-vector BHT-3021 se administra intramuscularmente.

15 Existe una amplia variedad de métodos para administrar el polinucleótido a los sujetos, tal como se definen en el presente documento. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica un auto-polipéptido puede formularse con polímeros catiónicos incluyendo liposomas catiónicos. Otros liposomas representan también medios eficaces para formular y administrar el auto-polinucleótido. Alternativamente, se puede incorporar el ADN en un vector viral, partículas virales  
20 o bacterias para su administración farmacológica. Los vectores virales pueden ser competentes para la infección, atenuados (con mutaciones que reducen la capacidad de inducir enfermedad) o deficientes en replicación. Los métodos en los que se utiliza ADN para prevenir el depósito, acumulación o actividad de auto-proteínas patógenas pueden potenciarse mediante el uso de vectores virales u otros sistemas de administración que aumentan las respuestas humorales contra la auto-proteína codificada. En otras realizaciones, el ADN puede conjugarse con  
25 soportes sólidos incluyendo partículas de oro, soportes a base de polisacárido u otras partículas o perlas que se puedan inyectar, inhalar o administrar por bombardeo de partículas (administración balística). Los métodos para administrar preparaciones de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica.

30 Se ha desarrollado una serie de sistemas a base de virus para transferirlos a células de mamífero. Por ejemplo, se han descrito sistemas retrovirales. Asimismo, se ha descrito una serie de vectores de adenovirus. Se han desarrollado también sistemas de vector virus adeno-asociado (AAV) para administración de ácido nucleico. Los vectores AAV pueden construirse fácilmente a través de técnicas conocidas en la especialidad.

35 El polinucleótido de la presente invención puede administrarse también sin vector viral. Por ejemplo, se puede empaquetar en liposomas la molécula antes de su administración al sujeto. La encapsulación de lípidos se lleva a cabo generalmente utilizando liposomas que son capaces de ocultar establemente o atrapar y retener ácido nucleico. Para una revisión sobre el uso de liposomas como vehículos para la administración de ácidos nucleicos.

40 Las cantidades terapéuticamente eficaces del auto-vector se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1 g. Una cantidad terapéutica de auto-vector se encuentra en el intervalo de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 10 mg. Por ejemplo, una cantidad terapéutica de auto-vector se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,025 mg a 6 mg. En ciertas realizaciones, el auto-vector se administra mensualmente durante 6-12 meses y cada 3-12 meses como dosis de mantenimiento. Es posible desarrollar regímenes de tratamiento alternativos y pueden oscilar entre diariamente a semanalmente, o  
45 mensualmente o anualmente, a una administración de una vez dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, el auto-polipéptido o polipéptidos que se administren, así como otros factores que pueda considerar el médico encargado del tratamiento habitual.

50 En una realización, se administra el polinucleótido por inyección intramuscular. En otras variaciones, se administra el polinucleótido por vía intranasal, oral, subcutánea, intradérmica, intravenosa, mucosa, se presiona sobre la piel o se fija en partículas de oro que se administran a través de la dermis (véase, p.ej., WO 97/46253). Alternativamente, puede administrarse ácido nucleico en las células de la piel por aplicación tópica con o sin liposomas o lípidos cargados (véase, p.ej., la patente estadounidense No. 6.087.341). Otra alternativa más es la administración del ácido nucleico como agente inhalado. El polinucleótido se formula en solución salina tamponada  
55 con fosfato con niveles fisiológicos de calcio (0,9 mM). Alternativamente, se formula el polinucleótido en soluciones que contienen cantidades más altas de  $Ca^{++}$ , p.ej. entre 1 mM y 2M. Se puede formular el polinucleótido con otros cationes como zinc, aluminio y otros. Alternativamente, o además, se puede formular el polinucleótido con un polímero catiónico, compuestos de formación de liposoma catiónicos o en liposomas no catiónicos. Entre los ejemplos de liposomas catiónicos para la administración de ADN se incluyen liposomas generados mediante el uso  
60 de 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio) propano (DOTAP) y otras moléculas similares.

Antes de la administración del polinucleótido, se puede acondicionar previamente el sitio de administración por tratamiento con bupivacaína, cardiotoxina u otro agente que pueda potenciar la administración posterior del polinucleótido. Dichos regímenes de acondicionamiento previo se administran 12 a 96 horas antes de la administración del polinucleótido terapéutico; más frecuentemente, 24 a 48 horas antes de la administración del

polinucleótido terapéutico. Alternativamente, no se aplica ningún tratamiento de acondicionamiento previo antes de la terapia con el polinucleótido.

El auto-vector puede administrarse en combinación con otras sustancias, como por ejemplo agentes farmacológicos, adyuvantes, citoquinas o vectores que codifican citoquinas. Asimismo, para evitar la posibilidad de provocar respuestas no deseadas anti-auto-citoquina cuando se utiliza la co-administración de citoquina, es posible utilizar agentes inmunomoduladores químicos, como por ejemplo la forma activa de vitamina D3. En este sentido, se ha demostrado que 1,25-dihidroxi vitamina D3 ejerce un efecto adyuvante a través de la inmunización de ADN intramuscular.

## Ejemplos

En la diabetes de Tipo 1 existe una intensa respuesta inflamatoria que destruye las células beta en los islotes de Langerhans en el páncreas, el sitio en el que se produce y se libera la insulina. La proinsulina es una diana principal de la respuesta inmune adaptativa en diabetes de tipo 1 (DT1). La presente invención proporciona un plásmido de ADN que codifica proinsulina obtenido por ingeniería genética (BHT-3021) que preserva la función de células beta en pacientes DT1 a través de la reducción de linfocitos T CD8 específicos de insulina. Los autores de la invención estudiaron 80 pacientes de más de 18 años de edad que habían sido diagnosticadas de DT1 en los últimos cinco años. Se asignó aleatoriamente a los pacientes 2:1 para recibir inyecciones intramusculares de BHT 3021 o BHT-placebo, semanalmente durante 12 semanas, a continuación, se llevó un seguimiento en cuanto a las respuestas de seguridad y respuestas inmunes con ocultamiento. Se evaluaron cuatro niveles de dosis de BHT-3021: 0,3 mg, 1,0 mg, 3,0 mg y 6,0 mg. Se utilizó péptido C tanto como una medición de la eficacia exploratoria como medición de la seguridad. Se evaluaron las frecuencias de linfocitos T CD8 específicos de islote con multímeros de moléculas HLC Clase I monoméricas cargadas con péptidos de antígenos pancreáticos y no relacionados. No se observó ningún efecto adverso grave relacionado con BHT-3021. Los niveles de péptido C mejoraron en relación con el placebo en todas las dosis, a 1 mg en el momento temporal de la semana 15 (+19,5 % BHT-3021 frente a - 8,8 % BHT-placebo,  $p < 0,026$ ). Los linfocitos T CD8 reactivos con proinsulina, pero no los linfocitos T contra islotes no relacionados o moléculas extrañas, descendieron en la ramificación BHT-3021 ( $p < 0,006$ ). No se observó ningún cambio significativo en la producción de interferón- $\gamma$ , IL-4 o IL-10 en linfocitos T CD4 T. Por tanto, se demostró que un plásmido que codifica proinsulina reduce la frecuencia de linfocitos T CD8 reactivos con proinsulina, al mismo tiempo que preserva péptido C en el curso de la dosificación.

Los ejemplos que se exponen a continuación ilustran, sin limitar, la invención reivindicada.

## MÉTODOS

**Construcción de plásmido.** BHT-3021 es un vector de expresión de plásmido bacteriano de 3,3 Kb que contiene las secuencias codificantes para el gen de proinsulina humana (hINS). Se obtuvieron por ingeniería genética importantes características funcionales y de control de BHT-3021 en la construcción final, incluyendo el promotor/potenciador de gen inmediato-temprano de citomegalovirus humano (CMV), la señal de poliadenilación de gen de hormona de crecimiento bovino, el gen de resistencia a kanamicina y origen de replicación de pUC para la propagación del vector en *E. coli*. Se modificó la cadena principal de BHT-3021 para disminuir el número de secuencias CpG inmunoestimuladoras. A continuación, se sustituyeron todos los motivos CpG no esenciales con secuencias inmunomoduladoras, conocidas como secuencias GpG (13). En la Figura 1 se muestran las características estructurales principales de BHT-3021. Se formuló BHT-3021 en solución salina tamponada con fosfato como solución estéril para inyección intramuscular (IM), a una concentración de 2,0 mg DNA/ml. Los pacientes de placebo recibieron solución salina tamponada con fosfato.

**Participación y reclutamiento.** Se llevó a cabo el estudio con consentimiento informado por parte de todos los sujetos y siguiendo los protocolos aprobados por los Consejos de Revisión Institucional (IRB) de cada institución. Antes de iniciar el ensayo clínico, se presentó una Solicitud de investigación de Fármacos Nuevos (IND) a la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA), y fue aceptado por dicha institución y se obtuvo la aprobación del Comité Asesor de ADN Recombinante de los NIH. Se seleccionó un total de 144 pacientes para el estudio. Se asignó aleatoriamente 80 de los pacientes (48 en las cohortes de escalada de dosis y 32 pacientes en la cohorte de expansión).

Los **Criterios de inclusión fueron** 1) Diagnóstico de diabetes de tipo 1a basándose en los criterios de la Asociación Americana de la Diabetes (ADA); 2) entre 18 y 40 años de edad; 3) diagnóstico de DT1 en los últimos 5 años; 4) péptido C en ayunas detectable; 5) aumento de péptido C durante la prueba de tolerancia a la comida mixta (MITT) con un valor estimulado mínimo de  $\geq 0,2$  pmoles/ml; 6) presencia de anticuerpos para al menos uno de los siguientes antígenos: insulina, GAD65 o IA2. En caso de ser solamente positivo a anticuerpo de la insulina, debe haberse completado la determinación en el curso de 2 semanas desde el inicio de insulina; 7) acuerdo de tratamiento intensivo de la diabetes con una meta de HbA<sub>1c</sub> de  $< 7,0$  %; 8) en caso de ser mujeres, las pacientes deben (a) haberse esterilizado quirúrgicamente, (b) haber pasado la menopausia o (c) si tienen posibilidad de reproducirse, aceptar un control de la natalidad médicamente aceptable (p.ej., anticonceptivo hormonal femenino, métodos de barrera o esterilización) hasta los 3 meses después de que se haya completado cualquier período de

tratamiento; 9) en caso de ser hombres y tener capacidad reproductora, los pacientes deben aceptar el uso de un control de la natalidad médicamente aceptable hasta los 3 meses después de que se haya completado cualquier período de tratamiento, a no ser que la compañera haya pasado la menopausia o esté quirúrgicamente esterilizada; y 10) creatinina en suero  $\leq 1,5$  x límite por encima del normal (ULN); 11) AST < dos veces por encima del límite normal; 12) glóbulos blancos (WBC)  $\geq 3 \times 10^9/l$ ; plaquetas  $\geq 100 \times 10^9/l$ ; y hemoglobina  $\geq 10,0$  g/dl. Se excluyó a los pacientes cuando 1) no pudieron o no quisieron cumplir con los requerimientos del protocolo de estudio; 2) Índice de Masa Corporal (IMC)  $> 30$  kg/m<sup>2</sup>; 3) control de azúcar en sangre inestable, definido como uno o más episodios de hipoglucemia grave (hipoglucemia que requirió la asistencia de otra persona) en el curso de 30 días antes del reclutamiento; 4) terapia inmune anterior para DT1; 5) administración de un agente experimental para DT1 en cualquier momento, o uso de un dispositivo experimental para DT1 en el curso de 30 días antes de la selección, a no ser que fuera aprobado por el monitor médico; 6) historia de un trasplante de cualquier órgano, incluye trasplante de célula de islote; 7) trastorno de deficiencia inmune o autoinmune activa distinta a DT1 (p.ej., sarcoidosis, artritis reumatoide), a no ser que fuera aprobado por el monitor médico; 8) excreción urinaria de albúmina a las 24 horas  $> 300$  mg en la selección; 9) retinopatía sin tratar o no controlada en la selección; 10) bilirrubina en suero  $> ULN$ , excepto los sujetos cuyos valores anormales fueron atribuidos a cualquier estado benigno estable (como síndrome de Gilbert); 11) hormona estimulante de (TSH) fuera del intervalo normal en la selección, excepto para los pacientes con dosis estables de terapia de reemplazo de hormona tiroideas; 12) estado VIH positivo conocido o pruebas de una conducta de alto riesgo; 13) infección de hepatitis B activa o hepatitis C activa; y 14) mujer embarazada o lactante.

