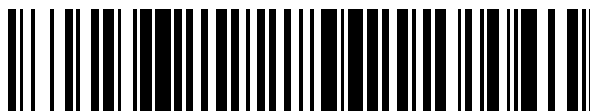


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 826**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2014 PCT/US2014/047071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15009955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2014 E 14826787 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 3021873**

54 Título: **Composición para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria articular**

30 Prioridad:

**18.07.2013 US 201361847851 P**

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

**19.02.2019**

73 Titular/es:

**XALUD THERAPEUTICS, INC. (50.0%)  
2120 University Avenue, Suite 532  
Berkeley, CA 94704, US y  
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
COLORADO, A BODY CORPORATE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHAVEZ, RAYMOND, A.;  
WATKINS, LINDA, R. y  
LANDRY, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 700 826 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria articular.

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de Solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 61/847.851, presentada el 18 de julio de 2013.

### Declaración sobre la investigación financiada federalmente

- 10 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno con la subvención número U44-NS071642 otorgada por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

### Campo de la invención

- 15 Esta invención se refiere a composiciones para tratar afecciones clínicas asociadas con enfermedades inflamatorias de las articulaciones y síntomas asociados con las mismas, administrando a la articulación inflamada la composición que comprende una construcción de expresión de interleuquina-10 (IL-10) de plásmido bacteriano.

### Antecedentes de la invención

- 20 En la siguiente discusión, ciertos artículos y métodos se describirán a modo de antecedentes y de introducción. Nada de lo contenido en este documento debe interpretarse como una "admisión" de la técnica anterior. El solicitante se reserva expresamente el derecho de demostrar, cuando corresponda, que los artículos y métodos a los que se hace referencia en este documento no constituyen un estado de la técnica según las disposiciones legales aplicables.

- 25 El dolor articular puede estallar por una serie de razones, como resultado de, por ejemplo, más de cien afecciones artríticas diferentes, de las cuales la artritis reumatoide y la artrosis son las más comunes, así como la tendinitis, la bursitis, la inflamación del ligamento, la sinovitis, la gota, y el lupus eritematoso sistémico. Cuando se produce una lesión, se desencadena una cadena de eventos en el sistema inmunológico conocida como la cascada inflamatoria, que causa enrojecimiento, hinchazón y dolor. A continuación, los compuestos antiinflamatorios se encargan de curar el área una vez que la amenaza disminuye. Cuando se produce este proceso, conocido como inflamación local o aguda, es un signo de un sistema inmunológico saludable. Sin embargo, si la inflamación persiste, puede dar lugar a una afección más crónica.

- 30 Los tratamientos actuales para las enfermedades inflamatorias de la articulación, como la artritis reumatoide y la artrosis, la tendinitis, la sinovitis y similares, siguen siendo subóptimos. La identificación de tratamientos que requerirían una administración menos frecuente afectaría significativamente la calidad de vida de los pacientes con enfermedad inflamatoria articular; sin embargo, a pesar de la investigación y el desarrollo sustanciales de terapias para dichas afecciones, todavía existe una gran necesidad no satisfecha de tratamientos seguros, efectivos y fáciles de administrar.

### Sumario de la invención

- 35 La presente invención proporciona una composición que comprende una construcción de expresión de IL-10 de plásmido bacteriano, en el que la construcción de expresión de IL-10 comprende una cadena principal bacteriana y una secuencia de ácido nucleico que codifica interleuquina-10 para usar en un método para tratar la enfermedad inflamatoria articular en un sujeto, dicho método que comprende inyectar la composición en una articulación inflamada del sujeto. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de IL-10 se encapsula en micropartículas biodegradables, y en ciertos aspectos de estas realizaciones, las micropartículas se suspenden en un diluyente para formar una composición terapéutica.

- 40 En otras realizaciones alternativas más, las composiciones terapéuticas de la presente invención son construcciones de expresión de IL-10, con una cadena principal bacteriana, que se suministran como ADN desnudo. Es decir, las construcciones de expresión de IL-10 se administran sin encapsulación. En dichas realizaciones, las construcciones de expresión de IL-10 se suministran junto con uno o más diluyentes, y en aspectos preferidos de estas realizaciones, la construcción de expresión de IL-10 se administra junto con uno o más adyuvantes. En algunos aspectos de esta realización, el uno o más adyuvantes se pueden administrar a un sujeto en el momento de la administración de la construcción de expresión de IL-10 o hasta 10 días antes de la administración de la construcción de expresión de IL-10, por ejemplo, como "tratamiento previo".

- 45 En algunos aspectos, la inflamación articular se encuentra en la rodilla, el codo, la muñeca, el tobillo, la cadera, el hombro o la columna vertebral. Las afecciones tratables por los métodos de la presente invención incluyen artritis reumatoide y artrosis, así como tendinitis, bursitis, inflamación del ligamento, sinovitis, gota y lupus eritematoso sistémico.

Así, en algunas realizaciones, la composición comprende: ADN plasmídico que comprende una cadena principal bacteriana y al menos una secuencia codificante de IL-10 y un diluyente; donde el compuesto terapéutico antiinflamatorio IL-10 proporciona una dosis terapéuticamente efectiva a una articulación de aproximadamente 1 µg de ADN a aproximadamente 1000 µg de ADN, o de aproximadamente 5 µg de ADN a aproximadamente 900 µg de ADN, o de aproximadamente 10 µg de ADN a aproximadamente 850 µg de ADN, o de aproximadamente 20 µg de ADN a aproximadamente 800 µg de ADN, o de aproximadamente 25 µg de ADN a aproximadamente 750 µg de ADN, o de aproximadamente 40 µg de ADN a aproximadamente 500 µg de ADN, o de aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 250 µg de ADN, o de aproximadamente 5 µg de ADN a aproximadamente 200 µg de ADN, aunque preferiblemente de aproximadamente 2,5 µg de ADN a aproximadamente 500 µg de ADN. En otros casos, se usa un vector viral como alternativa a un vector bacteriano.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, los compuestos terapéuticos de IL-10 de la presente invención (es decir, ADN encapsulado o desnudo) se administran con uno o más adyuvantes. Los adyuvantes de la invención son agentes biocompatibles que pueden administrarse simultáneamente con los compuestos terapéuticos de IL-10 o como un tratamiento previo antes de que se administren los compuestos terapéuticos de IL-10. Los adyuvantes que son particularmente preferidos incluyen, entre otros, manosa, sacarosa, glucosa, fosfato de calcio, dendrímeros, liposomas que incluyen liposomas catiónicos y oligodesoxinucleótidos. Los adyuvantes de la presente invención en realizaciones preferidas son aquellos adyuvantes que aumentan la captación o eficacia de la construcción de expresión de IL-10. La administración simultánea o el tratamiento previo incluye administrar a la articulación de aproximadamente 5 µg de adyuvante a aproximadamente 1000 µg de adyuvante, o de aproximadamente 10 µg de adyuvante a aproximadamente 750 µg de adyuvante, o de aproximadamente 50 µg de adyuvante a aproximadamente 500 µg de adyuvante, o de aproximadamente 25 µg de adyuvante a aproximadamente 750 µg de adyuvante en el momento de la administración o hasta 10 días antes de la administración del compuesto terapéutico antiinflamatorio IL-10.

Otras realizaciones alternativas proporcionan composiciones para su uso en métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las articulaciones en las que la composición comprende: una construcción de expresión de IL-10; micropartículas que encapsulan la construcción de expresión de IL-10; y un diluyente; donde la composición terapéutica de micropartículas proporciona una dosis terapéuticamente eficaz para una articulación de aproximadamente 20 µg de ADN a aproximadamente 1000 µg de ADN, o de aproximadamente 25 µg de ADN a aproximadamente 750 µg de ADN, o de aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 500 µg de ADN, o de aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 250 µg de ADN, o de aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 200 µg de ADN, o de aproximadamente 25 µg de ADN a aproximadamente 100 µg de ADN.

En otras realizaciones más, se incluyen métodos para ralentizar la progresión de enfermedades inflamatorias de las articulaciones en un sujeto que comprenden administrar al sujeto un compuesto terapéutico antiinflamatorio de IL-10 que comprende: ADN plasmídico que comprende una cadena principal bacteriana y al menos una secuencia codificante de IL-10, donde la construcción de expresión terapéutica de IL-10 proporciona una dosis terapéuticamente eficaz para una articulación de aproximadamente 1 µg de ADN a aproximadamente 1000 µg de ADN, de aproximadamente 5 µg de ADN a aproximadamente 900 µg de ADN, de aproximadamente 10 µg de ADN a aproximadamente 850 µg de ADN, de aproximadamente 20 µg de ADN a aproximadamente 800 µg de ADN, o de aproximadamente 25 µg de ADN a aproximadamente 750 µg de ADN, o de aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 500 µg de ADN, o de aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 250 µg de ADN, o de aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 200 µg de ADN, o de aproximadamente 25 µg de ADN a aproximadamente 100 µg de ADN. En dichas realizaciones, preferiblemente se administra un adyuvante con el compuesto terapéutico antiinflamatorio IL-10 o hasta 10 días antes de la administración del compuesto terapéutico antiinflamatorio IL-10, por ejemplo, como tratamiento previo.

Opcionalmente, en las realizaciones descritas, la construcción de expresión de IL-10 comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear localizada desde 100 a 2000 pb 5' hasta la al menos una secuencia codificante de IL-10 y/o desde 150 a 450 pb 3' hasta la al menos una secuencia codificante de IL-10. En otros aspectos de la presente invención, la construcción de expresión de IL-10 comprende dos secuencias de direccionamiento nuclear donde una secuencia de direccionamiento nuclear está localizada de 100 a 2000 pb 5' de la al menos una secuencia codificante de IL-10, y una secuencia de direccionamiento nuclear está localizada desde 150 a 450 pb 3' de la al menos una secuencia codificante.

En la invención, la composición terapéutica se administra mediante inyección en la articulación o articulaciones, y en realizaciones preferidas, la composición terapéutica se administra mediante inyección intraarticular.

En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica interleuquina-10 tiene una sustitución de aminoácido por fenilalanina de tipo silvestre en la posición de aminoácido 129, y en algunos aspectos, la sustitución de aminoácido se selecciona del grupo de serina, alanina, treonina o cisteína. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la interleuquina-10 codifica IL-10<sup>F129S</sup>. En otros aspectos, la construcción de expresión de IL-10 comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 5' a la secuencia codificante de IL-10, y en algunos aspectos, la construcción de expresión de IL-10 comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 3' a la secuencia codificante de IL-10.

