

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 252**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013 PCT/US2013/037150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158868**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013 E 13721452 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2839004**

54 Título: **Procedimientos para tratar diabetes y/o promover la supervivencia de los islotes pancreáticos después del trasplante**

30 Prioridad:

18.04.2012 US 201261625904 P

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

21.11.2019

73 Titular/es:

**NOGRA PHARMA LIMITED (50.0%)
33 Sir John Rogerson's Quay
Dublin 2, IE y
UNIVERSITY OF MIAMI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MONTELEONE, GIOVANNI;
BUCHWALD, PETER;
INVERARDI, LUCA;
PILEGGI, ANTONELLO;
RICORDI, CAMILLO y
TOMEI, ALICE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 732 252 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

Procedimientos para tratar diabetes y/o promover la supervivencia de los islotes pancreáticos después del trasplante

Campo de la invención

5 La presente invención se dirige generalmente a oligonucleótidos antisentido contra SMAD7 y usos de los mismos para tratar y/o prevenir la diabetes y/o promover la supervivencia de las células de los islotes pancreáticos después del trasplante.

Antecedentes

10 La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por altos niveles de azúcar en la sangre. Los dos tipos de diabetes más prevalentes son la diabetes mellitus Tipo 1 (DMT1) y la diabetes mellitus Tipo 2 (DMT2). El tipo 1, o diabetes mellitus dependiente de insulina (DMID), es una enfermedad autoinmunitaria crónica caracterizada por la pérdida extensa de células beta en los islotes pancreáticos, que producen insulina. La diabetes tipo 2, o diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMID), se desarrolla cuando el músculo, la grasa y las células hepáticas no responden normalmente a la insulina (resistencia a la insulina). En particular, la diabetes tipo 2 se ha convertido en una epidemia, impulsada por el aumento de la obesidad y un estilo de vida sedentario, y el envejecimiento general de las poblaciones en muchos países. En la práctica clínica reciente, se ha vuelto cada vez más difícil distinguir la DMT1 de la DMT2 ya que muchos niños con DMT1 tienen sobrepeso en el momento del diagnóstico, y una proporción considerable de jóvenes con DM2 diagnosticados por médicos tienen evidencia de autoinmunidad pancreática (Badaru, A. and Pihoker, C. "Type 2 diabetes in childhood: clinical characteristics and role of beta-cell autoimmunity", Curr. Diab. Rep., 2012, 12, 75-81). En 2011, más de 346 millones de personas en todo el mundo se vieron afectadas por la diabetes.

25 Estudios recientes han demostrado que el TGF- β desempeña un papel en la función de los islotes pancreáticos y en el desarrollo de la diabetes (Moritani, M. y col. "Abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice and protection against effector lymphocytes by transgenic paracrine TGF- β 1", J. Clin. Invest., 1998, 102, 499-506; Olivieri, A. y col. "Serum transforming growth factor β 1 during diabetes development in non-obese diabetic mice and humans", Clin. Exp. Immunol., 2010, 162, 407-414). Por ejemplo, se ha demostrado que un pulso específico de islotes de expresión de TGF- β durante una semana retrasa el desarrollo de la diabetes en ratones NOD (Wällberg, M. y col. "An islet-specific pulse of TGF- β abrogates CTL function and promotes β cell survival independent of Foxp3+ T cells", J. Immunol., 2011, 186, 2543-2551), un modelo animal de diabetes tipo 1 comúnmente utilizado (Roep, B. O. y col. "Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes", Nat. Rev. Immunol., 2004, 4, 989-997). TGF- β 1 fue efectivo no solo para curar la diabetes en ratones NOD diabéticos y para bloquear la autoinmunidad destructiva de los islotes, sino también para inducir la regeneración de los islotes (Luo, X. y col. "Systemic transforming growth factor- β 1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice", Transplantation, 2005, 79, 1091-1096). Por lo tanto, las intervenciones terapéuticas a lo largo de esta vía, pueden no solo detener la progresión de la enfermedad, sino que incluso pueden restablecer la función (es decir, la producción adecuada de insulina) después del inicio de la hiperglucemia.

40 Los TGF- β 1-3 están involucrados en una variedad de funciones biológicas que incluyen el crecimiento celular, el desarrollo de órganos, la fibrogénesis y la regulación de las células inmunitarias. El TGF- β 1 es la forma predominante expresada en el sistema inmunitario, y ahora es bien reconocido como un regulador crítico en las respuestas inmunitarias que pueden amortiguar las respuestas de los linfocitos T (Li, M. O. and Flavell, R. A. "TGF-beta: a master of all T cell trades", Cell, 2008, 134, 392-404). De manera específica, TGF- β 1 se une a un receptor heterodimérico de serina/treonina quinasa transmembrana que contiene dos subunidades, TGF- β 1 R1 y TGF- β 1 R2. Tras la unión del ligando, el receptor TGF- β 1 R1 se fosforila por el receptor TGF- β 1 R2 constitutivamente activo y la señal se propaga al núcleo por proteínas que pertenecen a la familia SMAD. El TGF- β 1 R1 activado fosforila directamente las proteínas SMAD2 y SMAD3, que después interactúan con SMAD4. El complejo de SMAD2/SMAD3/SMAD4 se trasloca al núcleo y modula la transcripción de ciertos genes. SMAD7 es otro miembro de esta familia de proteínas que actúa como un antagonista general para TGF- β a través de mecanismos de retroalimentación negativa (Yan, X. and Chen, Y. G. "Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF-beta signalling", Biochem. J., 2011, 434, 1-10).

50 Los estudios han demostrado que SMAD7 desempeña un papel en la diabetes y la función de las células β . Se ha demostrado que SMAD7, una proteína intracelular, interfiere con la unión de SMAD2/SMAD3 al TGF- β 1 R1 previniendo la fosforilación y activación de estas proteínas, lo que lleva a la inhibición de la señalización mediada por TGF- β 1. Se ha demostrado que la expresión de SMAD7 en células β pancreáticas interrumpe la señalización de TGF- β e induce diabetes mellitus reversible Smart, N. G. y col. "Conditional expression of Smad7 in pancreatic beta cells disrupts TGF-beta signaling and induces reversible diabetes mellitus", PLoS Biol., 2006, 4, e39). Además, los resultados en ratones NOD también implican la vía de señalización de Smad2 y TGF- β en células dendríticas activadas en la diabetogénesis, y hay evidencia de estudios de asociación del genoma humano que apoyan el papel de Smad7 en la diabetes tipo 1 humana (Hook, S. M. y col. "Smad2: A candidate gene for the murine autoimmune diabetes locus Idd21.1", J. Clin. Endocrinol. Metab., 2011, 96, E2072-E2077). Debido a que se ha demostrado que el TGF- β 1 contribuye a la supresión de la producción de citoquinas, la inhibición de la respuesta de los linfocitos T y la inducción

de linfocitos T reguladores (Treg) (Kawamoto, K. y col. "Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) and rapamycin synergize to effectively suppress human T cell responses via upregulation of FoxP3+ Tregs", *Transpl. Immunol.*, 2010, 23, 28-33), la modulación SMAD7 también podría ser beneficiosa en el trasplante de islotes al apoyar la función del injerto, limitar la toxicidad y prevenir el rechazo inmunitario.