**Diseño de ensayo.** En la Figura 2 se muestra el diseño del estudio total. Se seleccionaron los pacientes candidato 6 semanas antes de la asignación aleatoria. Se asignó aleatoriamente a los pacientes BHT-3021 o BHT-placebo en una relación 2:1 y entraron en el Período de Tratamiento con ocultamiento cuando se administró BHT-3021 o BHT-placebo por vía intramuscular (IM) semanalmente durante 12 semanas (semanas 0 a 11). Cuatro semanas después de la última dosis de BHT-3021 o BHT-placebo (semana 15), se sometió a los pacientes a una evaluación completa en cuanto a la seguridad, función de células beta y respuestas anti-insulina. Se llevó un seguimiento de los pacientes en cuanto a la seguridad y la respuesta inmune con ocultamiento hasta 12 meses después de la primera dosis de BHT-3021 o BHT-placebo (período de evaluación con ocultamiento). A continuación, cada asignación de tratamiento del paciente fue sin ocultamiento. Los pacientes que recibieron BHT-3021 entraron en un período de seguimiento a largo plazo de 12 meses (LTFU), durante el cual fueron vigilados en cuanto a eventos adversos retardados, la función pancreática y la respuesta inmune. Los pacientes que recibieron BHT-placebo fueron candidatos para entrecruzamiento para recibir 12 semanas de tratamiento con BHT-3021 sin enmascaramiento.

Se reclutó a 80 pacientes en el estudio. Se evaluaron cuatro niveles de dosis de BHT-3021: 0,3 mg, 1,0 mg, 3,0 mg y 6,0 mg. Se reclutaron 9 pacientes inicialmente en una cohorte sin enmascaramiento. Una vez completada la fase de averiguación de la dosis del estudio (Fase de escalada de dosis) se enroló a otros pacientes más para ampliar una o más de las cohortes de dosis para obtener datos sobre la seguridad y la eficacia adicionales (Fase de expansión).

**Criterios de valoración clínicos primarios y secundarios.** El objetivo principal fue evaluar la seguridad de BHT-3021 administrado como inyecciones semanales durante 12 semanas. El objetivo secundario fue evaluar el efecto de BHT-3021 en las respuestas de anticuerpo y linfocitos T para antígenos relacionados con la diabetes (insulina, GAD65 y IA2); describir los cambios en la función de células  $\beta$  pancreáticas tras el tratamiento con BHT-3021; y describir los cambios en las necesidades de insulina y los niveles de glucosa en sangre tras el tratamiento con BHT-3021,

**Criterios de evaluación primarios.** Seguridad y seguimiento del paciente. Los parámetros de seguridad evaluados en el estudio fueron los eventos adversos y los eventos adversos graves; exámenes físicos; signos vitales; pruebas clínicas de laboratorio (hematología, química, análisis de orina); examen oftalmológico; ECG 12 derivaciones; proteína en la orina a las 24 horas; niveles de péptido C estimulados; prueba de embarazo; y mediciones de la glucosa (glucosa en sangre nocturna y auto-controlada).

**Criterios de evaluación secundarios.** Se utilizó péptido C tanto como medición de la eficacia exploratoria como para la medición de la seguridad para asegurar que no se observara ningún descenso drástico de la función pancreática con el tratamiento con BHT-3021. Los marcadores del control metabólico incluyeron HbA<sub>1c</sub> y glucosa en plasma por ayuno. Se evaluó la dosis de insulina diaria total en el momento basal y durante el estudio. Los parámetros fármaco-dinámicos evaluados en el estudio fueron a) respuesta inmune a antígenos pancreáticos, según se midió por los anticuerpos a insulina, GAD65 y IA2, así como las respuestas de linfocitos T a antígenos pancreáticos; b) marcadores en sangre de activación inmune.

**Anticuerpos para antígenos pancreáticos.** Se realizaron radio inmunoensayos en muestras en el momento basal para determinar la respuesta inmune inicial a insulina. El análisis en los subsiguientes puntos temporales sirvió para evaluar cualquier cambio en la respuesta que pudiera derivarse del tratamiento de BHT-3021. El análisis de la medición de la reactividad para GAD65 y IA2 sirvió también como indicación general de las respuestas autoinmunes a antígenos de islote. Se midieron los anticuerpos para GAD65, IA2 e insulina (IAA) en el momento de la selección y formaron parte de los criterios de entrada. Los métodos para detectar anticuerpos asociados a DT1 se han descrito anteriormente (3,26).

Puntos cuánticos de multímeros de HLA-péptido para medir la frecuencia de linfocitos T CD8 específicos de antígeno. Se prepararon complejos HLA-A2-péptido multiméricos tal como se ha descrito anteriormente (21). Brevemente, se solubilizaron HLA-A2 recombinante y microglobulina  $\beta_2$  humana en urea y se inyectaron junto con cada uno de los péptidos sintéticos en un tampón de replegamiento que consistió en 100 mmol/l Tris (pH 8,0), 400 mMol/l arginina, 2 mmol/l EDTA, 5 mmol/l glutatona reducida y 0,5 mmol/l glutatona oxidada. Se biotinilaron complejos replegados por incubación durante 2 h a 30 °C con enzima BirA (Avidity, Denver, CO). Se purificaron los complejos biotinilados por filtración de gel en una columna superdex 75 (Amersham Pharmacia Biotech). Se produjeron complejos HLA-péptido multiméricos por adición de puntos cuánticos conjugados con estreptavidina (21) (Qdots; Invitrogen) para conseguir una relación 1:20 estreptavidina-Qdot/ HLA clase I biotinilado. Se utilizaron Qdot-585, -605, -655, -705 y -800. Se tiñeron las muestras de pacientes HLA-A2/A3/B7 positivos con una mezcla que contenía nueve epítomos asociados a diabetes, un epítomo HLA-A2 expresado en HLA-A2 y una mezcla de antígenos virales (Tabla 6).

**Tinción de célula con complejos multímeros etiquetados con Qdot.** Se tiñeron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) ( $2 \times 10^6$ ) simultáneamente con multímeros etiquetados con Qdot (0,1  $\mu$ g de cada multímero específico) en 60  $\mu$ l de PBS suplementado con 0,5 % BSA e incubado durante 15 min a 37 °C. A continuación, se agregaron 10  $\mu$ l de anticuerpos anti-CD8 etiquetados con alofocianina (CPA) (reserva 1:10) y 10  $\mu$ l anti-CD4, -CD14, -CD16, -CD20 y -CD40 etiquetados con de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton Dickinson) durante 30 min a 4 °C. Después de lavar dos veces, se resuspendieron las células en PBS/0,5 % BSA que contenían 7-aminoactinomicina D (7-AAD; eBioscience) para excluir células muertas y se analizaron utilizando LSR II (Becton Dickinson).

**Datos de análisis y métodos estadísticos.** Se tiñeron los pacientes con HLA Clase I tipo A2, A3 o B7 con los correspondientes multímeros. Se registraron los datos como porcentajes de linfocitos T CD8 que fueron específicos para cada uno de los multímeros (o se unieron a ellos). Se calcularon los cambios de los porcentajes de linfocitos T específicos de antígeno sustrayendo los valores basales de cada punto temporal subsiguiente.

Se llevó a cabo el análisis de la respuesta inmune específica de islote evaluando las respuestas específicas de BHT-3021 por separado de las respuestas no específicas para este agente. Por ejemplo, se calcularon para cada uno de los pacientes los cambios específicos de vacuna para cada multímero apropiado (Insulina B10-18, PPI 76-84 y PPI 79-88). Se calculó la evaluación de las respuestas no vacunales específicas de islote para los péptidos PPI 15-24, PPI 4-13, GAD65, IA2, IGRP y pplAPP. En este caso, un solo paciente pudo tener hasta 6 puntos de datos diferentes. Para los epítomos de islote en el método combinatorio de puntos cuánticos específicamente, se determinó el coeficiente de variación a 10,8 % (HLA-A2 péptido), 34,9 % (mezcla de virus); 15,9 % (InsB), 0,0 % (IA-2); 0,0 % (IGRP), 6,3 % (PPI), 4,5 % (GAD65) y 6,9 % (pplAPP)<sup>21</sup>.

Se calcularon los cambios en CTL sustrayendo los valores basales de los valores a la semana 15. Se llevó a cabo el análisis en todos los pacientes tratados (todas las dosis) y de placebo positivos para HLA-A2, -A3 y/o -B7. Se llevaron a cabo las estadísticas utilizando un análisis de regresión lineal.

**ELISpot.** Se llevaron a cabo los ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos en los primeros 48 pacientes reclutados en la fase de escalada de dosis del estudio. Se llevaron a cabo los ELISpot en el Barbara Davis Center for Childhood Diabetes (Aurora, CO). Los datos de ELISpot de estos 48 pacientes no se presentan debido a la baja relación entre la señal y el ruido. Se incluyeron los últimos 32 pacientes en la fase de expansión y se realizaron los ELISpot en estos individuos en el CRO, Cellular Technologies Limited (CTL). Se prepararon PBMC de pacientes de Australia/Nueva Zelanda en el CRO, Cancer Trials Australia, Melbourne. Se prepararon PBMC de pacientes estadounidenses en el CTL. Se enviaron PBMC congeladas en volumen desde el CTA al CTL, donde fueron realizados los ensayos. Se evaluaron las respuestas inmunes específicas de antígeno IL-10 e IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ). Se midió la respuesta autoinmune a insulina y GAD65 como indicación de la respuesta autoinmune en curso a antígenos de islote. Se utilizó la respuesta inmune a un panel de péptidos virales (CEF) para llevar a un seguimiento de las respuestas inmunes CD8 irrelevantes (no asociadas a DT1). La respuesta inmune a antígeno de mosquito sirvió para llevar el seguimiento de las respuestas de linfocitos T CD4 específicas de antígeno, pero no relacionadas con diabetes.

**Fase cruzada.** Los sujetos que recibieron BHT-placebo fueron candidatos para el entrecruzamiento para recibir 12 semanas de tratamiento con BHT-3021 sin enmascaramiento. La dosis de BHT-3021 durante el período del período cruzado sin enmascaramiento fue la "mejor dosis" basada en la evaluación de los datos disponibles de seguridad respuesta inmune y eficacia. La "mejor dosis" se definió como la dosis o las dosis ya administradas en el ensayo clínico aprobadas por el Comité de Supervisión de Seguridad de Datos (DSMB) en cuanto a su perfil de seguridad aceptable y que el Promotor determinó en el momento de entrecruzamiento que presentaban el mejor equilibrio entre seguridad, actividad biológica (respuesta inmune) y/o eficacia. Se pudo designar como "mejor dosis" más de una dosis, siempre y cuando todas las dosis presentaran perfiles de seguridad y eficacia comparables. Se evaluó completamente a los sujetos cruzados al final de cada período de dosificación (semana 15), tras lo cual entraron en el período de evaluación sin enmascaramiento, que se prolongó 12 meses tras la primera dosis de BHT-3021. Finalmente, los pacientes entraron en el período de seguimiento de 12 meses de duración.