En algunos aspectos de la presente invención, las micropartículas comprenden una o más de poli (metacrilato de 2-hidroxiétilo), poli (N-vinil pirrolidona), poli (metacrilato de metilo), poli (alcohol vinílico), poli (ácido acrílico), poliacrilamida, poli (etileno-co-acetato de vinilo), poli (etilenglicol), poli (ácido metacrílico), polilactidas (PLA), poliglicólidos (PGA), poli (lactida-co-glicólidos) (PLGA), polianhidridos, policaprolactona, poli-3-hidroxi-butirato o polioortoésteres. En ciertos aspectos de la presente invención, las micropartículas comprenden PLGA. En otros aspectos de la invención, las micropartículas comprenden una mezcla de polímeros biodegradables que representan diferentes perfiles de liberación complementarios.

En ciertas realizaciones de los métodos, la construcción de expresión de IL-10 antiinflamatoria terapéutica (y cualquier adyuvante o "tratamiento previo") se administra aproximadamente cada 40 a 120 días según sea necesario para el efecto terapéutico, por ejemplo, hasta un año. En otras realizaciones, la composición antiinflamatoria terapéutica se administra aproximadamente cada 40 a 120 días según sea necesario para un efecto terapéutico durante más de un año. En otras realizaciones más, la composición antiinflamatoria terapéutica se administra según sea necesario para un efecto terapéutico aproximadamente cada 40 a 120 días, según sea necesario, durante la vida del sujeto.

Los métodos descritos en el presente documento también pueden emplearse como una herramienta de investigación para identificar productos farmacéuticos, moléculas pequeñas y/o compuestos biológicos que pueden usarse conjuntamente con un "cóctel" con las composiciones de construcción de expresión terapéutica de IL-10.

### Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de los miembros anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención.

La Figura 2 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del propietario de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención.

La Figura 3 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención (datos agrupados).

La Figura 4 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del propietario de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención (datos agrupados).

La Figura 5 muestra los resultados que ilustran las mejoras en el rango de movimiento logrado en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención (datos agrupados).

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patente publicadas y patentes mencionadas en este documento tienen el propósito de describir y divulgar dispositivos, modelos animales, formulaciones y metodologías que se pueden usar en relación con la presente invención.

El término adyuvante, como se usa en el presente documento, se refiere a un agente farmacológico o inmunológico que modifica el efecto de otros agentes. En el contexto de la presente invención, se usa un adyuvante para aumentar la eficacia del compuesto terapéutico antiinflamatorio IL-10. Los adyuvantes de utilidad particular en la presente invención incluyen aquellos que mejoran la captación o eficacia de la construcción de expresión de IL-10 mediante, por ejemplo, macrófagos u otras células inmunitarias presentes en el líquido sinovial de la articulación.

El término "antiinflamatorio", como se usa en el presente documento, se refiere a disminuir la acción o producción de una o más citoquinas o proteínas proinflamatorias producidas por nervios, neuronas, células gliales, células endoteliales, fibroblastos, músculos, células inmunitarias u otros tipos de células.

El término "citoquina antiinflamatoria", como se usa en este documento, se refiere a una proteína que disminuye la acción o producción de una o más citoquinas o proteínas proinflamatorias producidas por nervios, neuronas, células gliales, células endoteliales, fibroblastos, músculo, células inmunitarias u otros tipos de células. Las citoquinas y proteínas inflamatorias incluyen, sin limitación, interleuquina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a),

interleuquina-6 (IL-6), sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y similares. Los ejemplos no limitantes de citoquinas antiinflamatorias incluyen interleuquina-10 (IL-10) que incluye IL-10 viral, interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-13 (IL-13), alfa-MSH, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1), y similares. Así, las moléculas de longitud completa y los fragmentos de citoquinas antiinflamatorias, así como las citoquinas antiinflamatorias con modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (ya sea de naturaleza conservativa o no conservativa), a la secuencia nativa, están destinadas para su uso en el presente documento, siempre que la citoquina antiinflamatoria sea terapéuticamente eficaz. Las modificaciones pueden ser deliberadas, tal como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR. Por consiguiente, las proteínas activas normalmente son homólogas a la secuencia original, por ejemplo, las proteínas son normalmente de alrededor el 70... 80... 85... 90... 95... 98... 99 %, etc. homólogas a la secuencia original.

Una "secuencia codificante" de una citoquina antiinflamatoria o una secuencia que "codifica" una citoquina antiinflamatoria es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias de control apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante nucleótidos correspondientes a un codón de inicio en el término amino y nucleótidos correspondientes a un codón de parada de la traducción en el término carboxi.

El término "secuencias de control" del ADN se refiere colectivamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores aguas arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma, potenciadores y similares, que colectivamente proporcionan la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No es necesario que todos estos tipos de secuencias de control estén presentes siempre que la secuencia codificante seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada.

Los términos "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" de una construcción de expresión terapéutica de IL-10 utilizada en los métodos de la invención se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente de la construcción de expresión de IL-10 para proporcionar la respuesta deseada, como una disminución de la inflamación de las articulaciones, el alivio de los síntomas causados por enfermedades inflamatorias de las articulaciones y/o la prevención de la progresión del daño articular debido a enfermedades inflamatorias de las articulaciones. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se esté tratando y la construcción de expresión de IL-10 particular que se administrará si la construcción de expresión de IL-10 se administra en una micropartícula o como ADN desnudo, el modo de administración (por ejemplo, inyección intraarticular), y similares. Los parámetros de dosificación para los presentes métodos se proporcionan en este documento; sin embargo, la optimización de una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la materia usando los métodos expuestos en el presente documento y la experimentación rutinaria.

El término "excipiente" o "diluyente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición terapéutica de la invención para facilitar la administración de la construcción de expresión de IL-10 terapéutica. Los ejemplos de excipientes, sin limitación, incluyen solución salina, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, ácido hialurónico opcionalmente formulado con un tensioactivo, Pluronic F-68, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Por "aislado" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos, se entiende que la construcción de expresión está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Por lo tanto, una "molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido particular" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido en cuestión; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de manera perjudicial las características básicas de la composición.

El término "articulación" se refiere a una estructura anatómica donde se unen dos huesos, incluidos los ligamentos que conectan los huesos entre sí, los tendones que unen los músculos a los huesos, la cápsula articular, las bolsas y la membrana sinovial. Las articulaciones que pueden tratarse con los métodos incluidos en el presente documento son articulaciones fijas, de bisagra, de pivote o de rótula.

El término "inflamación articular" se refiere a todos los tipos de artritis causada por la inflamación, donde la artritis reumatoide y la artrosis son las más comunes, así como la tendinitis, la bursitis, la inflamación del ligamento, la sinovitis, la gota y el lupus eritematoso sistémico.

El término "secuencia de direccionamiento nuclear" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona para mejorar la eficiencia de expresión de una citoquina antiinflamatoria en una célula.

"Unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos donde los componentes descritos están configurados para realizar su función habitual. Por lo tanto, las secuencias de control unidas operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de control

no necesitan ser contiguas con la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse "unida operativamente" a la secuencia codificante.

5 El término "promotor" se usa en este documento en su sentido ordinario para referirse a una región nucleotídica que comprende una secuencia reguladora de ADN, en donde la secuencia reguladora deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Los promotores de la transcripción pueden incluir "promotores inducibles" (donde la expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), "promotores reprimibles" (donde la expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.) y "promotores constitutivos".

15 Con el propósito de describir la posición relativa de las secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular a lo largo de la presente solicitud, por ejemplo, cuando se describe una secuencia de nucleótidos particular como situada "aguas arriba", "aguas abajo", "3 prima (3') o "5 prima (5)" en relación con otra secuencia, debe entenderse que es la posición de las secuencias en la cadena "sentido" o "codificante" de una molécula de ADN a la que se alude de forma convencional en la materia.

20 El término "herramienta de investigación", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier método de la invención que utilice las construcciones de expresión de IL-10 terapéuticas para investigación científica, ya sea de naturaleza académica o comercial, incluido el desarrollo de otros productos terapéuticos farmacéuticos y/o biológicos. Las herramientas de investigación de la invención no pretenden ser terapéuticas o estar sujetas a aprobación regulatoria; más bien, las herramientas de investigación de la invención están destinadas a facilitar la investigación y ayudar en dichas actividades de desarrollo, incluidas las actividades realizadas con la intención de producir información para respaldar una presentación reglamentaria.

25 Los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se pueden usar indistintamente en el presente documento y se refieren a un vertebrado, preferiblemente un mamífero.

30 El término "composición terapéutica" o "composición terapéutica antiinflamatoria", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que tiene la capacidad de disminuir la inflamación de las articulaciones, aliviar los síntomas causados por enfermedades inflamatorias de las articulaciones y/o prevenir la progresión del daño de la articulación debido a enfermedades inflamatorias de las articulaciones, medido en cualquiera de los modelos animales conocidos o por evaluación realizada en seres humanos.

35 El "tratamiento" de la inflamación de la articulación incluye: (1) disminuir la inflamación de la articulación o hacer que la inflamación se produzca con menos intensidad en un sujeto que puede estar predispuesto a la inflamación de la articulación pero que aún no experimenta o muestra síntomas, o (2) inhibir la inflamación articular, es decir, detener el desarrollo o revertir los síntomas o el daño fisiológico causado por la inflamación.

40 Un "vector viral" como se usa en este documento es un virus o partícula viral producido de manera recombinante que comprende una construcción de expresión de IL-10 para ser administrado en una célula huésped, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, vectores de virus asociados a adenovirus, vectores de alfavirus y similares.

45 La práctica de las técnicas descritas en este documento puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales y descripciones de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica y tecnología de secuenciación, que están dentro de las capacidades de aquellos que ponen en práctica la materia. Se pueden tener ilustraciones específicas de técnicas adecuadas por referencia a los ejemplos en este documento. Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio convencionales como LeDoux (Ed.) (2005), *Animal Models of Movement Disorders* (Academic Press); Chow, et al., (2008), *Using Animal Models in Biomedical Research* (World Scientific Publishing Co.); Weir and Blackwell (Eds.), *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (Blackwell Scientific Publications); Creighton (1993), *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company); Sambrook y Russell (2006), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; y Sambrook y Russell (2002), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (ambos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) *Biochemistry*, 4ª Ed. (W.H. Freeman); Gait (1984), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press); Nelson and Cox (2000), *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Third Ed. (W. H. Freeman); y Berg et al. (2002) *Biochemistry*, 5ª Ed. (W.H. Freeman).

50 Téngase en cuenta que tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

65 Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior

de ese rango y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese rango declarado, está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también se incluyen dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la materia que la presente invención puede ponerse en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito las características y procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para evitar oscurecer la invención.