- 5 Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de nuevas terapias para la diabetes y el trasplante de islotes pancreáticos.

Sumario

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido de madres contra decantapléjico homólogo 7 (SMAD7) seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, para su uso en el tratamiento de la diabetes mediante el mantenimiento y/o la restauración de la función de las células β pancreáticas, como se expone en las reivindicaciones.

15 También se proporciona una composición farmacéutica como se expone en las reivindicaciones que comprende un oligonucleótido antisentido SMAD7 seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la diabetes mediante el mantenimiento y/o la restauración de la función de las células β pancreáticas, como se expone en las reivindicaciones.

Se exponen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

20 Los procedimientos desvelados se basan, en parte, en el descubrimiento de inhibidores específicos de la expresión o función de SMAD7, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido contra SMAD7, que inhiben SMAD7 y, por lo tanto, restauran la señalización de TGF-β. Los oligonucleótidos antisentido ejemplares contra SMAD7 incluyen, por ejemplo, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, que pueden usarse en una composición farmacéutica. Los inhibidores de SMAD7 desvelados se pueden usar para tratar y/o prevenir la diabetes, por ejemplo, diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2 y diabetes gestacional. Los oligonucleótidos antisentido contra SMAD7 también pueden usarse para promover la supervivencia de las células de los islotes pancreáticos después del trasplante.

25 Los aspectos y realizaciones anteriores de la invención pueden entenderse más completamente por referencia a las siguientes figuras, descripción detallada y reivindicaciones. Tal como se usa en el presente documento, "incluyendo" significa sin limitación, y los ejemplos citados no son limitantes.

Breve descripción de los dibujos

30 La fig. 1 (A) proporciona la secuencia de ácido nucleico de SMAD7 (SEQ ID NO: 1 y (B) proporciona la secuencia de aminoácidos de SMAD7 (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 2 (A) es un gráfico que muestra los efectos de TGFβ y GED-0301 (un oligonucleótido antisentido SMAD7, SEQ ID NO: 6) sobre la activación de NF-κB en células sensoriales HEK-Blue TNF-α y (B) es un gráfico que muestra el efecto de TGFβ y GED-0301 en la activación de NF-κB en células sensoriales HEK-Blue CD40L probadas por TNF-α y CD40L, respectivamente.

35 La Fig. 3 (A) es un panel que ilustra el procedimiento de activación utilizada en el análisis de los resultados de citometría de flujo para la captación específica de órgano de GED-0301 marcado con fluoresceína después de la administración por varias vías en ratones y la Fig. 3 (B) muestra el porcentaje correspondiente de captaciones (FITC +) en células viables en los tejidos de los órganos indicados.

40 La Fig. 4 es una imagen microscópica multicanal de alta resolución que representa secciones de páncreas de un ratón de control y un ratón administrado con GED-0301 marcado con fluoresceína por vía subcutánea (4 horas después de la administración). Leyenda de color: verde - fluorescente GED-0301, gris - DAPI (un marcador del núcleo celular), rojo - insulina (que indica células β productoras de insulina) y azul - CD45 (que indica CD45 o antígeno leucocitario común, LCA, un marcador de los glóbulos blancos, los elementos del sistema sanguíneo circulante que comprenden las células de inmunidad e inflamación).

45 La Fig. 5 (A) es un gráfico que representa los niveles de glucosa en sangre en ratones NOD tratados con el oligonucleótido antisentido SMAD7 GED-0301 (AS GED-0301), el control sensorial correspondiente (control S) y solución salina (Control) (125 µg/animal, subcutáneo (sc), diario) después del inicio de la hiperglucemia y la Fig. 5 (B) es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier correspondiente que muestra el porcentaje de animales que permanecen sin diabetes en función del tiempo.

50 La Fig. 6 es un gráfico que compara los resultados de una prueba de tolerancia oral a la glucosa realizada en ratones NOD tratados con GED-0301 que no se volvieron diabéticos al final del estudio (día 150) y ratones de control.

La Fig. 7 muestra apilamientos en Z de alta resolución multicanal de imágenes microscópicas confocales que comparan secciones representativas de páncreas que contienen islotes de ratones NOD tratados con GED-0301

que no se convirtieron en diabéticos al final del estudio (día 150) con los controles correspondientes. Leyenda de color: azul - DAPI (un marcador del núcleo celular), rojo - insulina (que indica células β productoras de insulina) y verde - glucagón (que indica células α productoras de glucagón).

Descripción detallada

- 5 La presente divulgación se dirige generalmente a oligonucleótidos antisentido contra SMAD7 y usos de los mismos para tratar y/o prevenir la diabetes y/o promover la supervivencia de las células de los islotes pancreáticos después del trasplante.

Terapia anti-SMAD7

- 10 Los procedimientos desvelados se refieren al uso de un inhibidor específico de SMAD7 seleccionado del grupo que consiste en pequeñas moléculas de unión, por ejemplo, compuestos naturales y sintéticos, anticuerpos, aptámeros, intrámeros, ARNi (ARN bicatenario, ARNiP) y moléculas antisentido antiSMAD7 para tratar y/o prevenir la diabetes y/o promover la supervivencia de las células de los islotes pancreáticos después del trasplante. Los inhibidores de SMAD7 también pueden comprender moléculas de SMAD7 truncadas y/o mutadas que interfieren con el SMAD7 y que, por lo tanto, inhiben la función de SMAD7.