## RESULTADOS

Características basales de la población a la que se intenta tratar. En la Tabla 1 se demuestra que las características basales de la población a la que se intenta tratar (ITT) no son significativamente diferentes de las asignadas aleatoriamente al control.

### Criterios de evaluación de la eficacia especificados previamente

**Péptido C.** La secreción de péptido C se considera un importante marcador sustituto para evaluar la secreción pancreática de insulina (18-20). El área bajo la curva de la respuesta de péptido C (en adelante, "péptido C") a la prueba de tolerancia a alimentos mixtos (MMTT) es un método validado para evaluar la secreción de insulina endógena y los pacientes con DT1 tienen respuestas de péptido C a MMTT en el momento en el que la glucosa intravenosa y las respuestas de glucagón están ausentes (19,20).

Se administró una dosis de BHT-3021 (Fig. 1) por vía intramuscular durante 12 semanas a personas con diabetes de tipo 1 que tenían péptido C residual en el momento de la selección (péptido C > 33 pmoles/l) (Fig. 2). El grupo de placebo recibió una dosis equivalente de solución salina. Transcurridas 15 semanas con una dosis de 1,0 mg BHT-3021 frente a BHT-placebo, la media del porcentaje de cambio desde el valor basal en péptido C fue +19,5 % (-1,95 % por debajo del nivel de confianza, 41,0 % por encima del nivel de confianza), frente a -8,8 % para el placebo (-25,34 % por debajo del nivel de confianza, +7,66 por encima del nivel de confianza),  $p < 0,026$  (Fig. 3, fig. 5A). Los sujetos en las ramificaciones de 1,0 y 3,0 mg presentaron niveles de péptido C por encima de los valores en el momento de selección en la semana 15. La Figura 5B presenta el porcentaje del cambio desde el valor basal para el péptido C en gráficos de dispersión de todas las dosis y de placebo en las 15 semanas. En cambio, el grupo de placebo, que comenzó con el valor más alto, presentó un descenso pronunciado en el péptido C a lo largo del mismo período de 6 meses. Un posible punto de atención fue un período medio más prolongado desde el diagnóstico para el grupo de 1 mg (59,7 meses) en comparación con el placebo (41,1 meses) aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 1). Estos datos indican que BHT-3021 puede preservar la masa y/o función de células beta durante el período de dosificación de 12 meses durante hasta 3 meses más (punto temporal de 6 meses) tras el cese de la dosificación. Este efecto se termina perdiendo una vez que se interrumpe la terapia. En la Tabla 2 se demuestra que el tratamiento con BHT-3021 no está asociado con una gran reducción de péptido C.

HbA<sub>1c</sub> media, necesidades de insulina y niveles de glucosa en sangre. HbA<sub>1c</sub> permite medir los cambios de homeostasia de glucosa, a lo largo de un largo segmento, tal como lo refleja la glicosilación de hemoglobina y por tanto refleja el estado de glucosa en plasma, con la contribución predominante de la glucosa en plasma durante el último mes. Generalmente, los niveles de HbA<sub>1c</sub> por encima de 53 mmol/mol (7,0 %) se consideran diabéticos, variando los patrones en función de la organización que decide la directriz. En la Figura 6 se presenta la media de HbA<sub>1c</sub> por grupo de tratamiento para la población MITT. Se señalaron las diferencias en HbA<sub>1c</sub> basal entre los grupos, lo cual reflejó la variación de niveles de control glucémico en la entrada. El HbA<sub>1c</sub> medio fue relativamente estable en la entrada y a las 15 semanas, aumentando después una vez que se cesó la dosificación en el mes 6 en todos los grupos, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Cabe señalar que hubo un descenso del control con menores visitas de estudio más allá de la semana 15. En la Figura 6B se representa la media total de uso de insulina por grupo de tratamiento. El uso total de insulina fue estable para los grupos de tratamiento desde el mes de inicio a los 9 meses del estudio y, a continuación, se aumentó. El uso de insulina medio para los grupos de dosis de 1 mg cayó durante el período de dosificación. El aumento global de uso de insulina coincidió con un mayor HbA<sub>1c</sub>. En particular, a lo largo de la duración de la dosificación del fármaco de estudio, el uso de insulina fue estable cuando se comparó con el valor basal en cada uno de los grupos de tratamiento, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al placebo.

### Estudios inmunológicos

Enumeración de linfocitos T CD8 específicos de antígeno durante la terapia. Se diseñó un estudio inmunológico especificado previamente para cuantificar los cambios en los linfocitos T CD8 específicos de islote antes y después del tratamiento con BHT-3021. Se tipificó a todos los pacientes para HLA. 64 pacientes tuvieron tipos HLA Clase I para los que estaban disponibles múltiples. 21 de los 64 pacientes tuvieron un número de células demasiado escaso en el momento basal como para permitir una comparación con el tiempo. No se recogieron las muestras de dos de los pacientes. Por tanto, se evaluó a un total de 41 de los 80 pacientes en el momento basal y al menos un punto temporal tras el tratamiento. Se utilizó la técnica de punto cuántico (Qdot) combinatorio (21) para detectar simultáneamente linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para nueve antígenos derivados de célula beta diferentes y un cuadro de epítomos virales, para medir las respuestas a antígenos no islote (21).

Los autores de la invención analizaron péptido C delta (estimulado) en relación con los cambios en la autorreactividad de islote CD8 con respecto al valor basal en pacientes tratados con el fármaco activo en comparación con el placebo para cada uno de los epítomos analizados y para HLA-A2, HLA-A3 y HLA-B7. A continuación se distinguió los epítomos presentes en la vacuna de ADN BHT (es decir, proinsulina, pero no el péptido líder en PPI) de otros autoantígenos de islote (GAD, IA2, PPI secuencia líder, IAPP y IGRP). Finalmente, se contabilizó un epítomo de insulina (ins B10-18), presente también en insulina inyectada, que se utilizó para terapia de

reemplazo con insulina en todos los pacientes del estudio (22). Dado que se sabe que pueden desarrollarse respuestas inmunes a insulina inyectada tras el inicio de la terapia con insulina, el reemplazo con insulina puede actuar como cofundador en lo que respecta a los cambios inducidos por BHT-3021. Por lo tanto, las respuestas de linfocitos T CD8 a este epítipo se separaron de los otros dos epítipos presentes en BHT-3021. Finalmente, no se distinguió ningún cambio en la respuesta de linfocitos T ( $\Delta = 0$ ) en los casos en los que no hubo ninguna respuesta detectable en ningún momento de forma fiable, con respecto a los casos en los que las frecuencias fueron las mismas en  $t=0$  y  $t=15$  semanas.

Cuando se comparó el cambio de frecuencia de linfocitos CD8 a proinsulina con la media del porcentaje de cambio en el péptido C, se produjo una correlación negativa para proinsulina, pero no para insulina ni otros antígenos de célula beta, incluyendo preproinsulinas, IA2, IGRP, GAD65 o pplAPP, (Fig. 4,  $p=0,006$  para HLA-A3 Proinsulina, tratado frente a placebo, aplicando un análisis de regresión lineal,  $n=12$  y  $n=8$  respectivamente;  $p>0,05$  para todos los demás epítipos). Estos resultados indican que BHT-3021 indujo reducciones específicas de antígeno en linfocitos CD8 reactivos con proinsulina, pero no para otros antígenos y que la magnitud de la reducción se correlacionó inversamente con la mejora del péptido C.

El análisis de las frecuencias de linfocitos T CD8 específicos de virus a lo largo del tiempo no presentó ninguna diferencia entre los sujetos tratados frente al placebo. Las frecuencias de CTL contra epítipos de vacuna aumentó significativamente en el placebo a lo largo del tiempo, en comparación con los pacientes tratados ( $p=0,003$  aplicando una prueba de Mann Whitney de una cola la semana 15, ( $n=16$  para placebo y  $n=30$  para los tratados, véase Fig. 7A). Para los linfocitos T CD8 específicos de proinsulina HLA-A3, las diferencias entre el placebo y los tratados fueron sobre todo pronunciadas en la semana 15, con un descenso de las diferencias una vez cesada la terapia ( $n=8$  para el placebo y  $n=16$  para los tratados  $p=0,0142$  utilizando una prueba Mann Whitney en la semana 15, Fig. 7B).

Se distribuyeron uniformemente las ramificaciones de tratamiento en cuanto al criterio de la autorreactividad de islote CD8 basal, descartando la posibilidad de que los cambios en la respuesta de linfocitos T a BHT-3021 a las 15 semanas se debiera a un desequilibrio selectivo observado en el momento 0 (Figura 8).

**Análisis ELISPOT de producción de citoquinas en linfocitos T CD4 específicos para insulina B9-23 y otros antígenos de islotes de islote.** Los autores de la invención optaron por medir IFN- $\gamma$  e IL-10, ya que IFN- $\gamma$  es la principal citoquina Th1 e IL-10 es una citoquina clave producida por linfocitos T reguladores. No hubo ningún cambio sólido en las respuestas inmunes de IL-10 para ninguno de los epítipos de islote incluyendo los contenidos de BHT-3021 así como los no relacionados con BHT-3021 (Figura 9A) ni ningún cambio en las respuestas de IFN- $\gamma$  al epítipo de insulina inmuno-dominante (Figura 9B), a las 15 semanas. No se dispuso de los suficientes datos para la correlación del análisis ELISPOT y el análisis de multímero CD8 para el mismo paciente en puntos temporales emparejados.

**Autoanticuerpos para antígenos pancreáticos.** Se midieron los autoanticuerpos para antígenos pancreáticos en el momento basal y en la semana 15 (3 semanas después del final de la administración de BHT-3021) en todos los sujetos para los que se dispuso de muestras. En general, hubo pocos cambios en el estado de anticuerpo en la semana 15, de manera que los pacientes que fueron positivos en el momento basal para un anticuerpo específico mantuvieron el estado positivo en la semana 15 y, por el contrario, si fueron negativos en el momento basal, permanecieron negativos en la semana 15 (Tabla S2). Hubo pocas excepciones, específicamente un solo paciente con placebo que pasó de negativo a positivo para GAD65 y cuatro pacientes (2 activo y 2 placebo) pasaron de negativo a positivo para anticuerpos de insulina (IA). Ninguno de los sujetos pasó de negativo a positivo para IA2.

Dado que el ADN de plásmido BHT-3021 codifica la proteína proinsulina, los cambios de la respuesta inmune a insulina revistieron un particular interés. Para determinar si el cambio del estado IA en estos 4 pacientes guardaba una correlación con cualquiera de los resultados clínicos, los cambios en el péptido C en la semana 5, la semana 15 y el mes 6 para los pacientes que pasaron de negativo a positivo para IA confirmaron que no hubo ningún cambio consistente de péptido C que se correlacionara con la inducción de anticuerpos de insulina. Cabe destacar que el sujeto con la mayor inducción de IA presentó la mejor preservación del péptido C a lo largo del tiempo. Se concluye que la inducción de IA no guardó correlación con el descenso precipitado y no deseable de péptido C en estos pacientes.

Asimismo, se observó la mejora de la hemoglobina A1c ( $HgbA_{1c}$ ) en relación con el placebo, cuando se agruparon todas las dosis del fármaco frente al placebo y se llevó un seguimiento en el momento temporal de 11 semanas y se compararon con el momento cero (la dosificación fue durante 12 semanas). La hemoglobina A1c proporciona un promedio del control de azúcar en sangre a lo largo de un período de seis a 12 semanas. Hubo un descenso de  $HgbA_{1c}$  -0,22 % en comparación con un aumento de 0,0045 % en placebo (Tabla 5).