### **Métodos de la invención**

La presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para tratar enfermedades inflamatorias de las articulaciones, los síntomas asociados con enfermedades inflamatorias de las articulaciones y la ralentización de la progresión de la enfermedad mediante la administración a un sujeto inyectado normalmente mediante inyección intraarticular de un vector que expresa una construcción de expresión de interleuquina 10 (IL-10) terapéutica. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de IL-10 se encapsula en micropartículas biodegradables, y en la mayoría de los aspectos de esta realización, las micropartículas se suspenden en un diluyente para formar una composición terapéutica. Como alternativa, en realizaciones preferidas, el vector de expresión terapéutico de IL-10 se administra como un vector "desnudo", en el que la administración del vector de expresión de IL-10 desnudo está acompañada o precedida por la administración de un adyuvante de captación de ácido nucleico. El adyuvante de captación de ácido nucleico puede administrarse simultáneamente o hasta diez o más días antes de la administración del vector de expresión de IL-10 desnudo. Los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar la inflamación articular en la rodilla, el codo, la muñeca, el tobillo, la cadera, el hombro o la columna vertebral. Las afecciones tratables por los métodos de la presente invención incluyen artritis reumatoide y artrosis, así como tendinitis, bursitis, inflamación del ligamento, sinovitis, gota y lupus eritematoso sistémico.

Por lo tanto, la invención generalmente proporciona las composiciones para su uso en métodos para tratar enfermedades inflamatorias de las articulaciones y síntomas y daños fisiológicos asociados con enfermedades inflamatorias de las articulaciones. La descripción también proporciona el uso de métodos en la investigación de enfermedades inflamatorias de las articulaciones, incluida la identificación de productos farmacéuticos, moléculas pequeñas y/o compuestos biológicos que se pueden usar en conjunto (en un "cóctel") con la construcción de expresión terapéutica de IL-10. Los métodos comprenden la etapa de administrar a un sujeto, preferiblemente mediante inyección en una articulación, una construcción de expresión de IL-10 que comprende una cadena principal bacteriana o viral y al menos una secuencia codificante de IL-10. En algunos casos, la construcción de expresión de IL-10 está opcionalmente encapsulada en micropartículas biodegradables. Las composiciones antiinflamatorias generalmente se suspenden en un diluyente para administrarse en una articulación. La construcción de expresión de IL-10 puede comprender al menos una secuencia de direccionamiento nuclear donde la al menos una secuencia de direccionamiento nuclear se encuentra en 5', 3' o ambas a la secuencia codificante de IL-10.

Los compuestos antiinflamatorios pueden consistir en un vector bacteriano "desnudo" o en un vector viral capaz de expresar al menos una secuencia codificante de IL-10, o el compuesto antiinflamatorio puede consistir en un vector bacteriano o viral incluido en micropartículas u otro dispositivo de administración. La administración de la construcción de expresión terapéutica de IL-10 puede ir acompañada o precedida por la administración de un adyuvante, y en el caso de administración de construcciones de expresión de IL-10 desnudas, se puede administrar un adyuvante de captación de ácido nucleico simultáneamente o hasta diez días o más antes de la administración de la construcción de expresión de IL-10 desnuda.

La construcción de expresión de IL-10 para su uso en el método de tratamiento de la presente invención comprende una cadena principal bacteriana (ADN plasmídico o ADNp), al menos una secuencia codificante de IL-10, al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 5' (aguas arriba), 3' (aguas abajo) o ambas de la al menos una secuencia codificante de IL-10 y una o más secuencias de control de ADN. Opcionalmente, el ADNp también puede comprender una o más secuencias codificantes de citoquinas antiinflamatorias adicionales, y/o una secuencia marcadora para permitir la selección de células transformadas durante la amplificación del ADNp. El esqueleto bacteriano puede ser cualquier esqueleto bacteriano conocido por los expertos en la materia. Los esqueletos seleccionados normalmente son aquellos que, por ejemplo, contienen o carecen de sitios de restricción apropiados para permitir la fácil clonación, pueden producirse y aislarse con facilidad, no son inmunogénicos y similares. Por ejemplo, los esqueletos bacterianos derivados de *E. coli* son útiles en la presente invención.

El ADN plasmídico comprende al menos una secuencia codificante de IL-10. La secuencia codificante de IL-10 puede codificar IL-10 de tipo silvestre, o la IL-10 puede ser una IL-10 mutante. Una IL-10 mutante de interés contiene una o más mutaciones que causan sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en comparación con la IL-10 de tipo silvestre en la región "bisagra" de la proteína IL-10. La proteína IL-10 humana es un

homodímero, donde cada monómero comprende seis hélices alfa A → F, cuya longitud es de 21, 8, 19, 20, 12 y 23 aminoácidos, respectivamente. Las hélices A → D de un monómero interactúan de manera no covalente con las hélices E y F de un segundo monómero, formando un homodímero no covalente en forma de V. La región "bisagra" dirigida a la mutación de acuerdo con la presente invención comprende los aminoácidos entre las hélices alfa D y E en uno o ambos monómeros en aproximadamente la posición X del aminoácido a la posición Y de IL-10 de tipo silvestre. Por ejemplo, se han descrito proteínas mutantes de IL-10 de rata y humanas en las que la fenilalanina en la posición 129 de la secuencia de tipo silvestre se ha reemplazado con un resto de serina. (Ver, por ejemplo, Sommer, et al., documento WO2006/130580 y Milligan, et al., Pain, 126: 294-308 (2006). La IL-10 mutante resultante se denomina IL-10<sup>F129S</sup>. Otras sustituciones para la fenilalanina de tipo silvestre en la posición del aminoácido 129 pueden ser, por ejemplo, treonina, alanina o cisteína. Por lo tanto, la presente invención en otro aspecto más abarca una o más sustituciones en la posición del aminoácido 129 o en otros aminoácidos dentro de la región bisagra de la proteína IL-10, o equivalentes funcionales de la misma.

Las citoquinas antiinflamatorias adicionales de uso en la presente invención incluyen pero no se limitan a interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-13 (IL-13), alfa-MSH, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) y similares.

Las secuencias de direccionamiento nuclear de la presente invención son secuencias que promueven la expresión de la proteína o proteínas codificadas por la al menos una secuencia codificante de IL-10 y la secuencia o secuencias codificantes de citoquinas antiinflamatorias opcionales adicionales. Por ejemplo, en un aspecto, las secuencias de direccionamiento nuclear pueden unirse a proteínas chaperonas de transporte nuclear, facilitando la captación del ADN plasmídico por el núcleo celular. Dichas secuencias incluyen, pero no se limitan a, repeticiones intercaladas (o dispersas) de ADN o secuencias repetitivas tales como elementos transponibles, repeticiones flanqueantes o terminales como las repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) en genomas de retrovirus como SV40, repeticiones en tándem, y las repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) de genomas virales como el virus asociado a adenovirus y el adenovirus. En otros aspectos, las secuencias de direccionamiento nuclear son secuencias que actúan para unirse a factores de transcripción para su importación en el núcleo, tales como secuencias potenciadoras.

Además de una cadena principal bacteriana, al menos una secuencia codificante de IL-10 y una o más secuencias codificantes de citoquinas antiinflamatorias opcionales y, opcionalmente, una o más secuencias de direccionamiento nuclear, el ADN plasmídico comprende una o más secuencias de control de ADN, tales como secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores aguas arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada de ribosomas y similares, que proporcionan colectivamente la replicación, transcripción y traducción de la secuencia o secuencias codificantes de citoquinas antiinflamatorias en un célula receptora. No es necesario que todas estas secuencias de control estén siempre presentes, siempre que las secuencias codificantes de citoquinas antiinflamatorias puedan replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada. Las secuencias promotoras de uso en el presente documento incluyen pero no se limitan a promotores de β-actina de pollo o humanos, promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus, promotores de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), promotor del factor de elongación 1α (eF1α), promotor de GFAP, promotor del virus de la leucemia murina (MLV), promotor de la timidina quinasa (TK) del herpes virus simple y promotores del elemento regulador postranscripcional (WPRE) del virus de la hepatitis de la marmota; los dominios reguladores aguas arriba de uso en la presente invención incluyen, entre otros, potenciadores del promotor temprano inmediato de citomegalovirus, potenciador del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) y potenciador del virus de simio 40 (SV40); y las señales de poliadenilación de interés en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la señal de poliadenilación de SV40, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, y señales de poliadenilación sintética. Opcionalmente, el ADN plasmídico también comprenderá un gen marcador de selección, como el que codifica la resistencia a antibióticos. Los genes marcadores de uso en el presente documento incluyen, entre otros, neomicina, higromicina B, ampicilina, kanomicina o puromicina.

Por ejemplo, se utilizaron plásmidos que comprenden la secuencia de IL-10 de rata flanqueada por dos ITR de AAV, un potenciador del promotor temprano inmediato de citomegalovirus, un promotor de β-actina de pollo, una señal de poliadenilación y un promotor de la timidina quinasa del herpes simple que dirige un marcador de resistencia a la neomicina en algunos experimentos que demuestran la utilidad de la presente invención. En otros experimentos, se utilizaron plásmidos que comprendían la secuencia de IL-10 humana flanqueada por dos ITR de AAV, un potenciador del promotor temprano inmediato de citomegalovirus, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus, una señal de poliadenilación y un marcador de resistencia a la ampicilina. Los detalles de estos plásmidos se describen en Milligan, et al., Pain 126: 294-308 (2006).

Alternativamente, el vector puede ser un vector viral. En general, las cinco clases de sistemas virales más utilizadas en la terapia génica se pueden clasificar en dos grupos según si sus genomas se integran en la cromatina celular del huésped (oncoretrovirus y lentivirus) o persisten en el núcleo celular predominantemente como episomas extracromosómicos (virus asociados a adenovirus, adenovirus, herpesvirus y lentivirus deficientes para la integración). Por ejemplo, en una realización de la presente invención, se utilizan virus de la familia Parvoviridae. Parvoviridae es una familia de pequeños virus de ADN de cadena simple, sin envuelta, con genomas de aproximadamente 5000 nucleótidos de longitud. Incluido entre los miembros de la familia es el virus asociado a



adenovirus (AAV), un parvovirus dependiente que, por definición, requiere coinfección con otro virus (generalmente un adenovirus o herpesvirus) para iniciar y mantener un ciclo infeccioso productivo. En ausencia de dicho virus auxiliar, el AAV aún es competente para infectar o transducir una célula diana mediante la unión y la internalización mediadas por el receptor, penetrando en el núcleo tanto en las células que no se dividen como en las que se dividen.

Otro sistema de administración viral útil con las construcciones de expresión de IL-10 de la presente invención es un sistema basado en virus de la familia Retroviridae. Los retrovirus comprenden virus animales de ARN de una sola cadena que se caracterizan por dos características únicas. Primero, el genoma de un retrovirus es diploide, que consiste en dos copias del ARN. En segundo lugar, este ARN se transcribe por la enzima asociada a al virión transcriptasa inversa en el ADN de doble cadena. Este ADN o provirus de doble cadena se puede integrar en el genoma del huésped y pasar de la célula madre a la progenie como un componente integrado de manera estable del genoma del huésped.