- 15 Por ejemplo, la terapia anti-SMAD7 incluye terapias dirigidas contra SMAD7 (por ejemplo, terapias antisentido anti-SMAD7, es decir, oligonucleótido antisentido contra SMAD7 y anticuerpos contra SMAD7). Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de oligonucleótidos sintéticas cortas complementarias al ARN mensajero (ARNm), que codifica para la proteína diana (por ejemplo, SMAD7). Las secuencias de oligonucleótidos antisentido se hibridan con el ARNm produciendo un híbrido de doble cadena que puede conducir a la activación de enzimas catalíticas ubicuas, tales como RNasa H, que degrada cadenas híbridas de ADN/ARN evitando así la traducción de proteínas.

- 20 Un oligonucleótido antisentido antiSMAD7 puede dirigirse al sitio 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299 y/o 533 (es decir, nucleótidos 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299 y 533, respectivamente) del ARNm de SMAD7 (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 1) (véase la Fig. 1). En una realización de ejemplo, el oligonucleótido antisentido antiSMAD7 se dirige a los ácidos nucleicos 403-423 del ARNm de SMAD7 humana.

- 25 En determinadas realizaciones, un oligonucleótido antisentido puede derivar del siguiente oligonucleótido antisentido antiSMAD7 5'-GTCGCCCTTCTCCCCGAGC-3' (SEQ ID NO: 3).

- 30 Se contempla en el presente documento que un oligonucleótido antisentido que se dirige a SMAD7 puede comprender una cadena principal mixta en la que los restos de citosina en un par CpG se reemplazan por 5'-metilcitosina (abreviada como MeC). Los enlaces metilfosfonato también se pueden colocar en los extremos 5' y/o 3' de un oligonucleótido antisentido (abreviados como MeP). La cadena principal de fosfato de un oligonucleótido antisentido antiSMAD7 contemplado puede incluir, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o más enlaces fosforotioato (por ejemplo, los enlaces fosforotioato reemplazarían enlaces fosfodiéster). En una realización, todos los enlaces fosfonato pueden ser enlaces fosforotioato.

Las terapias con oligonucleótidos antisentido desveladas en el presente documento que se dirigen a SMAD7 incluyen, pero sin limitación:

- 35 5'-GTXYCCCCTTCTCCXCYCAG-3' (SEQ ID NO: 4), en la que X es un nucleótido que comprende una base nitrogenada seleccionada del grupo que consiste en citosina y 5-metilcitosina o un nucleósido 2'-O-metilcitosina y en la que Y es un nucleótido que comprende una base nitrogenada seleccionada del grupo que consiste en guanina y 5-metilguanina o un nucleósido 2'-O-metilguanina, siempre que al menos uno de los nucleótidos X o Y comprenda una base nitrogenada metilada;

- 40 5'-GTXGCCCTTCTCCXGCGAG-3' (SEQ ID NO: 5), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosfato;

5'-GTXGCCCTTCTCCXGCGAGC-3' (SEQ ID NO: 6), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosfato;

5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 7), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato;

- 45 5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZC-3' (SEQ ID NO: 8), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato.

En una realización particular, el antisentido de SMAD7 contemplado puede ser una secuencia que comprende una de:

5'-GTXGCCCTTCTCCXGCGAG-3' (SEQ ID NO: 9), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosforotioato;

5'-GTXGCCCTTCTCCXGCGAGC-3' (SEQ ID NO: 10), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosforotioato;

- 50 5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 11), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato;

5'-ZTXGCCCTTCTCCXGCAZC-3' (SEQ ID NO: 12), en la que X es 5-metil 2'-desoxicidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato.

Por ejemplo, las SEQ ID NO. 9-12 incluyen 1, 2, 3, 4 o más enlaces fosforotioato. Todos los enlaces fosfonato O,O de las SEQ ID NO. 9-12 pueden ser enlaces fosforotioato.

5 **Procedimientos de tratamiento**

En el presente documento se desvelan procedimientos para promover órganos y/o células, por ejemplo, células de los islotes pancreáticos, supervivencia después del trasplante, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un inhibidor específico de la expresión o función de SMAD7, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido contra SMAD7.

10 Asimismo, en el presente documento se desvelan procedimientos para tratar y/o prevenir la diabetes, por ejemplo, diabetes Tipo 1 y diabetes Tipo 2, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un inhibidor específico de la expresión o función de SMAD7, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido contra SMAD7.

15 La diabetes incluye un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles altos de azúcar en la sangre o cetoacidosis, así como anomalías metabólicas generales y crónicas que surgen de un estado prolongado de niveles altos de azúcar en la sangre o una disminución de la tolerancia a la glucosa. La diabetes incluye tanto las formas Tipo 1 como las formas Tipo 2 de la enfermedad, la diabetes gestacional y otras afecciones de deficiencia de insulina.

20 Se apreciará que los procedimientos desvelados también son aplicables para tratar y prevenir la diabetes autoinmunitaria latente (es decir, diabetes tipo 1.5), desequilibrios metabólicos, un estado prediabético, síndrome metabólico, un trastorno relacionado con lípidos o glucosa, por ejemplo, hiperlipidemia y/o hipercolesterolemia, y otros trastornos relacionados.

25 Los desequilibrios metabólicos pueden incluir cualquier trastorno o estado de enfermedad o afección que esté asociado con un nivel elevado de glucosa en plasma. Un desequilibrio metabólico, por ejemplo, comprende diabetes mellitus, diabetes gestacional, defectos genéticos de la función de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, infecciones inducidas por fármacos o sustancias químicas, otros síndromes genéticos asociados con la diabetes, un estado prediabético y síndrome metabólico.

30 El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólico en una persona, como lo describe la American Heart Association (AHA). El síndrome metabólico también se conoce como síndrome metabólico X, síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven o CHAOS. Los factores de riesgo incluyen, pero sin limitación, obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, hipertensión, resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (alto inhibidor-1 del activador del plasminógeno o fibrinógeno) y estado proinflamatorio (proteína C reactiva elevada).

35 Los términos "tratar", "tratamiento", "que trata" y similares como se usan en el presente documento significan, normalmente, obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) evitar la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar regresión de la enfermedad.

40 La capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento con una terapia anti-SMAD7 puede interpretarse con respecto a una muestra de control (descrita a continuación) obtenida del sujeto antes del tratamiento. Se puede identificar a un sujeto que responde al tratamiento con una terapia anti-SMAD7 si hay una reducción en la expresión de SMAD7; si hay un aumento en el contenido total de insulina pancreática; si la función de las células β se mantiene o se restaura (por ejemplo, como se evalúa a través de procedimientos convencionales, tal como la prueba de tolerancia a la glucosa por vía intravenosa (IVGTT); y/o si se mantiene y/o restablece la normogluceemia, es decir, el contenido normal de glucosa en la sangre. Un sujeto que ha recibido un injerto de islote, por ejemplo, un injerto de islote alogénico, puede identificarse como una respuesta al tratamiento con terapia anti-SMAD7 si hay prevención de rechazo y/o supervivencia prolongada de los islotes.