## Seguridad

**Efectos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAE).** El Comité de Vigilancia de Seguridad de Datos determinó que no hubo ningún evento adverso relacionado con el tratamiento que aparentemente estuviera

relacionado con el fármaco del estudio. En la Tabla 4 se muestra una descripción detallada de todos los TEAE. El resumen estadístico consistió en el número y porcentaje de pacientes para mediciones categóricas y medias, medianas, desviaciones típicas y valores mínimos y máximos para mediciones continuas según se calculó con la versión 9.1.3 del paquete de software estadístico SAS® para calcular todo el resumen de datos, el listado y los gráficos y el análisis estadístico de los eventos adversos.

Se registraron TEAE para 12 (85,7 %) de los 14 pacientes tratados con 0,3 mg BHT-3021; 18 (100 %) de 18 pacientes tratados con 1,0 mg; 11 (78,6 %) de 14 pacientes tratados con 3,0 mg; 7 (87,5 %) de 8 pacientes tratados con 6,0 mg; y 25 (96,2 %) de 26 pacientes tratados con BHT-placebo. Se registraron TEAE de grado 3 o superiores para 4 (28,6 %) de 14 pacientes tratados con 1,0 mg BHT-3021; 2 (28,6 %) de 14 pacientes tratados con 3,0 mg; 3 (37,5 %) de 8 pacientes tratados con 6,0 mg; y 4 (15,4 %) de 26 pacientes tratados con BHT-placebo. En la Tabla 4 se resumen los diversos tipos de TEAE, no relacionados con el fármaco de estudio. Se registraron TEAE considerados como posiblemente relacionados con el fármaco de estudio para 5 (35,7 %) de 14 pacientes tratados con 0,3 mg BHT-3021; 6 (33,3 %) de 18 pacientes tratados con 1,0 mg; 6 (42,9 %) de 14 pacientes tratados con 3,0 mg; 4 (50,0 %) de 8 pacientes tratados con 6,0 mg; y 6 (23,1 %) de 26 pacientes tratados con BHT-placebo. La mayoría de estos eventos fueron percibidos por el investigador como grado 1; algunos fueron eventos de grado 2. Se registraron TEAE graves para 1 (7,1 %) de 14 pacientes tratados con 0,3 mg BHT-3021 para 1 (5,6 %) de 18 pacientes tratados con 1,0 mg y 4 (15,4 %) de 26 pacientes tratados con BHT-placebo; ninguno de estos eventos se consideró como relacionado con el fármaco de estudio.

**Interrupciones.** Se interrumpió el tratamiento con fármaco del estudio en dos pacientes tratados con 3,0 mg BHT-3021 debido a TEAE cuya relación con el fármaco de estudio no pudo ser aclarada con certeza por los investigadores. Un paciente registró dolor de cabeza de grado 2 y un paciente desarrolló candidiasis vaginal de grado 1. Una vez completada la prueba y revisados los datos en todos los pacientes, no se pudo asociar estadísticamente estos eventos adversos en particular, ni ningún otro, con el fármaco de estudio. No hubo fallecimientos en el estudio. Los autores de la invención concluyen que BHT-3021 satisface el criterio de evaluación de seguridad principal, al no haberse señalado ninguna toxicidad sustancial.

## DISCUSIÓN

No existe ninguna inmunoterapia aprobada para el tratamiento de DT1. El soporte de tratamiento es el reemplazo de insulina, un avance vital descubierto hace más de 90 años. Hace mucho que se busca un agente terapéutico dirigido a la patogénesis primaria de la enfermedad.

Una respuesta autoinmune principal en DT1 se dirige a insulina (1-3,5,6). En este estudio los autores de la invención han tratado de modular de manera específica para antígeno la respuesta inmune adaptativa para proinsulina con una vacuna de ADN obtenida por ingeniería genética que codifica proinsulina. La vacuna se obtiene por ingeniería genética para reducir la inmunogenicidad de la proinsulina codificada sustituyendo motivos hexaméricos CpG, que estimulan la respuesta inmune innata, por secuencias de nucleótido hexaméricas GpG conocidas por modular la inmunidad innata (13). En el presente documento se demuestra que este enfoque moduló el péptido C, con un aumento real en este marcador de la función de células beta durante el período de dosificación en dos dosis. Asimismo, se demostró que a medida que aumenta el péptido C se produce una supresión de linfocitos T CD8 reactivos con proinsulina, pero no existe ningún efecto en otras respuestas de linfocitos T específicos de antígeno. Esto es una firme indicación de que ha tenido lugar la modulación específica de antígeno.

No hubo ningún aumento de los eventos adversos o eventos adversos graves asociados con BHT-3021 (Tabla 4). Esto es un resultado particularmente importante, ya que DT1 se suele observar en niños y adultos jóvenes en los que se debe analizar en última instancia BHT-3021.

Los autores de la invención han evaluado péptido C para determinar si esta vacuna podría causar una caída precipitada no deseable del péptido C. Por el contrario, se observó una significativa mejora del péptido C durante el período de dosificación. La dosis de 1 mg fue sobre todo eficaz en comparación con el placebo  $p < 0,026$  (Fig. 3). El tratamiento con 1,0 y 3,0 de BHT-3021 condujo a niveles de péptido C que estuvieron por encima de los valores en el momento de la selección en la semana 15. Por tanto, estos datos proporcionan pruebas de la preservación del péptido C durante el período de dosis, un efecto que se perdió cuando dejó de exponerse a los pacientes a la vacuna codificante de antígeno. Este resultado es sorprendentemente inesperado, ya que la prueba no tenía la capacidad para medir resultados de eficacia y porque se realizó la prueba en adultos con una duración de la enfermedad de 5 años y una masa de células beta proporcionalmente más baja y tal vez más respuestas inmunes en última etapa, que las observadas en los pacientes diabéticos de inicio reciente.

Se controló perfectamente  $HbA_{1c}$  durante la dosificación del plásmido de ADN en comparación con el placebo (Fig. 6A). La media de  $HbA_{1c}$  fue relativamente estable inicialmente a lo largo de 15 semanas de tratamiento con BHT-3021, después aumentó en el mes 6 en todos los grupos. El uso de insulina pareció relativamente estable en general cuando se comparó el momento basal en todos los grupos de tratamiento (Fig. 6B). Los datos de la semana 104 no son estadísticamente significativos,  $N=3$ . Ni los datos de  $HbA_{1c}$  ni los del uso de insulina fueron significativamente diferentes con respecto al control en ninguna de las dosis.

Los linfocitos T CD8 son críticos en la patogénesis de DT1 (1-3, 5, 6). Se valoraron los linfocitos T CD8 específicos para proinsulina, otros antígenos de célula de islote y antígenos viales con multímeros de HLA clase 1, una tecnología que permite la enumeración de la frecuencia de linfocitos T específicos de antígeno con citometría de flujo (21,23). Los autores de la invención demostraron la reducción específica de antígeno en linfocitos CD8 reactivos con proinsulina, pero no con otros antígenos, y que la magnitud de la reducción se correlacionaba inversamente con la mejora del péptido C (Fig. 4).

Se han detectado linfocitos T CD8 específicos para insulina en los islotes de pacientes con DT1 empleando los mismos monómeros HLA utilizados en los estudios de los autores de la invención (1). La reducción de la frecuencia de dichos linfocitos T CD8 en este estudio se correlacionó con los aumentos de péptido C durante el período de dosificación (s1 4). Los autores de la invención especulan que o bien los linfocitos T CD8 específicos de proinsulina son suprimidos por apoptosis ya que reciben señales a través de sus receptores de linfocito T afines en ausencia de señales co-estimuladoras proporcionadas por células presentadoras de antígeno, o bien son suprimidos activamente por linfocitos T reguladores y secuestrados de los islotes pancreáticos y desde la circulación periférica cuando se trata de detectarlos.

Los tipos de HLA en particular y los epítomos utilizados en el análisis con multímeros son relevantes para la patofisiología de DET1. Un estudio reciente en el que se utilizan tetrámeros en lugar de los multímeros de punto cuántico empleados en el presente documento, pero con las mismas moléculas de HLA y epítomos de islote que los utilizados en los presentes experimentos para BHT3021, detectó linfocitos T CD8 similares en la sangre periférica, que se observan también en el páncreas inflamado del mismo paciente con DT1 (24). Por tanto, se sabe que estos linfocitos T CD8 periféricos encontrados en la circulación se localizan en los islotes inflamados (24). Otra investigación reciente reveló que los linfocitos T CD8 clonados desde la sangre periférica y reactivos contra uno de los epítomos del estudio de multímero utilizado en el presente documento fueron patógenos (25). Estos clones CD8 causaron insulinitis y destrucción de célula beta cuando se inyectaron en ratones humanizados (HLA-A2 transgénicos), lo que demostró la diabetogenicidad de estos linfocitos T CD8 humanos autorreactivos de islotes de la circulación en particular detectados en el ensayo de los autores de la invención en este ensayo clínico (25). Dichos linfocitos T en investigación en este ensayo clínico puede tener también una relevancia patogénica real para DT1 (24,25).

En conjunto, la preservación del péptido C durante el período de dosificación de BHT-3021 junto con los estudios inmunológicos con los multímeros de MHC clase I indican que BHT-3021 induce modulación específica de antígeno de la respuesta inmune a proinsulina, pero no otros antígenos. Una meta de la terapia perseguida desde hace tiempo en las enfermedades autoinmunes está dirigida a reducir o suprimir las respuestas autoinmunes no deseadas que contribuyen a la patología. Existen sólidas pruebas de que la inmunidad a insulina, un antígeno específico de célula beta primara, es uno de los aspectos fundamentales que subyace en la patofisiología de DT1. Los resultados de este ensayo de 12 semanas con un plásmido de ADN que codifica proinsulina obtenido por ingeniería genética indican que hay una supresión de inmunidad específica de antígeno para proinsulina durante el período de dosificación. Los ensayos más prolongados con BHT-3021 están garantizados, dada la reducción de la inmunidad para proinsulina y el perfil de seguridad favorable.