En algunos casos, los lentivirus son los miembros preferidos de la familia de retrovirus para su uso en este documento. Los vectores de lentivirus suelen estar pseudotipados con la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) y se derivan del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida (sida); visan-maedi, que causa encefalitis (visna) o neumonía en ovejas; virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), que causa anemia hemolítica autoinmunitaria y encefalopatía en caballos; el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), que causa la deficiencia inmunológica en gatos; virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV) que causa linfadenopatía y linfocitosis en el ganado bovino; y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), que causa la deficiencia inmunológica y encefalopatía en primates no humanos. Los vectores que se basan en el VIH generalmente retienen < 5 % del genoma parental y < 25 % del genoma se incorpora a las construcciones de empaquetamiento, lo que minimiza la posibilidad de que se genere un VIH competente para la replicación. La bioseguridad se ha incrementado aún más mediante el desarrollo de vectores autoinactivadores que contienen delecciones de los elementos reguladores en la secuencia de repetición terminal larga aguas abajo, eliminando la transcripción de la señal de empaquetamiento que se requiere para la movilización del vector. La principal ventaja del uso de vectores lentivirales es que la transferencia de genes es persistente en la mayoría de los tejidos o tipos de células debido a la integración del vector viral. Sin embargo, también podría usarse un lentivirus que sea deficiente en la integrasa.

Los adenovirus (Ads) son un grupo de virus homogéneos relativamente bien caracterizados, que incluye más de 50 serotipos. Ver, por ejemplo, Solicitud internacional PCT n.º WO 95/27071. Los adenovirus son virus icosaédricos de tamaño mediano (90-100 nm), sin envuelta (sin una bicapa lipídica externa) compuestos de una nucleocápside y un genoma de ADN lineal de doble cadena. Hay 57 serotipos descritos en seres humanos, que son responsables del 5-10 % de las infecciones respiratorias superiores en niños, y también de muchas infecciones en adultos. Se clasifican como grupo I según el esquema de clasificación de Baltimore, lo que significa que sus genomas están formados por ADN de doble cadena y son los virus sin envuelta más grandes. Debido a su gran tamaño, pueden ser transportados a través del endosoma (es decir, la fusión de la envuelta no es necesaria). El virión también tiene una "espiga" o fibra única asociada con cada base penton de la cápside que ayuda a unirse a la célula huésped a través del receptor coxsackie-adenovirus en la superficie de la célula huésped.

El genoma del adenovirus es un ADN lineal, no segmentado de doble cadena (ds) que está entre 26 y 45 kb, lo que permite que el virus lleve teóricamente de 22 a 40 genes. Aunque es significativamente más grande que otros virus en su grupo de Baltimore, todavía es un virus muy simple y depende en gran medida de la célula huésped para la supervivencia y la replicación. Una vez que el virus ha logrado ingresar a la célula huésped, el endosoma se acidifica, lo que altera la topología del virus al causar que los componentes de la cápside se disocien. Con la ayuda de microtúbulos celulares, el virus se transporta al complejo de poros nucleares, donde la partícula de adenovirus se desensambla. Posteriormente se libera ADN viral, que puede entrar en el núcleo a través del poro nuclear. Después de esto, el ADN se asocia con moléculas de histonas. Así, se puede producir la expresión génica viral y se pueden generar nuevas partículas de virus.

A diferencia de la mayoría de los vectores lentivirales (es decir, los que pueden integrarse, por ejemplo, no tienen deficiencia de integrasa), el ADN adenoviral no se integra en el genoma y no se replica durante la división celular. Las aplicaciones principales para el adenovirus son la terapia génica y la vacunación. También se han construido vectores derivados de adenovirus recombinantes, particularmente aquellos que reducen el potencial de recombinación y generación de virus de tipo silvestre. Ver, Solicitudes PCT internacionales n.º WO 95/00655 y WO 95/11984.

También se pueden usar otros sistemas virales o no virales conocidos por los expertos en la materia para administrar construcciones de expresión de IL-10 a la articulación, incluidos, entre otros, vectores de transposones de adenovirus con genes suprimidos que mantienen de forma estable transgenes codificados por virus *in vivo* a través de la integración en las células huésped (véase Yant, et al., Nature Biotech. 20: 999-1004 (2002)); sistemas derivados del virus Sindbis o del virus del bosque Semliki (véase Perri, et al., J. Virol. 74 (20): 9802-07 (2002)); sistemas derivados del virus de la enfermedad de Newcastle o virus Sendai; o vectores de ADN de mini-círculo desprovistos de secuencias de ADN bacteriano (véase Chen, et al., Molecular Therapy. 8 (3): 495-500 (2003)). El

ADN de mini-círculo como se describe en Publicación de Patente de EE.UU. n.º 2004/0214329 describe vectores que proporcionan niveles persistentemente altos de transcripción de ácido nucleico.

Una vez que la construcción de expresión de IL-10 se ha construido, amplificado y aislado mediante técnicas conocidas en la técnica, la construcción de expresión de IL-10 opcionalmente, en algunas realizaciones, se encapsula dentro de micropartículas. Las técnicas para encapsular la construcción de expresión de IL-10 varían dependiendo del tipo de micropartículas utilizadas y dichas técnicas se describen con más detalle a continuación. Las micropartículas pueden estar compuestas por cualquier polímero biodegradable. Para utilizarse con éxito como polímero biodegradable en las formulaciones de administración controlada de medicamentos, el material debe ser químicamente inerte y estar libre de impurezas lixiviables. Idealmente, el polímero también tiene una estructura física apropiada, con un mínimo de envejecimiento no deseado, y es fácilmente procesable. Algunos de los materiales incluyen poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), poli (N-vinil pirrolidona), poli (metacrilato de metilo), poli (alcohol vinílico), poli (ácido acrílico), poli(acrilamida), poli (etileno-co-acetato de vinilo), poli (etilenglicol) y poli (ácido metacrílico). Los polímeros biodegradables de uso particular incluyen polilactidas (PLA), poliglicólidos (PGA), poli (lactida-co-glicólidos) (PLGA), polianhídridos, policaprolactona, poli-3-hidroxibutirato y poliortoésteres. Dichos polímeros biodegradables se han caracterizado ampliamente y se pueden formular para que presenten las propiedades de degradación deseadas que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Edlund y Albertsson, Degradable Aliphatic Polyesters, pp. 67-112 (2002), Barman, et al. J. of Controlled Release, 69: 337-344 (2000); Cohen, et al., Pharmaceutical Res., (8): 713-720 (1991)).

En una realización particular de la invención, el polímero comprende poli (lactida-co-glicólidos) (PLGA). El PLGA es un copolímero que se utiliza en una serie de dispositivos terapéuticos aprobados por la FDA, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. El PLGA se sintetiza mediante copolimerización aleatoria con apertura del anillo de dos monómeros diferentes, los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) de ácido glicólico y ácido láctico. Los catalizadores comunes utilizados en la preparación de este polímero incluyen 2-etilhexanoato de estaño (II), alcóxidos de estaño (II) o isopropóxido de aluminio. Durante la polimerización, unidades monoméricas sucesivas de ácido glicólico o láctico se unen entre sí en el PLGA mediante enlaces éster, lo que produce un poliéster alifático lineal como producto.

Dependiendo de la relación de lactida a glicólido utilizada para la polimerización, se pueden obtener diferentes formas de PLGA: estas se identifican generalmente con respecto a la relación de monómeros utilizada (por ejemplo, PLGA 75:25 identifica un copolímero cuya composición es un 75 % (porcentaje molar) de ácido láctico y un 25 % (porcentaje molar) de ácido glicólico). El PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster en presencia de agua. Se ha demostrado que el tiempo requerido para la degradación de PLGA está relacionado con la relación de monómeros utilizada en la producción: cuanto mayor es el contenido de unidades de glicólido, menor es el tiempo requerido para la degradación. Una excepción a esta regla es el copolímero con una proporción de monómeros de 50:50 que exhibe la degradación más rápida (aproximadamente dos meses). Además, los polímeros que tienen un extremo protegido con ésteres (a diferencia del ácido carboxílico libre) muestran semi-vidas de degradación más largas. De uso particular en la presente invención es PLGA que tiene una composición de entre el 20 % y el 80 % de ácido láctico y entre el 80 % y el 20 % de ácido glicólico. Más preferido para su uso en este documento es PLGA que tiene una composición de entre el 65 % y el 35 % de ácido láctico y entre el 35 % y el 65 % de ácido glicólico. En un aspecto, se usa PLGA que tiene una composición del 50 % de ácido láctico y el 50 % de ácido glicólico.

Además, las construcciones de expresión de IL-10 (ADNp) se pueden encapsular en lotes de micropartículas que tienen diferentes perfiles de liberación; por ejemplo, el 10 % del ADNp que debe administrarse puede encapsularse en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de un día a cuatro semanas; el 30 % del ADNp que debe administrarse puede encapsularse en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de tres semanas a seis semanas; el 30 % del ADNp que debe administrarse se puede encapsular en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de seis semanas a diez semanas; y el 30 % del ADNp que debe administrarse se puede encapsular en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de ocho semanas a doce semanas. En una realización de este tipo, se puede usar un solo tipo de polímero biodegradable, pero se puede usar en formulaciones con diferentes perfiles de liberación; alternativamente, se pueden usar diferentes polímeros biodegradables con diferentes características de liberación. En otra realización más, la formulación de las micropartículas se puede variar para cambiar la superficie de las micropartículas para mejorar o retardar, según se desee, el recorrido de la composición terapéutica a través, por ejemplo, del fluido sinovial de la articulación.

Una vez que se obtienen las micropartículas, se suspenden en un diluyente aceptable para formar una composición terapéutica para su administración a un sujeto. De manera similar, si las construcciones de expresión de IL-10 de la presente invención se suministran como ADN desnudo en lugar de estar encapsulados, también se usan diluyentes para la administración al sujeto. Dichos diluyentes (o excipientes) incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que se puede administrar sin una toxicidad indebida. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden comprender sorbitol, alumbre, dextrano, sulfato, aniones poliméricos grandes, cualquiera de los diversos compuestos TWEEN y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol o etanol, emulsiones de aceite y agua o adyuvantes tales como adyuvante de Freund. También pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales

tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. En un aspecto de la invención, se usan diferentes diluyentes en función de su capacidad para migrar a través del sitio objetivo en la articulación. Por ejemplo, para la administración en un ser humano adulto, se pueden preferir diluyentes que favorezcan una diseminación más rápida de la composición terapéutica a través de la articulación; a la inversa, en niños o animales pequeños donde el tamaño de la articulación es menos preocupante, se puede usar un diluyente que no disperse rápidamente la composición terapéutica. Una discusión completa de los diluyentes/excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005). Los diluyentes preferidos incluyen, entre otros, Physiosol®, líquido sinovial artificial, NaCl al 0,9 % sin conservantes, solución para inyección de Ringer con lactato y solución de Elliotts B®.