50 Se puede obtener una muestra de prueba del paciente, por ejemplo, en la semana 1, semana 2, semana 4, semana 8, semana 10 o más tarde después del inicio del tratamiento para determinar la sensibilidad al tratamiento. En algunas realizaciones, la muestra de prueba puede obtenerse, por ejemplo, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, nueve semanas, diez semanas, once semanas, doce semanas, cinco meses, seis meses, y/o un año o más después del inicio de la terapia para controlar la sensibilidad al tratamiento.

55 Una muestra de control puede incluir una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre o tejido) obtenida del sujeto antes del tratamiento con una terapia anti-SMAD7. La muestra de control proporciona un nivel de referencia para

controlar el progreso de un sujeto hacia el tratamiento. Se puede obtener una muestra de control del sujeto el día en que se administra por primera vez la terapia anti-SMAD7 (por ejemplo, el Día 1 de un régimen de tratamiento). Se puede obtener una muestra de control de un sujeto un día antes del inicio de una terapia anti-SMAD7 (por ejemplo, el día 0 de un régimen de tratamiento). Como alternativa, puede obtenerse una muestra de control de un sujeto 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días antes del inicio de una terapia anti-SMAD7. Por ejemplo, la regulación positiva o la regulación negativa de ciertas muestras de células puede medirse antes del tratamiento (por ejemplo, una muestra de control), durante el tratamiento y/o después del tratamiento para controlar la respuesta de un sujeto a la terapia, por ejemplo, una terapia anti-SMAD7.

Una muestra de control puede incluir, por ejemplo, una muestra para controlar el nivel de glucosa de un sujeto, en la que la muestra se obtuvo del sujeto antes del tratamiento con una terapia anti-SMAD7.

Se puede establecer un nivel de control para un sujeto basado en el control a largo plazo de ciertas poblaciones de células en el sujeto. En determinados casos, se contempla que un sujeto pueda someterse a múltiples rondas de tratamiento con una terapia anti-SMAD7. La cantidad de una determinada población celular detectada después de varias rondas de tratamiento puede compararse con un nivel de control previo para el sujeto para determinar si el sujeto ha respondido a la terapia y/o es probable que responda a un tratamiento adicional con una terapia anti-SMAD7. Se puede establecer un control o nivel de referencia para un sujeto basándose en una medición promedio de una determinada población celular determinada a partir de múltiples muestras de referencia obtenidas a lo largo del tiempo (por ejemplo, obtenidas en el transcurso de semanas, meses o años). Por consiguiente, cualquier prueba o ensayo realizado como se desvela en el presente documento puede compararse con un nivel de control previo o establecido y puede no ser necesario obtener una nueva muestra de control del sujeto para comparación, por ejemplo, si el sujeto recibe más de una ronda de tratamiento con una terapia anti-SMAD7.

Administración y Formulación

En algunas realizaciones, en el presente documento se contemplan composiciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 contemplado como se expone en las reivindicaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la diabetes manteniendo y/o restaurando la función de las células β pancreáticas. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar por vía subcutánea. Como alternativa, la composición farmacéutica se puede administrar por vía oral.

Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa tampones, vehículos y excipientes adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. El vehículo(s) debería ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las formulaciones y no perjudicial para el receptor. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tampones, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conocen en la materia.

En una realización, un oligonucleótido antisentido contemplado contra SMAD7 y cualquier composición farmacéutica del mismo se puede administrar mediante una o varias vías, incluyendo oral, tópica, parenteral, por ejemplo, inyección subcutánea, mediante pulverizador de inhalación o vía rectal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, administración intrapancreática, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inyección intraesternal, o técnicas de infusión. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido contra SMAD7 se puede administrar por vía subcutánea a un sujeto. En otro ejemplo, el oligonucleótido antisentido contra SMAD7 se puede administrar oralmente a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un oligonucleótido antisentido contra SMAD7, tales como las desveladas en el presente documento, se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado. Una composición farmacéutica debe formularse para ser compatible con su vía de administración prevista. Se pueden preparar formulaciones útiles mediante procedimientos bien conocidos en la materia farmacéutica. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. (Mack Publishing Company, 1990).

Las formulaciones farmacéuticas son, preferentemente, estériles. La esterilización se puede lograr, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización por filtración se puede realizar antes o después de la liofilización y reconstrucción.

En una realización de ejemplo, una composición farmacéutica para administración subcutánea de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 comprende un oligonucleótido antisentido tal como el representado por la SEQ ID NO: 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (tal como sal de sodio) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, una formulación de comprimido farmacéutico para administración oral de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 comprende una fase intragranular, en la que la fase intragranular incluye un oligonucleótido antisentido tal como el representado por la SEQ ID NO: 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (como una sal de sodio), y una carga farmacéuticamente aceptable, y que también puede incluir una fase extragranular, que

puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un disgregante. Por ejemplo, un comprimido farmacéuticamente aceptable para utilización oral puede comprender una fase intragranular, que comprende aproximadamente del 5 a aproximadamente el 10% en peso de oligonucleótido antisentido representado por la SEQ ID NO 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, aproximadamente 40 % en peso de manitol, aproximadamente 8 % en peso de celulosa microcristalina, aproximadamente 5 % en peso de hidropropilmetilcelulosa y aproximadamente 2 % en peso de glicolato de almidón de sodio; una fase extragranular que comprende aproximadamente 17 % en peso de celulosa microcristalina, aproximadamente 2 % en peso de glicolato de almidón de sodio, aproximadamente 0,4 % en peso de estearato de magnesio; y un recubrimiento entérico sobre el comprimido, que comprende aproximadamente el 13% en peso de AcrylEZE® (véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO/2010/054826).