## TABLAS

**Tabla 1, Demografía características en el momento basal (Población ITT)**

	0,3 mg (n=14)	1,0 mg (n=18)	3,0 mg (n=14)	6,0 mg (n=8)	Placebo (n=26)
Edad media (años)	29,6	31,5	31,8	27,6	29,3
Género					
Masculino	9 (64,3 %)	10 (55,6 %)	6 (42,9 %)	7 (87,5 %)	18 (69,2 %)
Femenino	5 (35,7 %)	8 (44,4 %)	8 (57,1 %)	1 (12,5 %)	8 (30,8 %)
Raza					
Caucásica	10 (71,4 %)	17 (94,4 %)	11 (78,6 %)	8 (100 %)	22 (84,6 %)
Asiática	1 (7,1 %)	0	1 (7,1 %)	0	1 (3,8 %)
Negra	0	1 (5,6 %)	1 (7,1 %)	0	1 (3,8 %)
Hispanica	2 (14,3 %)	0	0	0	1 (3,8 %)
Indio americano o nativo de Alaska	0	0	1 (7,1 %)	0	0
Otros	1 (7,1 %)	0	0	0	1 (3,8 %)
Tiempo medio desde el diagnóstico (meses)	14,0	59,7	36,9	32,2	41,1

Punto temporal	0,3 mg (n=14)	1,0 mg (n=15)	3,0 mg (n=12)	6,0 mg (n=8)	Activo agrupado (n=49)	Placebo (n=23)
Mes 6						
Descenso ≥75 %, n (%)	0	1 (6,7 %)	0	0	1 (2,0 %)	0
Mes 12						
Descenso ≥75 %, n (%)	1 (7,1 %)	1 (6,7 %)	1 (8,3 %)	0	3 (6,1 %)	3 (13 %)

\* Descenso ≥75 % en péptido C

Niveles de dosis (mg)	GAD65 <sup>1</sup>	IAA <sup>2</sup>
	NEG a POS	NEG a POS
0,3	0/14	1/14 (Paciente 42-005)
1	0/15	0/15
3	0/13	1/13 (Paciente 42-003)
6	0/8	0/8
0 (placebo)	1/23 (42-004)	2/23 (Pacientes 31-007 y 42-004)

<sup>1</sup>GAD65- medido por RIA utilizando un valor índice de >0,032 como límite positivo

<sup>2</sup>IAA – medido por RIA utilizando un valor índice de >0,01 como límite positivo

5

Clasificación MedDRA por órganos y sistemas	0,3 mg n=14 n (%)	1,0 mg n=18 n (%)	3,0 mg n=14 n (%)	6,0 mg n=8 n (%)	Placebo n=26 n (%)
Pacientes con cualquier EA	12 (85,7 %)	18 (100 %)	11 (78,6 %)	7 (87,5 %)	25 (96,2 %)
Trastornos del sistema linfático y sanguíneo	1 (7,1 %)		3 (21,4 %)		1 (3,8 %)
Trastornos cardíacos				1 (12,5 %)	1 (3,8 %)
Trastornos de laberinto y el oído			1 (7,1 %)		
Trastornos oculares	1 (7,1 %)	2 (11,1 %)	1 (7,1 %)		2 (7,7 %)
Trastornos gastrointestinales	2 (14,3 %)	6 (33,3 %)	5 (35,7 %)	1 (12,5 %)	6 (23,1 %)
Trastornos generales y afecciones en el sitio de la administración	2 (14,3 %)	1 (5,6 %)	1 (7,1 %)	3 (37,5 %)	1 (3,8 %)
Trastornos del sistema inmune	1 (7,1 %)				4 (15,4 %)
Infecciones e infestaciones	10 (71,4 %)	13 (72,2 %)	9 (64,3 %)	6 (75,0 %)	13 (50,0 %)
Lesiones, intoxicaciones y complicaciones de procedimientos	3 (21,4 %)	3 (16,7 %)	3 (21,4 %)	2 (25,0 %)	4 (15,4 %)
Trastornos metabólicos y nutricionales	3 (21,4 %)	2 (11,1 %)	3 (21,4 %)	3 (37,5 %)	12 (46,2 %)
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conectivo	2 (14,3 %)	1 (5,6 %)	4 (28,6 %)	1 (12,5 %)	3 (11,5 %)
Trastornos del sistema nervioso	4 (28,6 %)	6 (33,3 %)	5 (35,7 %)	2 (25,0 %)	8 (30,8 %)
Trastornos psiquiátricos			2 (14,3 %)		1 (3,8 %)
Trastornos renales y urinarios	1 (7,1 %)	1 (5,6 %)			
Trastornos respiratorios, torácicos y del mediastino	1 (7,1 %)	3 (16,7 %)	4 (28,6 %)	1 (12,5 %)	8 (30,8 %)
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	3 (21,4 %)	4 (22,2 %)	3 (21,4 %)	2 (25,0 %)	8 (30,8 %)
Procedimientos quirúrgicos y médicos		1 (5,6 %)			1 (3,8 %)
Trastornos metabólicos y nutricionales	3 (21,4 %)	2 (11,1 %)	3 (21,4 %)	3 (37,5 %)	12 (46,2 %)
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conectivo	2 (14,3 %)	1 (5,6 %)	4 (28,6 %)	1 (12,5 %)	3 (11,5 %)
Trastornos del sistema nervioso	4 (28,6 %)	6 (33,3 %)	5 (35,7 %)	2 (25,0 %)	8 (30,8 %)
Trastornos psiquiátricos			2 (14,3 %)		1 (3,8 %)
Trastornos renales y urinarios	1 (7,1 %)	1 (5,6 %)			
Trastornos respiratorios, torácicos y del mediastino	1 (7,1 %)	3 (16,7 %)	4 (28,6 %)	1 (12,5 %)	8 (30,8 %)
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	3 (21,4 %)	4 (22,2 %)	3 (21,4 %)	2 (25,0 %)	8 (30,8 %)
Procedimientos quirúrgicos y médicos		1 (5,6 %)			1 (3,8 %)

**Tabla 5. Combinaciones de multímeros HLA-A2, A3 y B7 etiquetados con puntos cuánticos**

Origen	Específico de islote	Específico insulina	Posición/proteína	Secuencia	HLA Restricción	Señal
CMV	No	NA	pp65	NLVPMVATV	HLA-A2	Qdot 585 + 655
EBV	No	NA	LMP2	CLGGLLTMV	HLA-A2	Qdot 585 + 655
Sarampión	No	NA	H250	SMYRVFEVGV	HLA-A2	Qdot 585 + 655
HLA-A2	No	NA	140-149	YAYDGKDYIA	HLA-A2	Qdot 585 + 605
Insulina	Sí	Sí	B 10-18	HLVEALYLV	HLA-A2	Qdot 605 + 655
PPI	Sí	Sí	15-24	ALWGPDPAAA	HLA-A2	Qdot 705 + 655
GAD65	Sí	No	114-123	VMNiLLQYVV	HLA-A2	Qdot 800 + 655
IA-2	Sí	no	797-805	MVWESGCTV	HLA-A2	Qdot 705 + 605
IGRP	Sí	no	265-273	VLFGGLGFAI	HLA-A2	Qdot 800 + 605
pplAPP	Sí	no	5-13	KLQVFLIVL	HLA-A2	Qdot 705 + 800
PPI <sub>76-84</sub>	Sí	Sí	76-84	SLQPLALEG	HLA-A3	Qdot 585 + 800
PPI <sub>79-88</sub>	Sí	Sí	79-88	PLALEGSLQK	HLA-A3	Qdot 585 + 705
PP <sub>14-13</sub>	Sí	Sí	4-13	WMRLPLLAL	HLA-B7	Qdot 585 + Qdot 800 o Qdot 655 + 705*

CMV, citomegalovirus; EBV, virus Epstein-Barr.  
 \*: Dependiendo de la mezcla de cualquiera de los epítomos HLA-A3 o HLA-A2 combinados.

Tabla 6

TOL-3021				Página 1 de 1			
<b>Tabla 14.2.43.3</b>							
<b>Prueba T apareada para HbA<sub>1c</sub> (%) en el momento basal frente a semana 11 (Todas las dosis frente a Placebo)</b>							
<b>Población ITT con péptido C basal &gt; 33 pmoles/l</b>							
Dosis	N	Media (LCL, UCL)	Desviación típica	Error típico	valor t	DF	valor p
Todas las dosis	50	-0,2200 (-0,4708, 0,2429)	0,8825	0,1248	-1,76	49	0,0842
Placebo	22	(-0,2338, 0,2429)	0,5376	0,1146	0,04	21	0,9687

5 REFERENCIAS Y NOTAS

1. K.T. Coppieters, F. Dotta, N. Amirian, P.D. Campbell, T.W. Kay, M.A. Atkinson, B.O. Roep & M.G. von Herrath, Demonstration de islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J Exp Med.* 209, 51-60 (2012).
- 10 2. G.G. Pinkse, O.H. Tysma, C.A. Bergen, M.G. Kester, F. Ossendorp, P.A. van Veelen, B. Keymeulen, D. Pipeleers, J.W. Drijfhout & B.O. Roep, Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 18425-18430 (2005).
3. C.F. Verge, D. Stenger, E. Bonifacio, P.G. Colman, C. Pilcher, P.J. Bingley & G.S. Eisenbarth, Combined use de autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes.* 47, 1857-1866 (1998).
- 15 4. A. Kupila, J. Sipila, P. Keskinen, T. Simell, M. Knip, K. Pulkki & O. Simell, Intranasally administered insulin intended for prevention de type 1 diabetes--a safety study in healthy adults. *Diabetes Metab Res Rev.* 19, 415-420 (2003).
5. J.S. Skyler, J.P. Krischer, J. Wolfsdorf, C. Cowie, J.P. Palmer, C. Greenbaum, D. Cuthbertson, L.E. Rafkin-Mervis, H.P. Chase & E. Leschek, Effects de oral insulin in relatives de patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care.* 28, 1068-1076 (2005).
6. J.S. Skyler, R.S. Weinstock, P. Raskin, J.F. Yale, E. Barrett, J.E. Gerich & H.C. Gerstein, Use de inhaled insulin in a basal/bolus insulin regimen in type 1 diabetic pacientes: a 6-month, randomized, comparative trial. *Diabetes Care.* 28, 1630-1635 (2005).
- 25 7. A.A. Mamchak, Y. Manenkova, W. Leconet, Y. Zheng, J.R. Chan, C.L. Stokes, L.K. Shoda, M. von Herrath & D. Bresson, Preexisting autoantibodies predict efficacy de oral insulin to cure autoimmune diabetes in combination with anti-CD3. *Diabetes.* 61, 1490-1499 (2012).
8. J. Ludvigsson, D. Krisky, R. Casas, T. Battelino, L. Castano, J. Greening, O. Kordonouri, T. Otonkoski, P. Pozzilli, J.J. Robert, H.J. Veeze, J. Palmer, U. Samuelsson, H. Elding Larsson, J. Aman, G. Kardell, J. Neiderud
- 30 Helsingborg, G. Lundstrom, E. Albinsson, A. Carlsson, M. Nordvall, H. Fors, C.G. Arvidsson, S. Edvardson, R. Hanas, K. Larsson, B. Rathsmann, H. Forsgren, H. Desaix, G. Forsander, N.O. Nilsson, C.G. Akesson, P. Keskinen, R. Veijola, T. Talvitie, K. Raile, T. Kapellen, W. Burger, A. Neu, I. Engelsberger, B. Heidtmann, S. Bechtold, D. Leslie, F. Chiarelli, A. Cicognani, G. Chiumello, F. Cerutti, G.V. Zuccotti, A. Gómez Gilá, I. Rica, R. Barrio, M. Clemente, M.J. López García, M. Rodríguez, I. González, J.P. López, M. Oyarzabal, H.M. Reeser, R. Nuboer, P. Stouthart, N. Bratina, N. Bratanic, M. de Kerdanet, J. Weill, N. Ser, P. Barat, A.M. Bertrand, J.C. Carel,
- 35