Sintetizar y administrar las composiciones para el uso de la invención implica una serie de pasos. En primer lugar, se construye un plásmido que comprende los diversos componentes descritos anteriormente. Luego, el ADN plasmídico (ADNp) se amplifica y se aísla mediante técnicas bien conocidas en la materia. Una vez que se aísla el ADNp, se puede combinar con polímeros para formar micropartículas que contienen ADNp. Los métodos para la formación de micropartículas varían dependiendo de los polímeros utilizados, sin embargo, normalmente se emplea una técnica de doble emulsión. Primero, un polímero se disuelve en un solvente orgánico. A continuación, el ADNp se suspende en una solución acuosa y se añade a la solución de polímero. Las dos soluciones se mezclan para formar una primera emulsión. Las soluciones se pueden mezclar mediante un vórtex o agitación o mediante el paso a través de un medio particulado que produce turbulencias, o la mezcla se puede sonicar. Lo más preferible es cualquier método por el cual el ácido nucleico reciba la menor cantidad de daño en forma de corte, cizallamiento o degradación. Sin dejar de permitir la formación de una emulsión apropiada. Durante este proceso, el polímero se forma en micropartículas, muchas de las cuales contienen ADNp. Si se desea, se puede aislar una pequeña cantidad de ácido nucleico en este punto para evaluar la integridad, por ejemplo, mediante electroforesis en gel.

La primera emulsión se añade entonces a una solución orgánica. La solución puede comprender, por ejemplo, cloruro de metileno, acetato de etilo o acetona, que normalmente contiene alcohol polivinílico (PVA), y con frecuencia tiene una relación de aproximadamente 1:100 del peso de PVA al volumen de la solución. La primera emulsión generalmente se añade a la solución orgánica con agitación en un homogeneizador o sonicador. Este proceso forma una segunda emulsión que luego se añade a otra solución orgánica con agitación (por ejemplo, en un homogeneizador). En un aspecto de este método, la última solución es el 0,05 % en p/v de PVA. Las micropartículas resultantes se lavan varias veces con agua para eliminar los compuestos orgánicos. En algunos aspectos, más del 40 % de las micropartículas resultantes contienen ADNp. En otros aspectos, más del 50 % de las micropartículas resultantes contienen ADNp, en otros aspectos, más del 55 % de las micropartículas resultantes contienen ADNp.

La capacidad para internalizar micropartículas de diferentes tamaños varía según el tipo de célula. En ciertas realizaciones, los macrófagos y las células presentadoras de antígenos fueron la diana. Estas células internalizan de manera más eficiente las micropartículas de menos de aproximadamente 5  $\mu$  (véase Shakweh, et al., Eur J de Pharmaceutics and Biopharmaceutics 61 (1-2):1-13 (2005)). Por lo tanto, si se desea, las partículas pueden pasar a través de tamices de tamaño para eliminar de manera selectiva aquellas más grandes que el tamaño deseado. En un aspecto particular, se usan micropartículas de menos de 5  $\mu$  en la composición terapéutica, y en otros aspectos particulares, se usan micropartículas de menos de 3  $\mu$  en la composición terapéutica. Después del lavado, las partículas se pueden usar inmediatamente o se pueden liofilizar para su almacenamiento. La distribución de tamaño de las micropartículas preparadas por los métodos descritos en este documento se puede determinar, por ejemplo, con un contador Coulter™ o difracción láser. Alternativamente, el tamaño promedio de las partículas se puede determinar mediante visualización bajo un microscopio equipado con un portaobjetos o un ocular. Alternativamente, se puede utilizar un microscopio electrónico de barrido para evaluar tanto el tamaño como la morfología de las micropartículas.

Una vez que se obtienen las micropartículas que contienen la construcción de expresión de IL-10, las micropartículas se pueden suspender inmediatamente en diluyente o liofilizar para su almacenamiento. La combinación de las micropartículas y el diluyente forma la composición terapéutica de micropartículas que puede administrarse mediante inyección en una articulación a un sujeto animal. Los vectores recombinantes pueden introducirse *in vivo* o *in vitro* (también denominado *ex vivo*) para tratar la inflamación articular. Si se transduce *in vitro*, la célula receptora deseada o el líquido sinovial se extraen del sujeto, se tratan con micropartículas que contienen ADNp y se reintroducen en el sujeto. Alternativamente, las células singénicas o xenogénicas pueden transformarse para su administración cuando dichas células normalmente no generan una respuesta inmunitaria inapropiada en el sujeto. Si se administran *in vivo*, los vectores recombinantes o las células transformadas con los vectores *in vitro* se administran directamente mediante inyección en la articulación.

Las construcciones de expresión de IL-10 se administran, en una realización alternativa, como ADN desnudo. En tal caso, las construcciones de expresión de IL-10 se amplifican, por ejemplo, utilizando prácticas de fabricación de buena calidad. Las GMP se aplican en los Estados Unidos por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), conforme a la Sección 501 (B) de la Ley de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de 1938

(21 USCS § 351).

Los adyuvantes apropiados para el presente uso incluyen adyuvantes que aumentan la captación de las construcciones de expresión de IL-10 de la presente invención; es decir, los adyuvantes apropiados incluyen cualquier agente biológicamente compatible que neutralice u obvie el problema de introducir ADN cargado negativamente en células con una membrana cargada negativamente. Dichos adyuvantes incluyen azúcares tales como manosa, glucosa y sacarosa; fosfato de calcio; dendrímeros (moléculas ramificadas repetitivamente); liposomas (vesículas esféricas que comprenden una bicapa lipídica) que incluyen liposomas catiónicos; DEAE-dextrano incluyendo polietilénimina de DEAE-dextrano; oligodesoxinucleótidos; y ácido hialurónico de alto peso molecular (> 1 MDa), un glicosaminoglicano aniónico no sulfatado.

Un adyuvante de particular interés es la D-manosa. La D-manosa es un azúcar de hexosa simple con un peso molecular de 180,2 y se sabe que: disminuye los procesos inflamatorios durante la cicatrización de heridas (Kossi J, et al., *Eur Surg Res*, 31 (1): 74-82 (1999)), reduce explosiones oxidativas requeridas durante la inflamación (Rest RF, et al., *J Leukoc Biol*, 43 (2):158-164 (1988)), suprimen la artritis inducida por adyuvante en un modelo de rata (Willenborg DO, et al., *Immunol Cell Biol*, 70 (Pt 6): 369-377 (1996)), inhiben la IL-1 $\beta$  inducida por LPS, TNF- $\alpha$ , disminuyen el NF-kB/p65 crítico para la expresión de citoquinas proinflamatorias y disminuyen el influjo de leucocitos después de la instilación intratraqueal de LPS, que es un modelo de lesión pulmonar aguda asociada a sepsis y síndrome de dificultad respiratoria (Xu XL, et al., *Inflamm Res*, 57 (3):104-110 (2008); Xu X, et al., *Eur J Pharmacol*, 641 (2-3): 229-237 (2010)). El MR es un receptor de reconocimiento de patrones de glucoproteína transmembrana involucrado en la defensa del huésped de la inmunidad innata mediante el reconocimiento de ligandos manosilados (por ejemplo, hidrolasas lisosomales) que pueden incluir varias bacterias, levaduras y parásitos que expresan moléculas manosiladas (véase, por ejemplo, Engering AJ, et al., *Adv Exp Med Biol*, 417:183-187 (1997); Linehan SA, y al., *Adv Exp Med Biol*, 479:1-14 (2000); Stahl PD, y al., *Curr Opin Immunol*, 10 (1): 50-55 (1998)).

Debido a que las composiciones terapéuticas no inducen significativamente una respuesta inmunitaria o tolerancia a la dosis en los sujetos, pueden administrarse según sea necesario para el efecto terapéutico. Es decir, la composición antiinflamatoria terapéutica puede administrarse aproximadamente cada 40 a 120 días (o según sea necesario) según sea necesario para el efecto terapéutico para la terapia a corto plazo. Sin embargo, cuando se desea una terapia a más largo plazo, la composición terapéutica puede administrarse aproximadamente cada 40 a 120 días (o más o menos) según sea necesario para un efecto terapéutico durante más de un año; y si es necesario, durante la vida del sujeto. La frecuencia de dosificación depende de la dosificación, el adyuvante utilizado y la salud del sujeto.

Los rangos de dosificación de las composiciones terapéuticas utilizadas en los métodos de la presente invención varían de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el sitio de la articulación y la construcción de expresión de IL-10 particular a administrar, de si la construcción de expresión de IL-10 está encapsulada o no, el modo de administración y similares. Los rangos de dosificación incluyen una dosis terapéuticamente efectiva por articulación a aproximadamente 1-1000  $\mu$ g de vector de ADN, aproximadamente 5-750  $\mu$ g de vector de ADN, aproximadamente 10-600  $\mu$ g de vector de ADN, 20-500  $\mu$ g de vector de ADN, 25-250  $\mu$ g de vector de ADN, o 50-100  $\mu$ g de vector de ADN.

Las construcciones de expresión de IL-10 o las micropartículas que contienen las construcciones de expresión de IL-10 utilizadas en los métodos de la presente invención pueden coadministrarse en un cóctel con otros agentes terapéuticos útiles para tratar la inflamación de las articulaciones, incluidos los glucocorticoides; metotrexato; hidroxiclloquina; sulfasalazina; lefunomida; agentes anti-TNF como etanercept, infliximab y adalimumab; abatacept; ácido hialurónico, particularmente ácido hialurónico de alto peso molecular (> 1 MDa) como Hyalgan, Orthovisc o Synvisc en una dosis de, por ejemplo, 0,5-2,5 % (5 a 25 mg/ml) de 1 a 5 ml, y por tanto de 5 mg a 125 mg por articulación; y antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Adicionalmente, las construcciones de expresión de IL-10 o micropartículas que contienen las construcciones de expresión de IL-10 utilizadas en los métodos de la presente invención pueden coadministrarse con células, como las células madre mesenquimáticas u otras células madre, incluidas las células madre desarrolladas mediante bioingeniería para expresar construcciones de expresión de IL-10. En general, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para controlar el éxito del tratamiento en seres humanos, incluidos los indicadores clínicos y fenotípicos.

Objetos adicionales, ventajas y características novedosas de esta invención se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. En los ejemplos, los procedimientos que se reducen constructivamente a la práctica se describen en tiempo presente, y los procedimientos que se han llevado a cabo en el laboratorio se exponen en tiempo pasado.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo realizar y utilizar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni tienen la intención de representar o implicar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse

numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se muestra en las realizaciones específicas sin apartarse del alcance de la invención como se describe ampliamente. Las presentes realizaciones, por lo tanto, deben considerarse en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

- 5 Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión está a o cerca de presión atmosférica.