Las formulaciones ejemplares incluyen formas de dosificación que incluyen o consisten, esencialmente, en aproximadamente 35 mg a aproximadamente 500 mg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7. Por ejemplo, en el presente documento, se contemplan las formulaciones que incluyen aproximadamente 35 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg o 250 mg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7. En una realización, una formulación puede incluir aproximadamente 40 mg, 80 mg o 160 mg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7. La cantidad administrada dependerá de variables tales como el tipo o el alcance de la enfermedad o indicación a tratar, la salud general del paciente, la potencia *in vivo* del anticuerpo, la formulación farmacéutica y la vía de administración. La dosificación inicial se puede aumentar más allá del nivel superior con el fin de lograr rápidamente el nivel en sangre o nivel en tejido deseado. Como alternativa, la dosificación inicial puede ser más pequeña que la óptima y la dosificación puede aumentarse progresivamente durante el curso del tratamiento. Se puede optimizar la dosificación humana, por ejemplo, en un estudio convencional de aumento progresivo de la dosis de fase I diseñado para pasar de 40 mg a 160 mg. La frecuencia de dosificación puede variar, dependiendo de factores tales como la vía de administración, cantidad de dosificación y la enfermedad que se está tratando. Las frecuencias de dosificación ejemplares son una vez al día, una vez por semana y una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la dosificación es una vez al día durante 7 días. Una vía de administración preferida es la subcutánea.

En algunos aspectos, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden incluir además la administración de al menos otro agente que se dirige al tratamiento de enfermedades o trastornos desvelados en el presente documento. Otros agentes contemplados pueden coadministrarse (por ejemplo, secuencial o simultáneamente).

Los agentes contemplados incluyen agentes inmunosupresores que incluyen glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos, agentes que actúan sobre inmunofilinas, interferones, opioides, proteínas de unión a TNF, micofenolatos y agentes biológicos pequeños. Por ejemplo, los agentes inmunosupresores contemplados incluyen, pero sin limitación: tacrolimus, ciclosporina, pimecrolimus, sirolimus, everolimus, ácido micofenólico, fingolimod, dexametasona, fludarabina, ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina, leflunomida, teriflunomida, anakinra, globulina antitimocítica, globulina antilinfocítica, muromonab-CD3, afutuzumab, rituximab, teplizumab, efalizumab, daclizumab, basiliximab, adalimumab, infliximab y etanercept.

Los agentes contemplados incluyen terapias con fármacos para regular los niveles de azúcar en la sangre, incluyendo terapias orales con agentes hipoglucemiantes y/o agentes antidiabéticos orales, terapias inyectables y similares. Las terapias no farmacológicas para regular el nivel de azúcar en la sangre incluyen, pero sin limitación, medidas dietéticas y/o de control del ejercicio.

Las terapias farmacológicas orales para regular los niveles de azúcar en la sangre incluyen agentes hipoglucemiantes que pueden incluir, pero sin limitación: Acarbosa, Acetohexamida, Clorpropamida, Darglitazona Sódica, Glimpirida, Glipizida, Gliburida, Repaglinida, Troglitazona, Tolazamida y Tolbutamida.

Las terapias farmacológicas orales para regular los niveles de azúcar en la sangre incluyen agentes antidiabéticos que pueden incluir, pero sin limitación: Acarbosa, Acetohexamida, Buformina, Clorhidrato de butoxamina, Camigliosa, Clorpropamida, Ciglitazona, Englitazona sódica, Clorhidrato de etoformina, Gliamilida, Glibornurida, Glicetanilo Gliclazida sódica, Gliflumida, Glipizida, Glucagón, Gliburida, Glihexamida, Glimidina sódica, Glioctamida, Gliparamida, Insulina isófana, Insulina zinc humana, Insulina extendida, Insulina Lispro, Linoglitrida, Fumarato de linoglitrida, Metformina, Palmoxirato de metilo, Palmoxirato sódico, Clorhidrato de pioglitazona, Tartrato de piroglitrida, Proinsulina Humana, Repaglinida, Acetato de seglitida, Tolazamida, Tolbutamida, Tolpirramida, Troglitazona y Zopolrestat.

Las terapias inyectables para regular el nivel de azúcar en la sangre pueden incluir, pero sin limitación insulina de acción rápida, insulina de acción prolongada e insulina relacionada. La insulina de acción rápida incluye insulina regular, Suspensión de Insulina Zinc Rápida e insulina Semilente®, inyección de Humalog®, Humulin® R, Iletin II, Novolin R, Insulina Regular de Cerdo Purificada e Insulina Velosulina BR Humana. La insulina de acción prolongada incluye Suspensión de Insulina Zinc con protamina, Suspensión de Insulina Zinc Extendida, insulina Ultralente® y Humulin® U. Otra insulina incluye Suspensión de Insulina Isófana, insulina NPH, insulina isófana; Suspensión de Insulina Zinc Lente® Insulina, Suspensión de Insulina Isófana Humana/Inyección de Insulina Humana, Humulin® 50/50, Humulin® 70/30 y Novolin® 70/30.

Ejemplos

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos. Se proporcionan los ejemplos solo para fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del ámbito o contenido de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Efecto del Antisentido SMAD7 sobre la activación de NF- κ B

5 Las células sensoriales HEK-Blue™ (InvivoGen) TNF- α /IL-1 β están diseñadas para detectar TNF- α e IL-1 β bioactivos mediante el control de la activación de la ruta NF- κ B. Estas células se generaron por transfección estable de células HEK293 de riñón embrionario humano con un gen informador de SEAP bajo el control del promotor mínimo de IFN- β fusionado a cinco NF- κ B y a cinco sitios de unión de AP-1. Las células sensoriales HEK-Blue™ (InvivoGen) CD40L se utilizan para medir la bioactividad de CD154 (CD40L) a través de la secreción de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) tras la activación de NF- κ B después de la estimulación con CD40. Estas células se generaron por transfección estable de células HEK293 con el gen CD40 humano y una construcción SEAP inducible por NF- κ B. Por lo tanto, Las células HEK-Blue™ miden la bioactividad de TNF α /CD40L a través de la secreción de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) tras la activación de NF- κ B después de la estimulación con TNFR/CD40. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina conocida involucrada en la inflamación sistémica y la regulación de las células inmunitarias. CD40L es una proteína coestimuladora involucrada en la activación de linfocitos T y el desarrollo de respuestas inmunitarias eficaces, y se cree que está involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, incluida la DMT1 (Margolles-Clark, E. y col. "Small molecule costimulatory blockade: organic dye inhibitors of the CD40-CD154 interaction", J. Mol. Med., 2009, 87, 1133-1143).