- R. Reynaud, R. Coutant & S. Baron, GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 366, 433-442 (2012).
9. <http://www.andromedabio.com/page.php?pagelD=80>, accessed April 28, 2013
10. D. Bresson & M. von Herrath, Humanizing animal models: a key to autoimmune diabetes treatment. *Sci Transl Med.* 3, 68ps64 (2011).
11. B. Coon, L.L. An, J.L. Whitton & M.G. von Herrath, DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. *J Clin Invest.* 104, 189-194 (1999).
12. N. Solvason, Y.P. Lou, W. Peters, E. Evans, J. Martínez, U. Ramírez, A. Ocampo, R. Yun, S. Ahmad, E. Liu, L. Yu, G. Eisenbarth, M. Leviten, L. Steinman & H. Garren, Improved efficacy de a tolerizing DNA vaccine for reversal of hyperglycemia through enhancement de gene expression and localization to intracellular sites. *J Immunol.* 181, 8298-8307 (2008).
13. P.P. Ho, P. Fontoura, P.J. Ruiz, L. Steinman & H. Garren, An immunomodulatory GpG oligonucleotide for the treatment de autoimmunity via the innate and adaptive immune systems. *J Immunol.* 171, 4920-4926 (2003).
14. B.O. Roep, The role de T-cells in the pathogenesis de Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia.* 46, 305-321 (2003).
15. A.J. Williams, A.J. Norcross, R.J. Dix, K.M. Gillespie, E.A. Gale & P.J. Bingley, The prevalence de insulin autoantibodies at the onset de Type 1 diabetes is higher in males than females during adolescence. *Diabetologia.* 46, 1354-1356 (2003).
16. S.C. Kent, Y. Chen, L. Bregoli, S.M. Clemmings, N.S. Kenyon, C. Ricordi, B.J. Hering & D.A. Hafler, Expanded T cells from pancreatic lymph nodes de type 1 diabetic pacientes recognize an insulin epitope. *Nature.* 435, 224-228 (2005).
17. S. Arif, T.I. Tree, T.P. Astill, J.M. Tremble, A.J. Bishop, C.M. Dayan, B.O. Roep & M. Peakman, Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Invest.* 113, 451-463 (2004).
18. J.P. Palmer, G.A. Fleming, C.J. Greenbaum, K.C. Herold, L.D. Jansa, H. Kolb, J.M. Lachin, K.S. Polonsky, P. Pozzilli, J.S. Skyler & M.W. Steffes, C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report de an ADA workshop, 21-22 octubre 2001. *Diabetes.* 53, 250-264 (2004).
19. C.J. Greenbaum & L.C. Harrison, Guidelines for intervention trials in subjects with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes.* 52, 1059-1065 (2003).
20. C.J. Greenbaum, T. Mandrup-Poulsen, P.F. McGee, T. Battelino, B. Haastert, J. Ludvigsson, P. Pozzilli, J.M. Lachin & H. Kolb, Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 31, 1966-1971 (2008).
21. J.H. Velthuis, W.W. Unger, J.R. Abreu, G. Duinkerken, K. Franken, M. Peakman, A.H. Bakker, S. Reker-Hadrup, B. Keymeulen, J.W. Drijfhout, T.N. Schumacher & B.O. Roep, Simultaneous detection of circulating autoreactive CD8+ T-cells specific for different islet cell-associated epitopes using combinatorial MHC multimers. *Diabetes.* 59, 1721-1730 (2010).
22. N.C. Schloot, B.O. Roep, D. Wegmann, L. Yu, H.P. Chase, T. Wang & G.S. Eisenbarth, Altered immune response to insulin in newly diagnosed compared to insulin-treated diabetic patients and healthy control subjects. *Diabetologia.* 40, 564-572 (1997).
23. J.D. Altman, P.A. Moss, P.J. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael & M.M. Davis, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 274, 94-96 (1996).
24. J.H. Velthuis, W.W. Unger, A.R. van der Slik, G. Duinkerken, M. Engelse, A.F. Schaapherder, J. Ringers, C. van Kooten, E.J. de Koning & B.O. Roep, Accumulation of autoreactive effector T cells and allo-specific regulatory T cells in the pancreas allograft of a type 1 diabetic recipient. *Diabetologia.* 52, 494-503 (2009).
25. W.W. Unger, T. Pearson, J.R. Abreu, S. Laban, A.R. van der Slik, S.M. der Kracht, M.G. Kester, D.V. Serreze, L.D. Shultz, M. Griffioen, J.W. Drijfhout, D.L. Greiner & B.O. Roep, Islet-specific CTL cloned from a type 1 diabetes patient cause beta-cell destruction after engraftment into HLA-A2 transgenic NOD/scid/IL2RG null mice. *PLoS one.* 7, e49213 (2012).
26. L. Yu, D.T. Robles, N. Abiru, P. Kaur, M. Rewers, K. Kelemen & G.S. Eisenbarth, Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 1701-1706 (2000).

LISTADO DE SECUENCIAS

55

SEQ ID NO:1 (BHT-3021)

GCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC  
GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACC  
GCCCCACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCTATG  
ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC  
CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC  
TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG  
ATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAA  
TCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA  
GGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCA  
CTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGG  
GCTTGTGCGAGACAGAGAAGACTCTTGGCTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCCTTC  
TCTCCACAGGCTTAACTTATGGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAAGCTCTCTACCT  
AGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTACACACCAAGACCCGCGGGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCAGGT  
GGAGCTGGGCGGGGCTTGGTGCAGGCAGCTGCGAGCTTGGCCCTGGAGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCAI  
TGTGGAACAATGCTGACCAGCATCTGCTCCCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAGCTCGAGTCTAGAGG  
GCCCCTTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGFGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTTGCCCTCCCCGT  
GCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAAATGCATCGCAATTGTCT  
GAGTAGGTGTCACTTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG  
GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCCGGAATTTGCCA  
GCTGGGGCGCCCTCTGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGGCGCAAGGATCTGA  
TGGCGCAGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATGGTTTTCGCATGATTTGAACAAGATGGATTGCAC  
GCAGGTTCTCCGGCAGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGAT  
GCCGCCGTGTTCAGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAAI  
GAACCTGCAAGCAGGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTGGCAGCTGTGCTCCACTGPT  
GTCACTGAAGCGGGAAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGCGAGGATCTCCTGTCACTCACCTGGCT  
CCTGCCGAGAAAATATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTC  
GACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTG  
GACGAAGAGCATCAGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCCGACGGCGAGGAT  
CTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGC CGAATATCATGGTGGAAAATGGCAGGTTTTCTGGATTCACTGAC  
TGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACAGGTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGC  
GGCGAATGGGCTGACAGGTTCTCTGTGCTTTACGGTATTGCGGCTCCCGATTGCGAGCGCATTTGCCTTCTATAGG  
GGTATTTTACACCGCATCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAAT  
ACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACCTCA  
TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTT  
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCGCTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTG  
CTGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGTGGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC  
GAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT  
CAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA  
GTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGTTT  
GTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGC  
CACGCTTCCCAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA  
GCTTCCAGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTTT  
GTGATGCTCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTG  
CTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTT

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un auto-vector que tiene una secuencia de ácidos nucleicos idéntica en al menos un 95 % a SEQ ID NO: 1 (BHT-3021) para su uso en la reducción de la frecuencia de linfocitos T CD8 reactivos con proinsulina en un método para el tratamiento o la prevención de diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) en un sujeto.
2. El auto-vector para el uso de la reivindicación 1 que es SEQ ID NO: 1 (BHT-3021).
- 10 3. El auto-vector para el uso de la reivindicación 1, en donde el auto-vector forma una composición que comprende también un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. El auto-vector para el uso de la reivindicación 3, en donde la composición está desprovista de endotoxina.
- 15 5. El auto-vector para el uso de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un adyuvante.
6. El auto-vector para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde el auto-vector se administra intramuscularmente.
- 20 7. El auto-vector para el uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene DMDI.
8. El auto-vector para el uso de la reivindicación 1 en donde el método comprende detectar una reducción de la frecuencia de linfocitos T CD8 reactivos con proinsulina.