#### 10 Amplificación y purificación de ADNp

La construcción de plásmido que codifica la interleuquina-10 de rata (ADNp-IL-10F129S) se describió previamente en detalle en Milligan, et al., Pain 126 (1-3): 294-308 (2006). En resumen, el plásmido consiste en un ADN plasmídico circular de 5,9 kilobases (Kb) que contiene un casete de transcripción que consiste en un potenciador de citomegalovirus/promotor de beta-actina de pollo (CMV enh/CB pro) que dirige la expresión del gen IL-10 de rata que contiene una mutación puntual (F129S) y una señal de poliadenilación viral de SV40. El casete de transcripción está flanqueado por una secuencia de repetición terminal invertida de 149 pb. Se utilizó un plásmido idéntico que carece del gen IL-10 como control de ADNp. Ambos plásmidos se amplificaron en células de *E. coli* supercompetentes SURE 2 (Agilent Technologies, EE.UU.) y se aislaron utilizando un kit de purificación de plásmidos Giga libres de endotoxinas (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos purificados, libres de endotoxinas se resuspendieron en PBS estéril de Dulbecco (DPBS, 1, filtrados por poros de 0,1 micrómetros, pH 7,2, n.º de catálogo 14190-144; Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY, EE.UU.) con el 3 % de sacarosa (DPBS-3 %). El vehículo DPBS-3 % se preparó utilizando D(+)-sacarosa de grado para biología molecular (b-D-fructofuranosil-a-D-glucopiranosido; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en DPBS, filtrado estéril a 0,2 µm (unidad de filtro de jeringa sin pirógenos, n.º de catálogo 25AS020AS, Life Science Products, Inc., CO, EE.UU.) y almacenados en tubos cónicos estériles de 15 ml a 4 °C hasta el momento de uso.

#### Preparación y caracterización de micropartículas.

30 Las micropartículas se prepararon utilizando un protocolo de evaporación de emulsión doble/disolvente modificado (AM Tinsley-Bown, et al., J. of Controlled Release 66 (2-3): 229-41 (2006)). En resumen, se disolvió un copolímero de PLGA 50:50 (MW 75.000, Lactel Absorbable Polymers) en acetato de etilo (Sigma). El vehículo solo (solución salina tamponada con fosfato (PBS) + 3 % (p/v) sacarosa (Sigma)) o ADNp en vehículo se emulsionó en la solución de PLGA seguido de una segunda emulsión en un 5 % (p/v) de alcohol polivinílico, 28 % de cloruro de calcio, 3 % de sacarosa (Sigma) y 7 % (v/v) de solución de acetato de etilo. Después de 4 horas de endurecimiento en una solución de lavado, las micropartículas resultantes se recogieron, se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C. Se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) para examinar la morfología de micropartículas. Los diámetros de > 1000 micropartículas presentes en 10 imágenes diferentes se midieron con el software NIH ImageJ y se utilizaron diámetros de partículas agrupadas para generar una distribución de frecuencia normalizada. El potencial zeta de las micropartículas se midió con un analizador de potencial Zeta Nicomp 380 ZLS, y los niveles de endotoxinas de las micropartículas resultantes se analizaron mediante el ensayo LAL, utilizando dilución en serie como control para la inhibición. Las micropartículas utilizadas mostraron una morfología esférica y suave bajo SEM y un potencial zeta de  $-28,04 \pm 2,12$  mV. Las micropartículas mostraron una distribución de tamaño heterogénea con un diámetro medio total de  $4,67 \pm 0,26$  µm, que es consistente con métodos similares de fabricación de micropartículas y la eficiencia de encapsulación de ADNp de las partículas fue del 55,1 %.

La encapsulación de ADNp total se evaluó mediante la extracción de ADNp de micropartículas a través de la disolución de hidróxido de sodio, midiendo la absorbancia a 260 nm y comparando los valores obtenidos con patrones de ADN en concentraciones conocidas. Las cargas finales de ADNp fueron  $8,78 \pm 0,65$  µg de ADNp/mg de PLGA para micropartículas de PLGA-ADNp-IL-10. La extracción acuosa de ADNp se llevó a cabo disolviendo micropartículas en cloroformo y permitiendo que el ADNp migrara a un tampón acuoso. El ADNp extraído se concentró posteriormente mediante precipitación con etanol y se resuspendió en vehículo de PBS + sacarosa al 3 %. La integridad estructural del ADNp extraído acuoso se comparó con el ADNp no encapsulado (que se expuso de manera similar al proceso de extracción acuosa) cargando 2 µg de ADNp total en los pocillos de un gel de agarosa al 1,0 % que contiene bromuro de etidio, corriendo el gel a 75 V durante 2 horas, y obteniendo imágenes del gel con transiluminación UV a 305 nm. La actividad biológica del ADNp extraído acuoso se evaluó mediante la transfección mediada por lipofectamina en células 293 de riñón embrionarias humanas de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen) y se evaluaron las concentraciones de proteína IL-10 en sobrenadantes de cultivos celulares recogidos 24 horas después de la transfección con ADNp extraído acuoso y no encapsulado por ELISA (R&D Systems). El perfil de liberación *in vitro* se realizó incubando micropartículas en PBS a lo largo del tiempo en un baño de agua a 37 °C y los contenidos de ADNp en el sobrenadante se cuantificaron mediante un ensayo PicoGreen (Milligan, et al., Neuron Glia Biology 2 (4) 293-308 (2006)).

65 La electroforesis en gel de agarosa del ADNp acuoso extraído de micropartículas en comparación con el ADNp no encapsulado indicó que una cantidad significativa del ADNp relajado y superenrollado había preservado la integridad estructural después de la encapsulación, aunque se observó una ligera detección del ADNp linealizado y ligeras

alteraciones en la migración de las especies de ADNp multimérico después de la encapsulación. Al comparar los niveles de expresión de la proteína IL-10 resultantes en los sobrenadantes de células 293 de riñón embrionario humano 24 horas después de la transfección mediada por lipofectamina con ADNp-IL-10 extraído de micropartículas de dosis igualada, se determinó que el ADNp-IL-10 extraído de micropartículas exhibió una retención de la actividad biológica del 96,8 % para la producción resultante de IL-10 (datos no mostrados). El análisis de liberación *in vitro* de ADNp demostró que el 30 % del ADNp se liberó después de 3 días y se logró una liberación constante durante más de 75 días. Este perfil de liberación de dos fases es una característica común de la liberación de macromoléculas a partir de micropartículas de PLGA basadas en emulsión, donde la fase mejorada de la liberación de ADNp inicial se debe a un mayor contenido de ADNp en o cerca de la superficie de las micropartículas, seguida de una liberación sostenida y la difusión de ADNp desde el interior de la micropartícula (Yeo, Archive of Endotoxin Res. 27 (1):1-12 (2004)). Los niveles de endotoxinas de micropartículas con y sin ADNp encapsulado estuvieron por debajo de los límites de detección para el ensayo LAL hasta una concentración de micropartículas de 10 mg/ml (1 mg de micropartículas/pocillo).

#### 15 D-manosa

En realizaciones en las que se emplea un adyuvante como la D-manosa, la D-manosa (número de catálogo M6020) se puede comprar sin vehículo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La D-manosa se combina con BSA al 0,1 % en solución salina estéril y se administra mediante inyección intraarticular simultáneamente con la construcción de expresión de IL-10 o de uno a diez días antes de la administración de la construcción de expresión de IL-10. La D-manosa normalmente se administra a una dosis de 2,5 µg-500 µg por articulación en perros.

#### Administración para el tratamiento de la inflamación articular en perros

25 La construcción de expresión de IL-10 (ADNp-IL-10<sup>F129S</sup>) como ADNp "desnudo" se administró mediante inyección intraarticular aguda a una articulación afectada en una serie de perros. Bajo sedación intravenosa y control anestésico, la articulación afectada del perro se recortó quirúrgicamente para eliminar todo el pelaje sobre la articulación afectada y se esterilizó utilizando un lavado quirúrgico, como clorhexidina al 2 %. La frecuencia cardíaca, la presión arterial, la saturación de oxígeno, la ventilación y el ritmo cardíaco del perro se controlaron continuamente. Se insertó una aguja hipodérmica de calibre 22 o 20 en el espacio sinovial. Se aspiró líquido sinovial antes de la administración del ADNp para asegurar la colocación correcta de la aguja. La jeringa que contenía aspirado de líquido sinovial se reemplazó mientras se mantenía la colocación de la aguja intraarticular. Una vez que se aspiró el líquido sinovial, se administró la composición terapéutica antiinflamatoria en la articulación utilizando la misma aguja intraarticular. Se inyectó hasta 1 mg de ADN plasmídico equivalente, aunque se encontró que tan solo 700 µg eran efectivos. Cuando el volumen por inyección en la articulación durante la administración superó 1 ml, se aspiró el líquido de la articulación para compensar. Después de la colocación con éxito de la composición antiinflamatoria terapéutica dentro del espacio articular, se revertieron los efectos sedantes sobre el perro y se controló clínicamente. Cualquier cambio en la presión arterial, frecuencia cardíaca, oxigenación, ventilación o ritmo cardíaco durante el procedimiento se corrigió con los tratamientos médicos adecuados. Los efectos anticipados de la sedación incluyen bradicardia, hipotensión, o hipoventilación. La terapia de oxígeno fue continua durante todo el procedimiento para maximizar los niveles de saturación de oxígeno. Medicamentos sedantes adaptados a pacientes individuales y medicamentos únicos o combinaciones de los siguientes:

- 45 A: Dexmedetomidina 0,5 mg/m<sup>2</sup>, Reversión (atipamazol 0,05-0,2 mg/lb)  
 B: Opioides - Butorfanol (0,05-0,1 mg/lb),  
 C: Propofol - iv para su efecto  
 D: Benzodiacepinas (diazepam): 0,1-0,2 mg/lb

50 Los sujetos permanecieron en el centro veterinario durante el día (menos de 12 horas) y luego se les permitió ir a casa.

Las evaluaciones clínicas incluyeron evaluaciones del comportamiento por parte del propietario del Inventario de Dolor Breve Canino, la Escala Analógica Visual clínica veterinaria para el dolor y la movilidad, goniometría, reducción/dependencia farmacéutica y control de vídeo y de la marcha. La Figura 1 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de los miembros anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención. Téngase en cuenta que la administración de las construcciones de expresión de IL-10 de la presente invención dio como resultado una mejora funcional significativa y una reducción del dolor, en la marcha, el trote, la manipulación, el rango de movimiento y la discapacidad funcional, particularmente en la marca de las 11 semanas.