20 Se incubaron células sensoriales HEK Blue TNF α y CD40L (Invivogen) (50.000/pocillo) con GED-0301 antisentido (AS) u oligonucleótido en sentido control (S) (OGN; 4 μ g/ml) durante 6 h en presencia de lipofectamine (LPF)) después los medios durante 18 h seguidos de prueba por TNF α (1 ng/ml) o CD40L (25 ng/ml) en presencia o ausencia de TGF- β (200 ng/ml; 24 h, DMEM P/S 2% de suero). GED-0301 es un oligonucleótido antisentido SMAD7 (GTGCCCCCTTCTCCCXGCAGC, en el que X es 5-metil-2'-desoxicitidina 5' monofosfato (5-Me-dC) (SEQ ID NO: 6)). La secreción de SEAP inducida por TNF α o CD40L en estas células se cuantificó utilizando QUANTI-Blue™, un ensayo enzimático colorimétrico provisto por el fabricante y desarrollado específicamente para este fin con un medio que cambia a un color púrpura-azul en presencia de SEAP, que puede cuantificarse leyendo la DO a 625-655 nm. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes con cuadruplicados por placa que utilizan valores normalizados para la respuesta estimulada (TNF α o CD40L solo) en células de control no tratadas.

30 Los efectos de TGF- β y GED-0301 sobre la activación de NF- κ B en células HEK-Blue por TNF α y CD40L, se muestran respectivamente en las Figs. 2A y 2B. Los resultados muestran que tanto TNF α como CD40L produjeron una considerable activación de NF- κ B (medida por la expresión de SEAP) y ambos fueron suprimidos por TGF- β . Esta supresión se potenció considerablemente aún más mediante el tratamiento con el oligonucleótido antisentido SMAD7 GED-0301, lo que indica que este tratamiento puede potenciar y/o restaurar los efectos de TGF- β . En los sistemas de cultivo celular, TGF- β puede promover o inhibir la activación de NF- κ B dependiendo del tipo de célula utilizado (Hong, S. y col. "Smad7 sensitizes tumor necrosis factor induced apoptosis through the inhibition of antiapoptotic gene expression by suppressing activation of the nuclear factor-kappaB pathway", Cancer Res., 2007, 67, 9577-9583 y referencias en el mismo). El TGF- β fue un regulador negativo de NF- κ B en linfocitos B y en células mononucleares de la lámina intestinal propia humana (LPMC). Los resultados para células HEK transfectadas son similares a los observados para LPMC, en los que se ha demostrado que TGF- β 1 regula negativamente la activación de NF- κ B en LPMC normal (como el tratamiento previo con TGF- β 1 suprimió la activación de NF- κ B inducida por TNF- α), y que el tratamiento de IBD LPMC con un antisentido Smad7 específico dio como resultado la inhibición de la activación de NF- κ B (Monteleone, G. y col. "A failure of transforming growth factor- β 1 negative regulation maintains sustained NF- κ B activation in gut inflammation", J. Biol. Chem., 2004, 279, 3925-3932).

45 Para confirmar que GED-0301 puede penetrar en las células ensayadas, se incubaron células sensoriales HEK Blue (50.000/pocillo) con OGN AS GED-0301 marcado con fluoresceína durante 48 h en presencia o ausencia de lipofectamine (LPF, Invitrogen) y después se analizaron para la captación celular. La imagen microscópica confirmó que las células sensoriales HEK Blue que se incubaron con GED-0301 marcado con fluoresceína en presencia de lipofectamine mostraron una captación del GED-0301 marcado con fluoresceína mejor que las células no tratadas con lipofectamine.

50 Ejemplo 2: Estudio de Distribución de Antisentido SMAD7 en Ratones

Se administraron oligonucleótidos antisentido GED-0301 marcados con fluoresceína (TriLink) a ratones B6 regulares (6 semanas, machos; Jackson Lab.) con diabetes inducida por múltiples dosis bajas de estreptozotocina (STZ, una toxina específica de células β ; 40 mg/kg i.p. durante 5 días consecutivos) por tres vías diferentes: oral (p.o.), intraperitoneal (i.p.) y subcutánea (s.c.) (125 μ g/ratón = 5 mg/kg; p.o. por sonda oral utilizando 500 μ l de solución de bicarbonato, pH 9,5 para proteger de la degradación gástrica). En dos puntos temporales diferentes (4 h y 24 h), los órganos se recogieron y procesaron a partir de dos animales diferentes (uno para microscopía y otro para citometría de flujo). Se recogieron los siguientes órganos: páncreas, hígado, riñón, bazo, timo, intestino, cerebro, sangre, ganglios linfáticos pancreáticos, ganglios linfáticos braquiales, tejido linfóide asociado al intestino. Para el análisis de citometría de flujo, los órganos se digirieron con colagenasa D (Roche), se pasaron a través de un filtro de células (70 μ m; BD

Falcon), se resuspendieron en HBSS y se tificaron para detectar células vivas (kit de tinción de células muertas violeta fijable LIVE/DEAD®; Invitrogen) y para leucocitos (APC anti CD45 de ratón; eBioscience). Después se analizó el contenido de fluoresceína en células viables utilizando un citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences, San José, CA) y el software FlowJo versión 7.2.2 (Ashland, OR). La Fig. 3A muestra un ejemplo para ilustrar el procedimiento de activación utilizada para analizar los resultados de la citometría de flujo. La Fig. 3B incluye los resultados ilustrativos de la citometría de flujo obtenidos para el porcentaje correspondiente de captaciones en células viables en órganos específicos, y demuestran una importante captación de oligonucleótidos antisentido (porcentaje de FITC +) por el páncreas, los ganglios linfáticos pancreáticos y otros órganos (ambos en leucocitos, CD45 +/FITC +, y en otras células, CD45-/FITC +), especialmente después de la administración s.c. Algunos órganos tales como el cerebro no mostraron una captación significativa. Estos resultados confirman que el GED-0301 puede suministrarse a órganos específicos mediante vías de administración clínicamente aceptables, incluida la administración subcutánea.

Las imágenes microscópicas multicanal de alta resolución (Fig. 4) confirmaron la distribución de GED-0301 en el páncreas de ratón después de la administración subcutánea del oligonucleótido antisentido marcado de forma fluorescente de acuerdo con los resultados de la citometría de flujo (Fig. 3B). Leyenda de color: verde - fluorescente GED0301, gris - DAPI (un marcador del núcleo celular), rojo - insulina (que indica células β productoras de insulina) y azul - CD45 (que indica CD45 o antígeno leucocitario común, LCA, un marcador de los glóbulos blancos, los elementos del sistema sanguíneo circulante que comprenden las células de inmunidad e inflamación

Ejemplo 3: Estudios *in vivo* con antisentido SMAD7

Se pueden usar estudios *in vivo* adicionales para establecer el efecto del tratamiento en modelos animales.