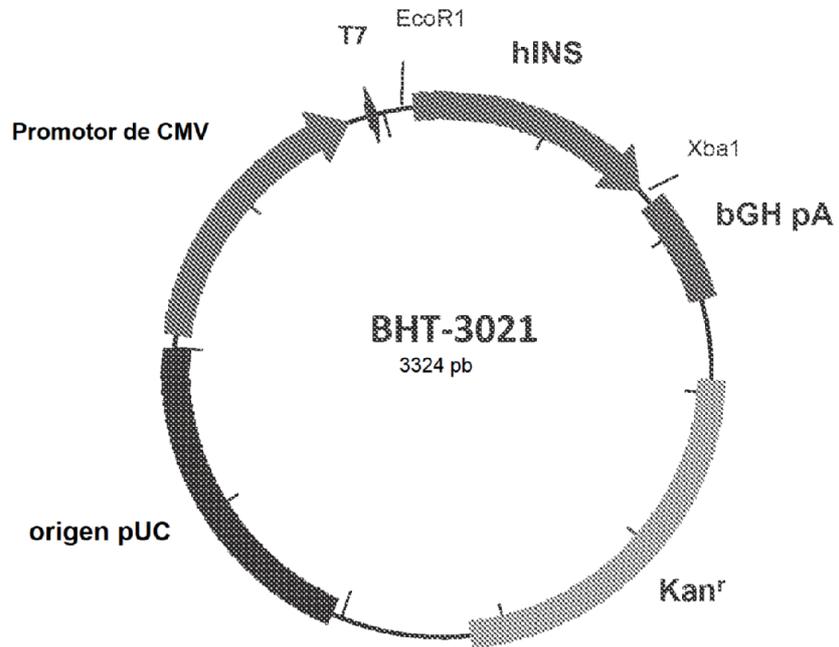


Figura 1

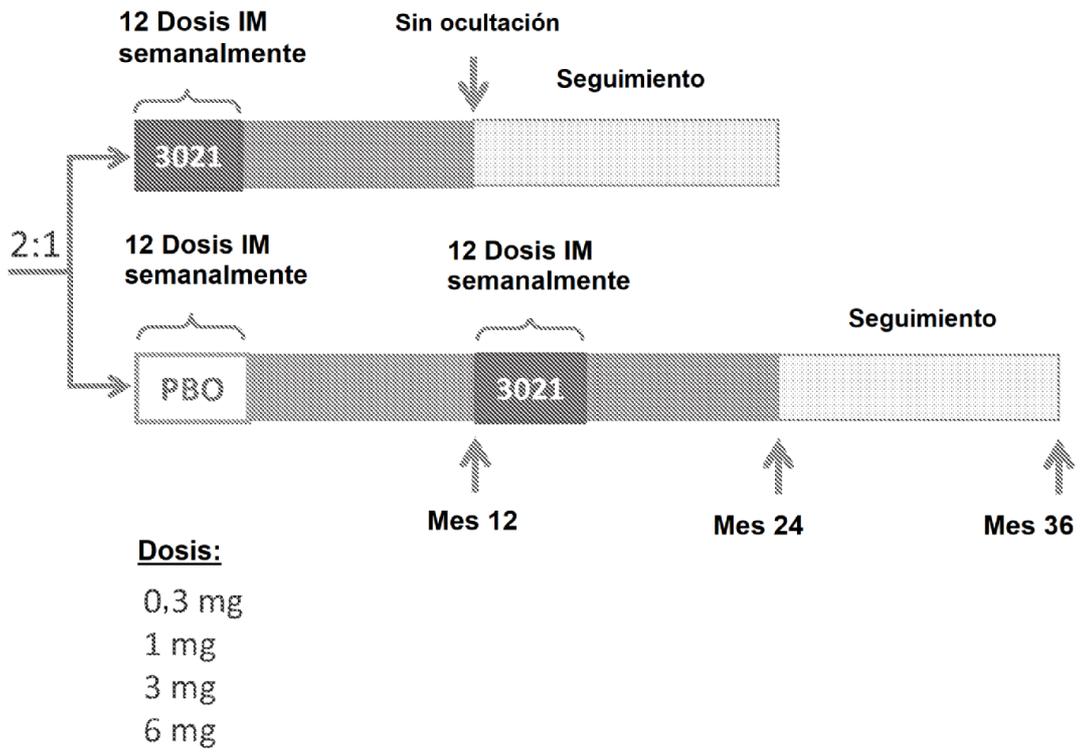


Figura 2

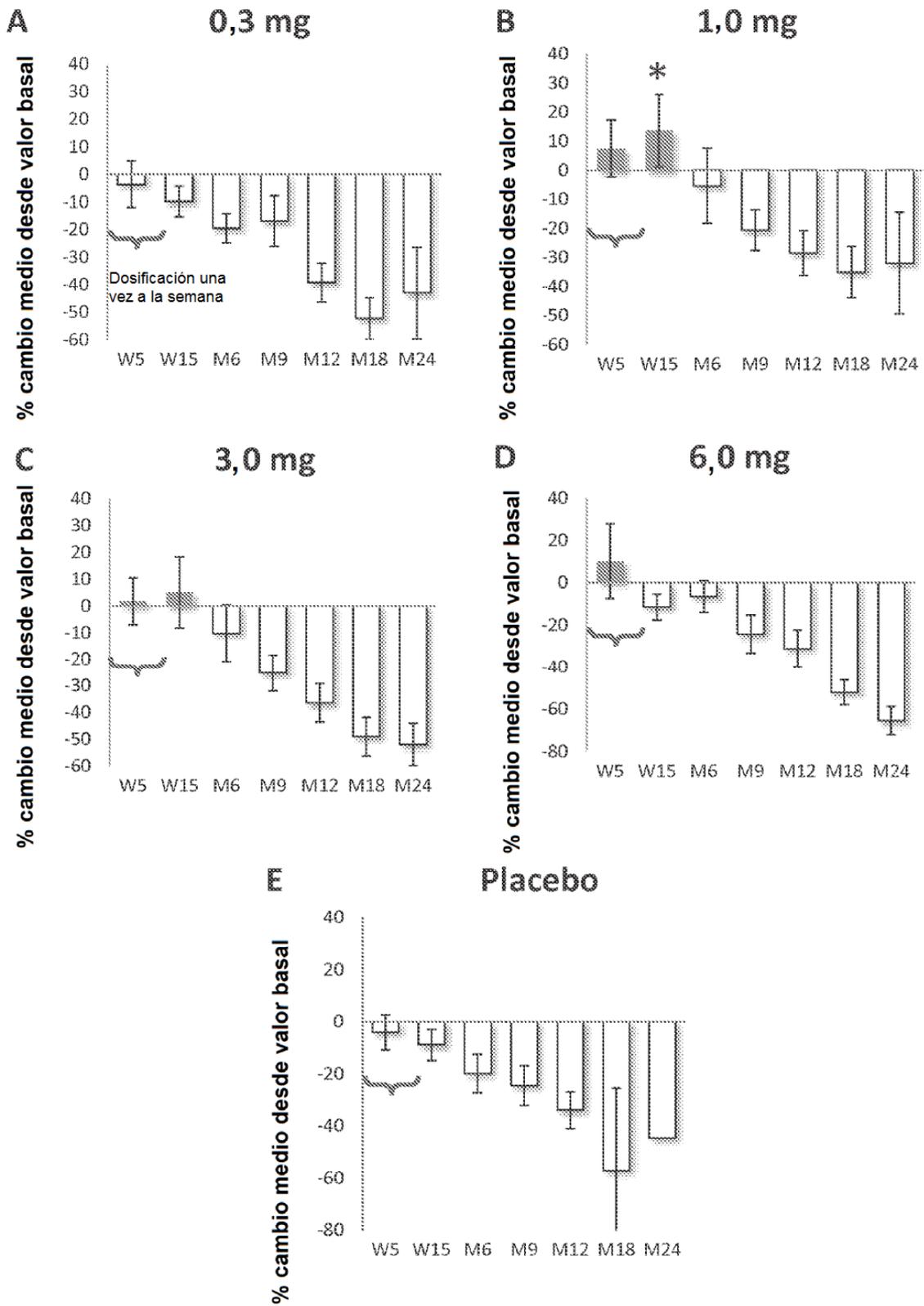


Figura 3

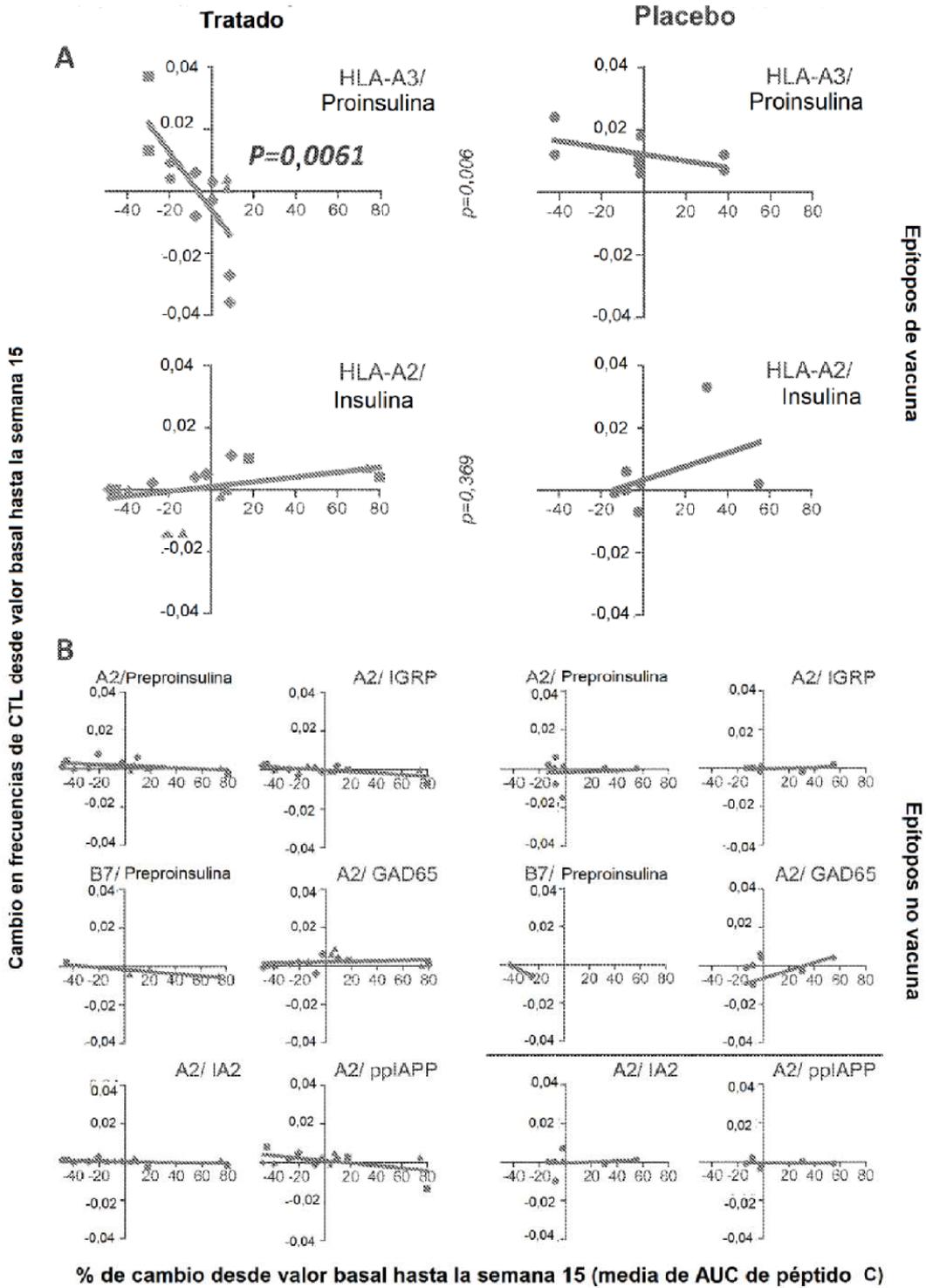
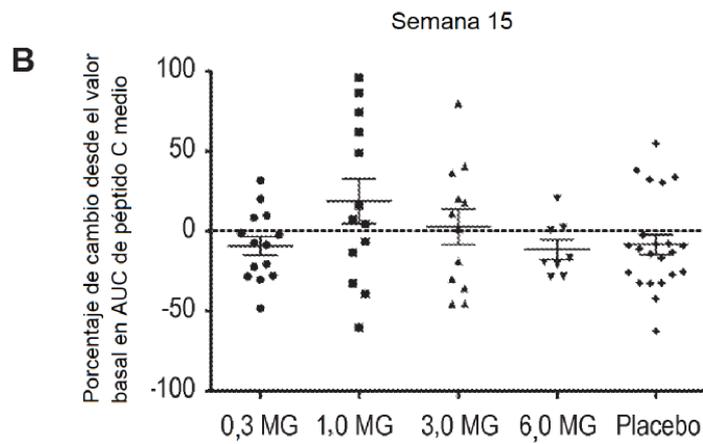
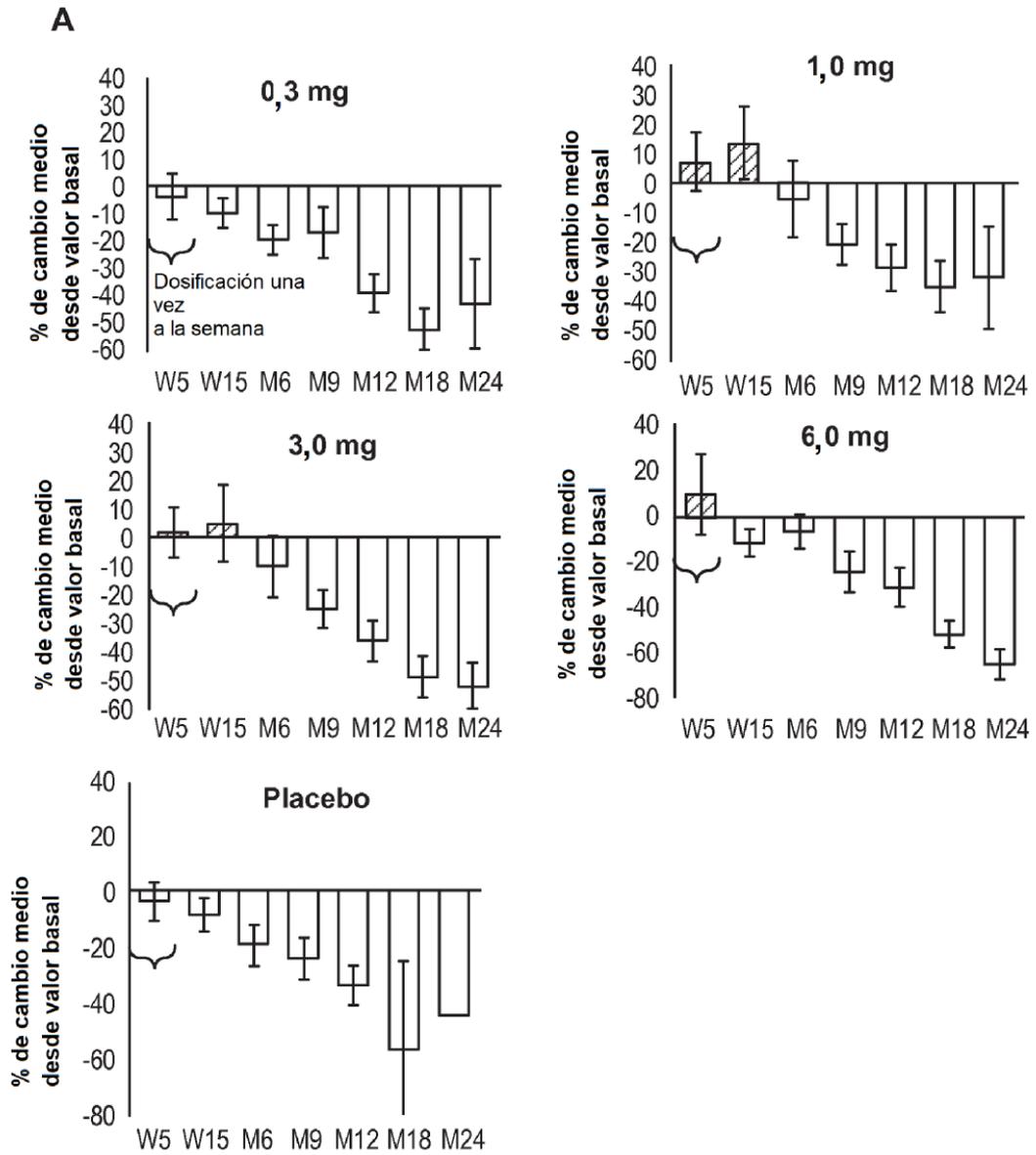