La Figura 2 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del propietario de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención. Téngase en cuenta que, nuevamente, hubo una mejora significativa en todos los parámetros de actividad, calidad de vida, levantarse, caminar, correr y subir escaleras, incluso a la semana.

5 La Figura 3 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención (datos agrupados). Los resultados de la evaluación clínica muestran resultados positivos significativos, particularmente en el dolor.

10 La Figura 4 muestra los resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del propietario de la mejora funcional y la reducción del dolor lograda en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención (datos agrupados). Téngase en cuenta en estos resultados, similares a los resultados en la Figura 2, que hubo una mejora significativa en todos los parámetros de actividad, calidad de vida, levantarse, caminar, correr y subir escaleras, incluso a la semana.

15 La Figura 5 muestra los resultados que ilustran las mejoras en el rango de movimiento logrado en el tratamiento de la artrosis de las articulaciones de las extremidades anteriores en perros después de la administración de las construcciones de expresión terapéutica de IL-10 de la presente invención (datos agrupados). Téngase en cuenta que el cambio en los grados de ángulo mostró una mejora significativa.

20 La discusión anterior de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción. Lo anterior no pretende limitar la invención a la forma o formas descritas en este documento. Aunque la descripción de la invención ha incluido la descripción de una o más realizaciones y ciertas variaciones y modificaciones, otras variaciones y modificaciones están dentro del alcance de la invención, por ejemplo, como puede estar dentro de las capacidades y el conocimiento de los expertos en la materia, después de comprender la presente divulgación. Se pretende obtener  
25 derechos que incluyan realizaciones alternativas en la medida permitida, incluidas estructuras, funciones, rangos o pasos alternativos, intercambiables y/o equivalentes a los reivindicados, independientemente de que dichas estructuras, funciones, rangos o pasos alternativos, intercambiables y/o equivalentes se describan en el presente documento, y sin la intención de dedicar públicamente ningún objeto patentable.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una construcción de expresión de IL-10 de plásmido bacteriano, en la que la construcción de expresión de IL-10 comprende una cadena principal bacteriana y una secuencia de ácido nucleico que codifica interleuquina-10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad articular inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método inyectar la composición en una articulación inflamada del sujeto.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que en el método la construcción de expresión de IL-10 se administra con un adyuvante.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el adyuvante se selecciona entre D-manosa, sacarosa, glucosa, fosfato de calcio, dendrímeros, oligonucleótidos, ácido hialurónico de alto peso molecular o liposomas.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica interleuquina-10 tiene una sustitución de aminoácido de serina, alanina, treonina o cisteína por fenilalanina de tipo silvestre en la posición del aminoácido 129.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica la interleuquina-10 codifica IL-10<sup>F129S</sup>.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la construcción de expresión comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 5' a la secuencia codificante de IL-10.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la construcción de expresión comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 3' a la secuencia codificante de IL-10.
- 40 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enfermedad articular inflamatoria es artritis, tendinitis, bursitis, inflamación del ligamento, sinovitis, gota y lupus eritematoso sistémico.
- 45 9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende micropartículas que encapsulan la construcción de expresión.
- 50 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que las micropartículas comprenden un polímero que comprende poli (ácido láctico-co-glicólico).
- 55 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que las micropartículas comprenden un polímero que comprende 50:50 de poli (ácido láctico-co-glicólico).
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el método comprende administrar una composición que comprende 1-1000 µg de una construcción de expresión de IL-10 bacteriana y 5-1000 µg de D-manosa.
13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde en el método la D-manosa se administra conjuntamente con la construcción de expresión de IL-10.
14. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en el método la D-manosa se administra hasta diez días antes de la administración de la construcción de expresión de IL-10.
15. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ADN plasmídico comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear tanto 5' como 3' a la secuencia codificante de IL-10.