Estudio de Reversión de la Hiperglucemia de Antisentido SMAD7 en Ratones NOD

Los ratones diabéticos no obesos (NOD), por ejemplo, los ratones NOD se utilizaron para un ensayo de prevención de la diabetes tipo intervención, con un tratamiento que se inició solo después del inicio de la hiperglucemia. Los ratones NOD son un modelo animal de diabetes tipo 1 comúnmente utilizado (Roep, B. O. y col. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. Nat. Rev. Immunol., 2004, 4, 989-997), y se han utilizado para evaluar una gran cantidad de posibles tratamientos (Shoda, L. K. y col. "A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation", Immunity, 2005, 23, 115-126). Se obtuvieron animales hembras prediabéticos de ocho semanas de edad (Taconic) y, a partir de la semana 10 (después de la aclimatación), se controló la glucosuria dos veces por semana. En animales que dieron positivo, los niveles de glucosa en sangre (glucemia) se controlaron tres veces a la semana. Los animales con niveles elevados de glucosa (glucemia sin ayuno > 200 mg/dl) en dos días consecutivos, recibieron un implante de pellets de insulina de liberación sostenida (LinBit, LinShin Canada, Inc.) para evitar una hiperglucemia grave y agotamiento/exceso de trabajo de las células β restantes y se inició el tratamiento. Los tratamientos se administraron s.c., ya que esta ruta es clínicamente relevante y los estudios de distribución descritos anteriormente indicaron que es eficaz en el direccionamiento al páncreas, el LN pancreático y otros órganos de posible interés. Los animales se asignaron a uno de los tres grupos de tratamiento siguiendo un patrón de rotación predefinido en el orden de su desarrollo de hiperglucemia. El tratamiento (GED-0301 = OGN AS Smad7; 125 μ g/ratón) y los controles correspondientes (OGN S y solución salina solamente) se administraron diariamente. Los animales se controlaron dos veces por semana y se evaluó su capacidad para mantener la normoglucemia. Tras la desaparición de los efectos de los pellets de insulina implantados (aproximadamente 25 días), los animales con tres lecturas de glucosa consecutivas de > 250 mg/dl se consideraron diabéticos y se sacrificaron con órganos representativos (páncreas, GLP) recogidos. En animales que no se volvieron diabéticos, el tratamiento diario se detuvo después de 10 semanas, y se controlaron durante 12 semanas adicionales (hasta un total de 150 días) para establecer si existe un efecto duradero. Al final, se sacrificaron todos los animales y se recogieron órganos representativos (páncreas, GLP y otros).

Los resultados del estudio se muestran en la Fig. 5 con los niveles de glucosa en sangre en la Fig. 5A y una curva de supervivencia de Kaplan-Meier correspondiente que muestra el porcentaje de animales que permanecen sin diabetes en función del tiempo en la Fig. 5B. El tratamiento se inició después del inicio de la hiperglucemia cuando ya se había producido un daño en las células β . Por consiguiente, la hiperglucemia grave puede desarrollarse muy rápidamente. Todos los animales tratados con solución salina u oligonucleótido en sentido desarrollaron diabetes ($n = 7$ y 6 , respectivamente), según lo indicado por su hiperglucemia (glucosa en sangre > 250 mg/dl) después del agotamiento del implante LinBit con insulina de liberación sostenida el día 20-25. Para los animales tratados con el oligonucleótido antisentido activo GED-0301, 6 de los 11 tratados no desarrollaron hiperglucemia y permanecieron sin diabetes hasta el final del estudio (día 150), mucho después de que se suspendiera el tratamiento (día 70).

Para verificar la respuesta de glucosa de los animales no diabéticos al final del estudio (día 150), se realizó una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) en varios ratones tratados con GED-0301, así como en ratones de control. Se administró una dosis de glucosa de 150 mg por sonda oral a ratones en ayunas durante 16 horas y se recogieron muestras de sangre a intervalos de tiempo predefinidos durante hasta 150 minutos. Los resultados mostrados en la Fig. 6 confirman que la respuesta a la glucosa, y por lo tanto la capacidad de secreción de insulina, fue comparable a la de los animales sanos. Los niveles de glucosa en sangre volvieron a la normalidad a los 150 minutos de prueba oral en todos los animales.

La imagen microscópica confocal de alta resolución de las secciones de páncreas de ratones NOD tratados con GED-0301 que no se convirtieron en diabéticos al final del estudio (día 150) se realizó para confirmar la presencia de células β productoras de insulina. La Fig. 7 muestra una serie de imágenes de apilamientos en Z multicanal de secciones representativas que contienen islotes de páncreas de ratones tratados con GED-0301 y los controles correspondientes. Los diferentes colores (columnas) son los siguientes: el azul es DAPI (un marcador del núcleo celular), el rojo es la insulina (que indica células β productoras de insulina) y el verde es glucagón (que indica las células α productoras de glucagón). La barra de escala indica 100 μm . Mientras que los animales de control normales, no diabéticos tenían islotes normales que contenían células productoras de insulina y glucagón (fila superior), los ratones NOD que se volvieron diabéticos durante el estudio perdieron las células β productoras de insulina de sus islotes (fila inferior; de un ratón tratado con oligonucleótidos en sentido que no volvió a la normogluceemia). Los animales tratados con antisentido (AS) GED-0301 que no se volvieron diabéticos después del tratamiento iniciado al inicio de la hipergluceemia tenían varios islotes que perdieron sus células productoras de insulina (la segunda fila de arriba muestra la presencia de glucagón, pero no de insulina), pero también tenían islotes con células productoras de insulina conservadas (tercera fila desde la parte superior). Por lo tanto, el tratamiento con GED-0301 iniciado al inicio de la hipergluceemia parece ser capaz de contrarrestar los efectos del ataque autoinmunitario en ratones NOD y preservar las células β productoras de insulina en cantidades suficientes para mantener la respuesta normal de glucosa en la sangre y evitar la aparición de hipergluceemia.