Figura 4



**Figura 5**

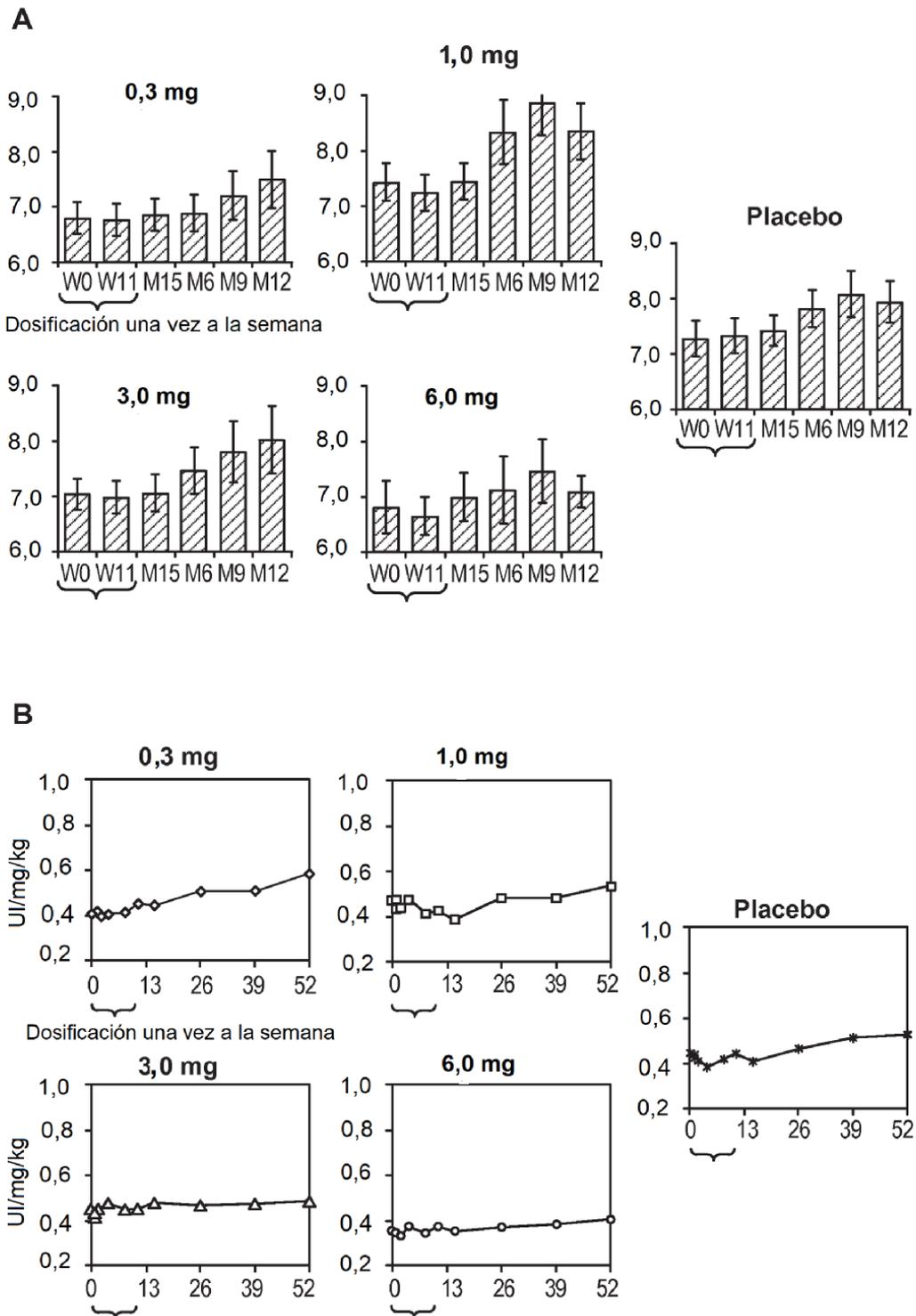


Figura 6

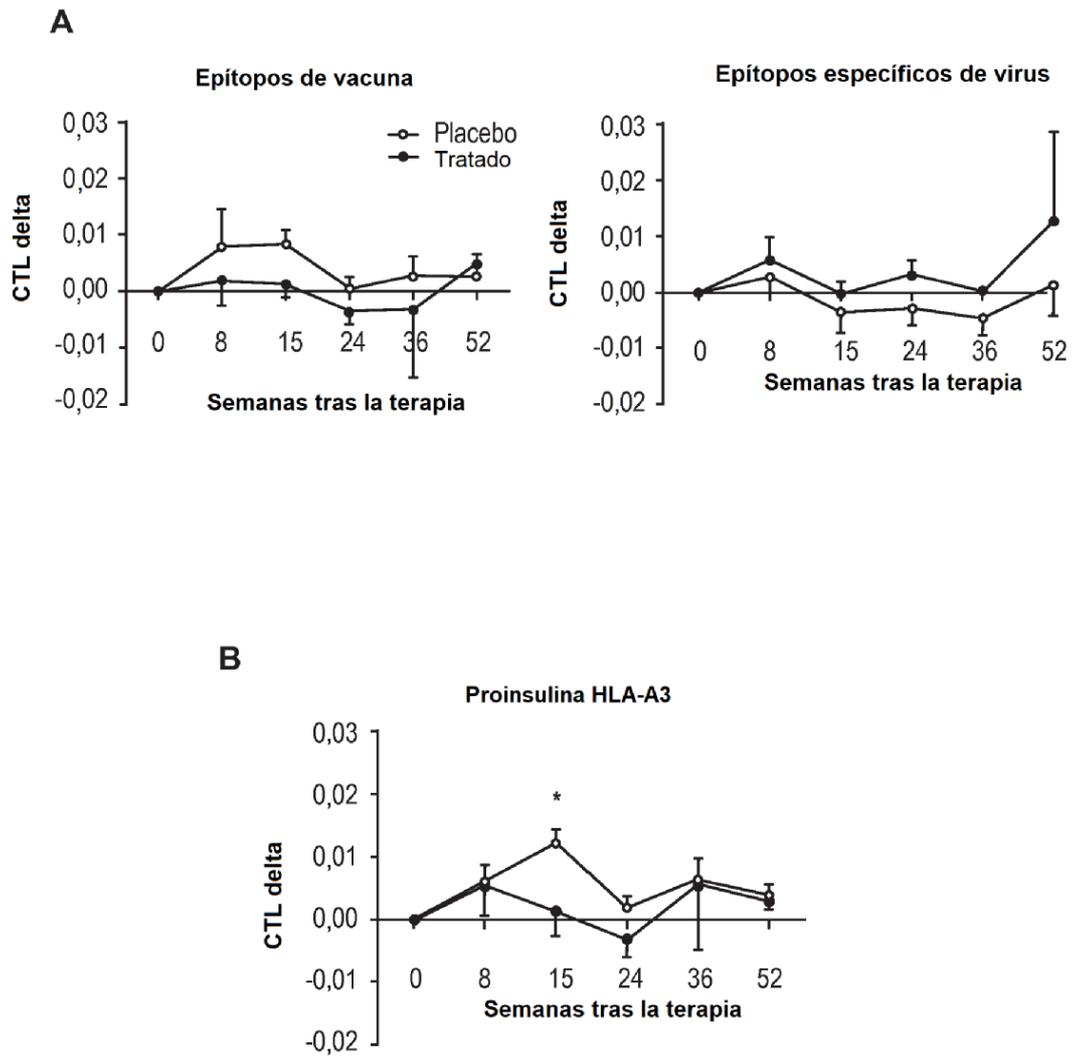


Figura 7



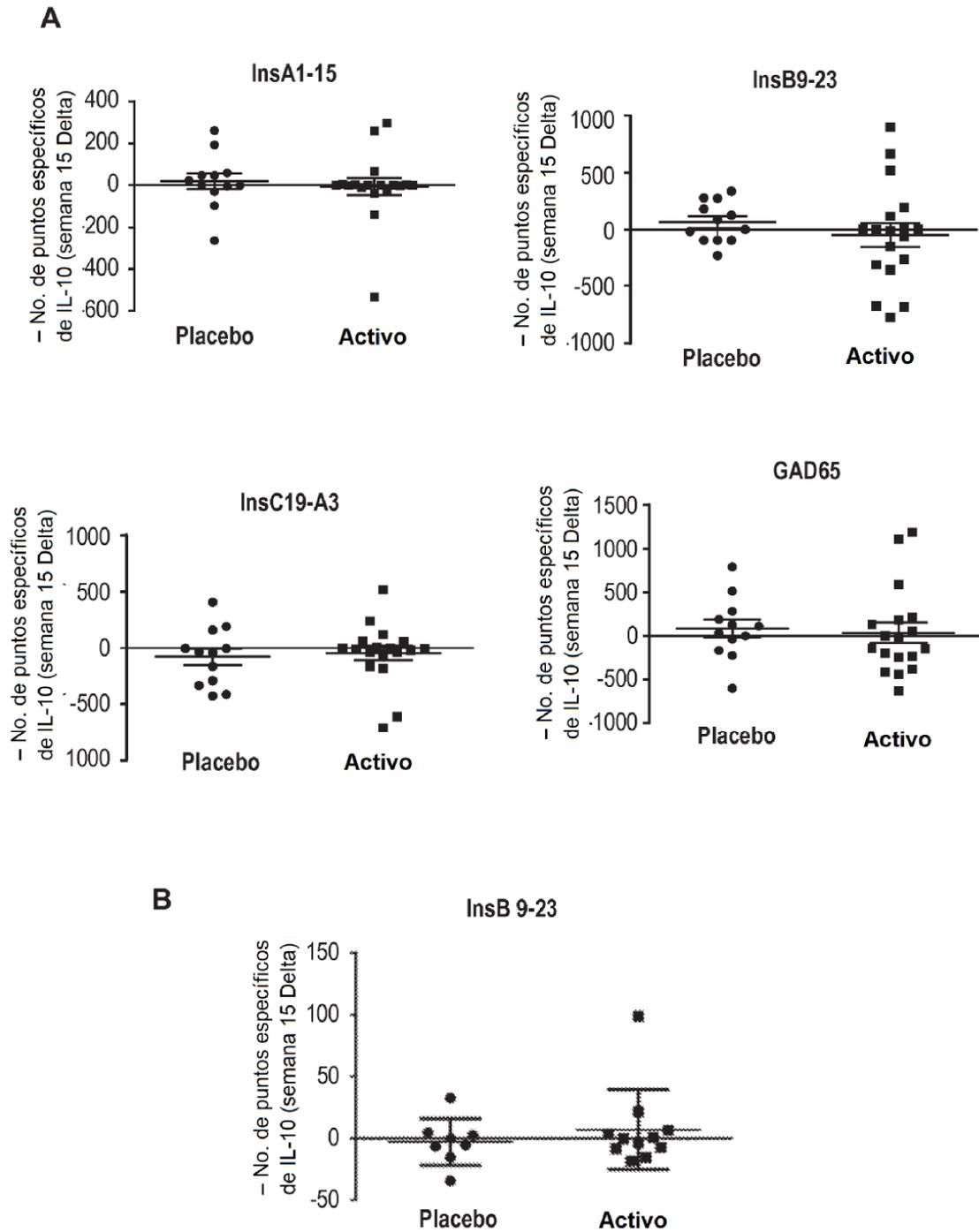


Figura 9