Figura 1

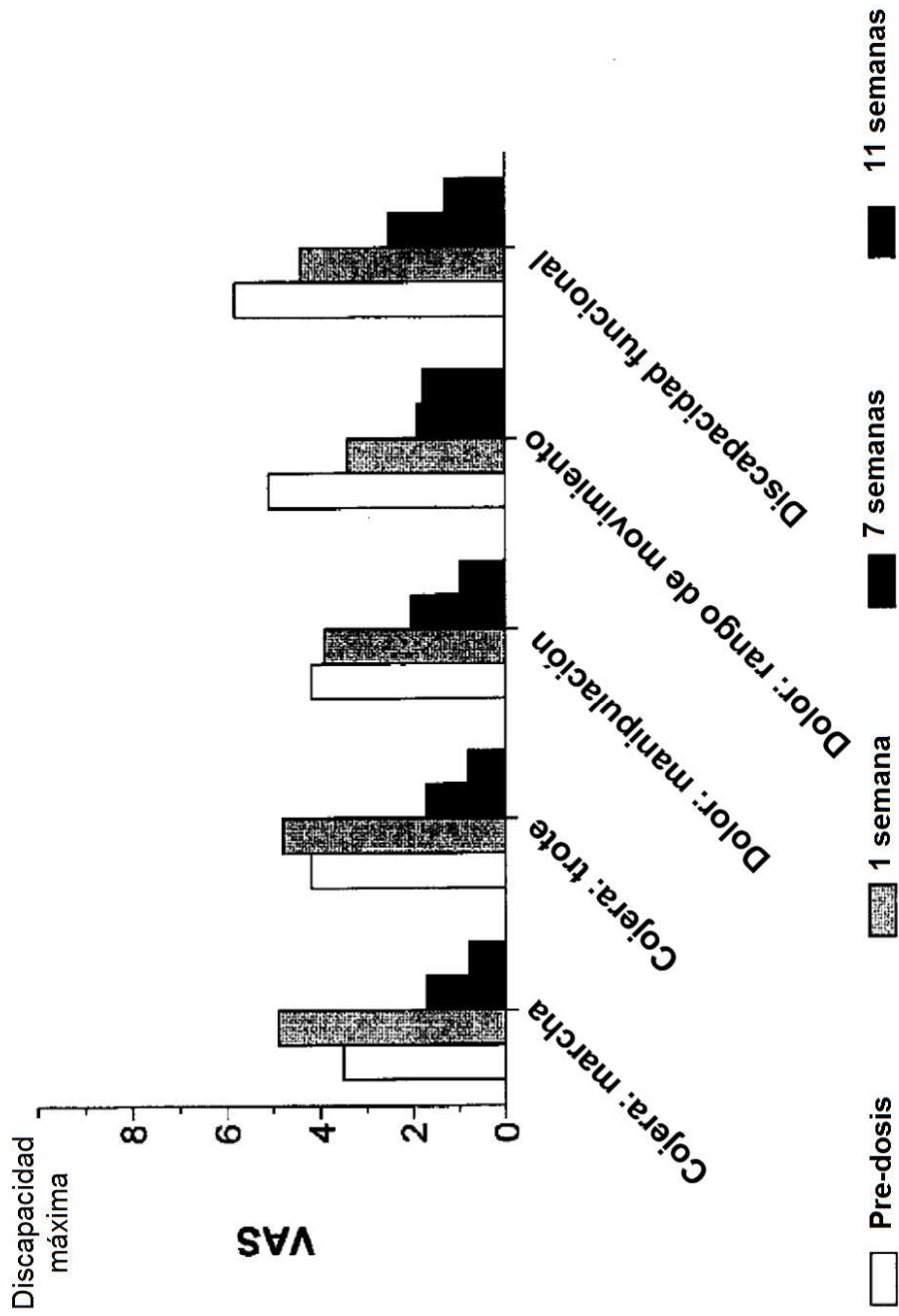


Figura 2

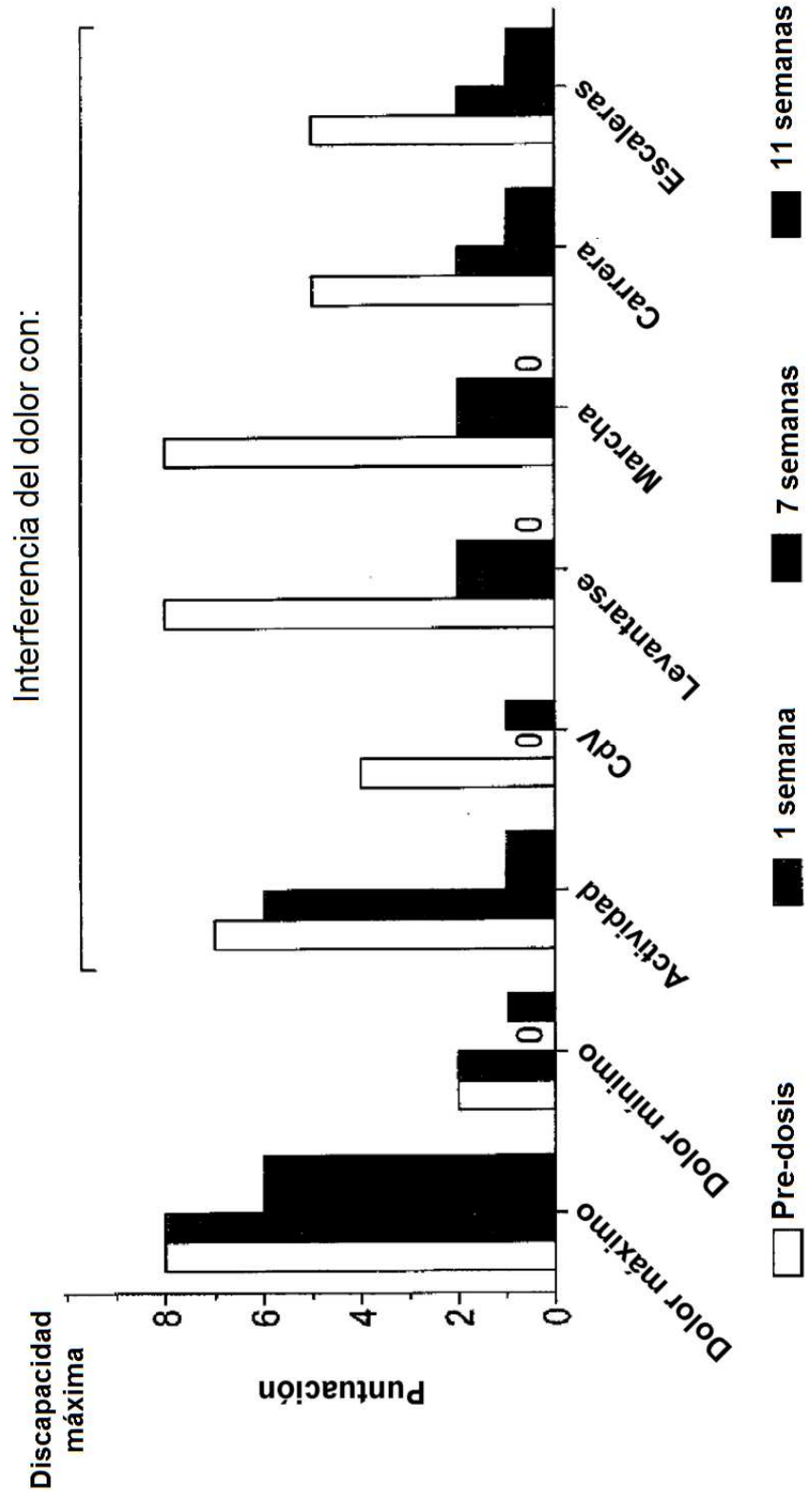
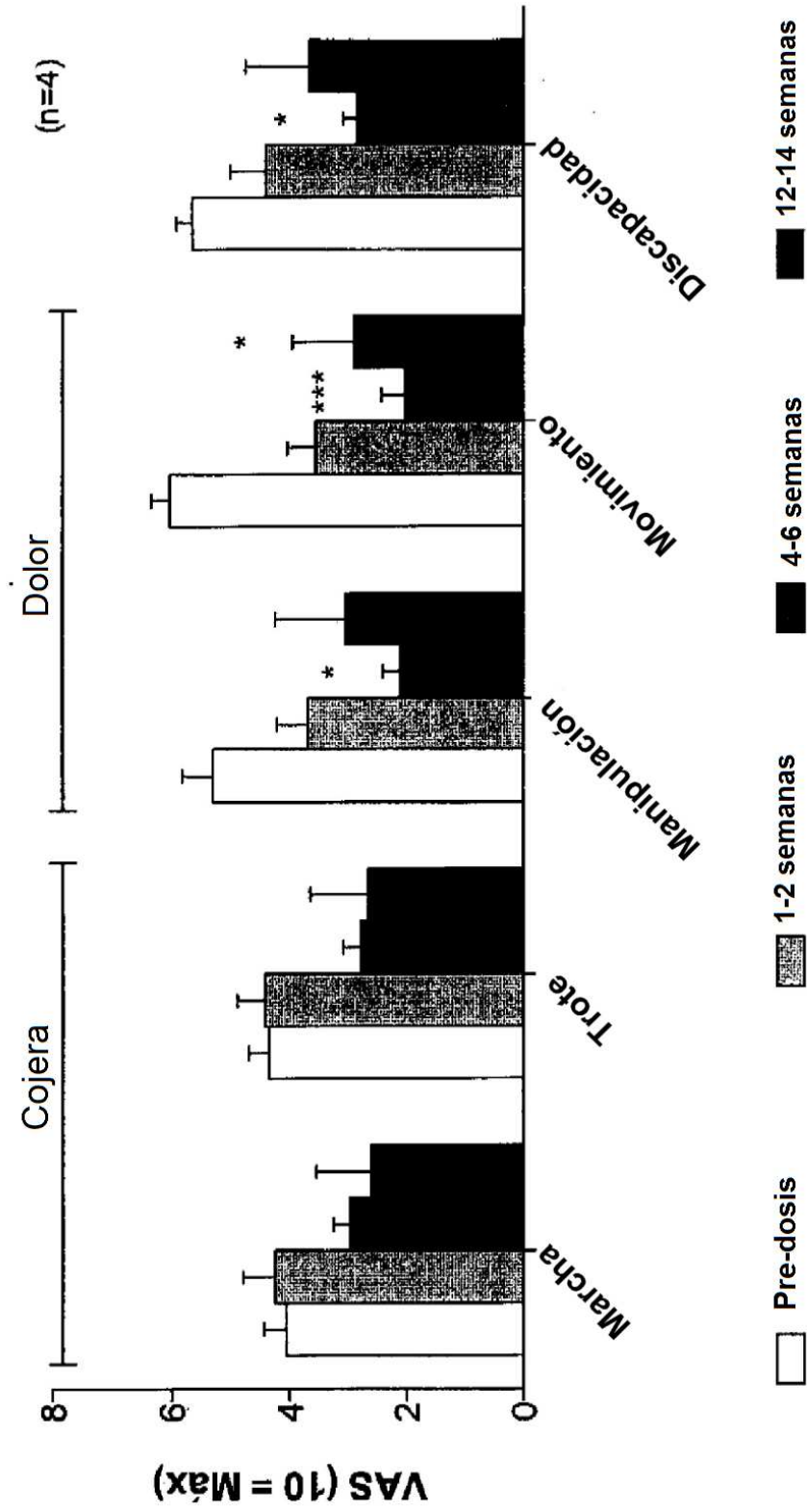
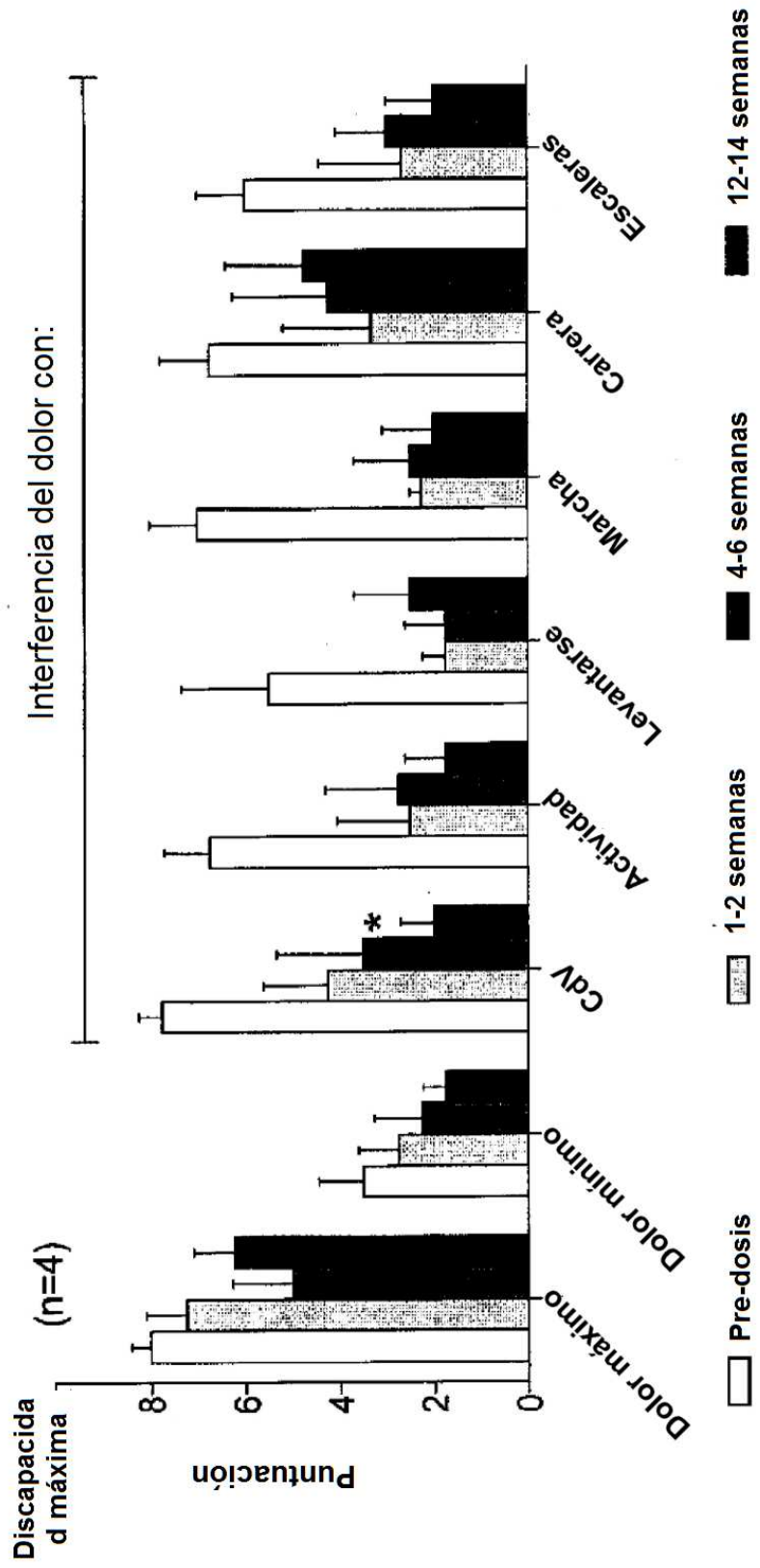


Figura 3

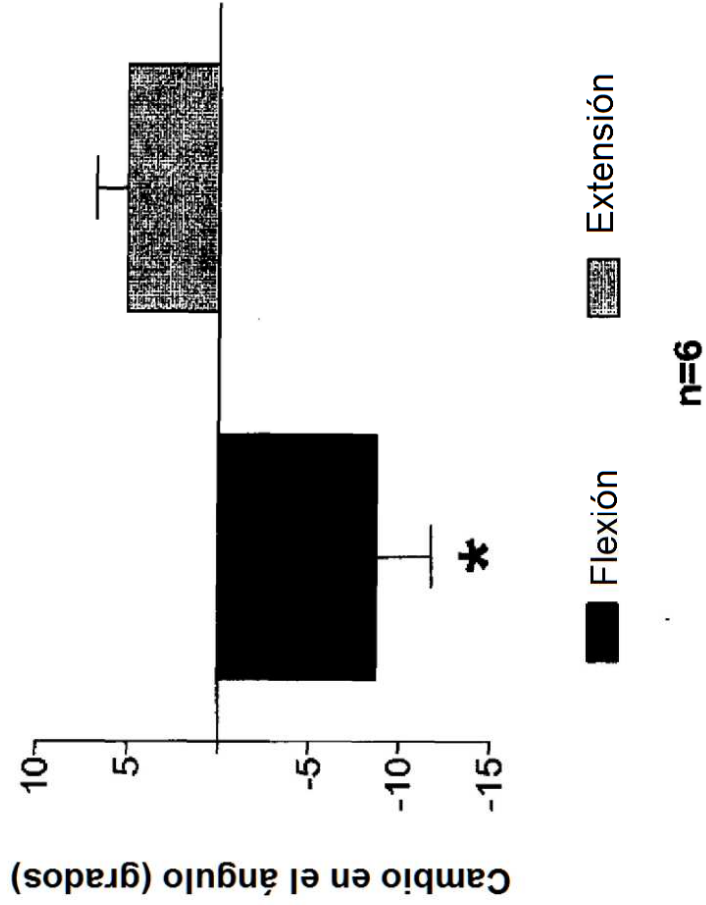


**Figura 4**



**Figura 5**

**Semanas 1-4: Rango de movimiento**



**Mejora significativa en la flexión**

N.B.: Las mejoras de extensión están inherentemente limitadas por la anatomía