Estudio de Antisentido SMAD7 en el Trasplante de Islotes

La restauración de la señalización de TGF- β en el microambiente local se ha mostrado prometedora en los modelos experimentales de trasplante alogénico de islotes, incluso en presencia de una enfermedad autoinmunitaria subyacente. El tratamiento con GED-0301 se puede realizar para establecer el efecto de un antisentido dirigido a SMAD7 en la supervivencia y/o tolerancia a los injertos de islotes alogénicos. De manera específica, se puede determinar el efecto de GED-0301 en la prevención del rechazo y/o la prolongación de la supervivencia de los islotes en un modelo de trasplante alogénico en roedores que se han vuelto diabéticos mediante la administración de una toxina específica de células beta (STZ). Los criterios de valoración primarios pueden incluir la supervivencia del aloinjerto de islotes, marcadores de activación sobre linfocitos T, células dendríticas, frecuencia y función supresora de Treg y otras células supresoras como una correlación con la expresión/modulación de Smad7 en el sitio de trasplante.

Estudio de Antisentido SMAD7 e Inflamación de Bajo Grado en la Diabetes Tipo 2

Como la inflamación sistémica y local de bajo grado caracteriza a la prediabetes y la diabetes tipo 2, se puede determinar el posible papel de SMAD7 en el desarrollo de la inflamación de bajo grado dentro de los islotes pancreáticos. Además, se puede estudiar el papel de SMAD7 en las complicaciones vasculares de los islotes en la diabetes.

Estudio de Antisentido SMAD7 en la Nefropatía Diabética

En la nefropatía diabética humana y otras enfermedades glomerulares proteinúricas, Smad7 está fuertemente regulada. Esta regulación positiva se produce principalmente en los podocitos, las células glomerulares responsables de la integridad de la barrera de filtración glomerular y para la prevención de la albuminuria, un factor pronóstico independiente del resultado cardiovascular en la población general. El direccionamiento de TGF-beta ha sido el tema de un intenso esfuerzo de traducción (prueba con pirfenidona). En estos esfuerzos, los resultados han sido inesperadamente negativos para la cura de la nefropatía diabética y otras enfermedades renales crónicas. Restaurar una señalización de TGF- β adecuada mediante la inhibición de Smad7 puede ser un enfoque prometedor y novedoso para tratar estas afecciones. Se pueden utilizar modelos experimentales establecidos de nefropatía diabética desarrollados por el NIH Consortium on Diabetic Complications para generar datos preliminares *in vivo* sobre resultados renales suaves y fuertes (albuminuria, tasa de filtración glomerular, glomeruloesclerosis). Se pueden desarrollar estudios clínicos posteriores en la clínica de Nefropatía Diabética en el Diabetes Research Institute.

Estudio de Antisentido SMAD7 sobre la Secreción de Insulina Estimulada por Glucosa

Los ratones con células β pancreáticas con sobreexpresión de Smad7 se caracterizan por un deterioro de la liberación de insulina y un aumento de la glucosa en ayunas. Por lo tanto, La inhibición de Smad7 podría dar como resultado la mejora de la función de las células β pancreáticas. Se pueden realizar experimentos de liberación de insulina estimulada por glucosa en islotes humanos manipulados genéticamente para expresar diferentes niveles de SMAD7. En estudios adicionales, los pacientes humanos pueden estudiarse para determinar el papel de la inhibición de Smad7 en la intolerancia a la glucosa en sujetos prediabéticos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido antisentido de madres contra decantapléjico homólogo 7 (SMAD7) seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, para su uso en el tratamiento de la diabetes mediante el mantenimiento y/o la restauración de la función de las células β pancreáticas.
2. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 es la SEQ ID NO: 10, y en el que todos los enlaces fosfodiéster del oligonucleótido de la SEQ ID NO: 10 son enlaces fosforotioato.
- 10 3. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el oligonucleótido antisentido es para administración parenteral.
4. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el oligonucleótido antisentido es para administración subcutánea.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido SMAD7 seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la diabetes mediante el mantenimiento y/o la restauración de la función de las células β pancreáticas.
- 20 6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el oligonucleótido antisentido SMAD7 se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y la composición farmacéutica es para administración parenteral.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la composición farmacéutica es para administración subcutánea.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además:
- 25 una fase intragranular que comprende el oligonucleótido antisentido SMAD7, en la que el oligonucleótido antisentido SMAD7 se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una carga farmacéuticamente aceptable, en la que la composición farmacéutica es una formulación de comprimido farmacéutico para administración oral.
- 30 9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente una fase extragranular que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable es un disgregante.
11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que la sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido antisentido SMAD7 es una sal de sodio.
- 35 12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-11, en la que el oligonucleótido antisentido SMAD7 es la SEQ ID NO: 10, y en el que todos los enlaces fosfodiéster del oligonucleótido de la SEQ ID NO: 10 son enlaces fosforotioato.
- 40 13. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en el que la diabetes se selecciona del grupo que consiste en diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2 y diabetes gestacional.
14. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 es la SEQ ID NO: 10, en el que dos o más de los enlaces internucleosídicos de la SEQ ID NO: 10 son enlaces fosforotioato.
- 45 15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 es la SEQ ID NO: 10, en el que dos o más de los enlaces internucleosídicos de la SEQ ID NO: 10 son enlaces fosforotioato.

FIG. 1A

```

1 ggcacgagcg gagagccgcg cagggcgcgg gccgcgcggg gtggggcagc cggagcgcag
61 gcccccgatc cccggcgggc gcccccgggc ccccgcgcgc gccccggcct cgggagact
121 ggcgcatgcc acggagcgcc cctcgggccg ccgcccctcc tgccccggcc cctgtctctg
181 ctgctgtcgc ctcgccctgc tgccccaaact cggcgcccga cttcttcatg gtgtgcggag
241 gtcactgttcg ctccctagca ggcaaacgac tttctcctc gcctcctcgc cccgatgtt
301 caggacccaaa cgatctgcgc tcgtccggcg tctctggagg agccgtgcgc ccggcgcgga
361 ggacgaggag gagggcgag ggggaggtgg aggaggaggc gagctgcggg gagaaggggc
421 gacggacagc cgagcgcatg gggccgggtg cggcggcccg ggcagggctg gatgtgcct
481 gggcaaggcg gtgcgaggtg ccaaaggtca ccaccatccc caccgccag ccgcgggcgc
541 cggcgcgccg gggggcgccg agggcgatct gaaggcgctc acgcaactcg tgctcaagaa
601 actgaaggag cggcagctgg agctgctgct ccaggccgtg gactcccgcg gcgggacgcg
661 caccgcgtgc ctctgtctgc ccggccgcct ggactgcagg ctggggcccg gggcgcccgc
721 cggcgcgcg cctgcgcagc cgcctctctc ctactcgtc cccctcctgc tgtgcaaatg
781 gttcaggtgg cgggatctca ggcattctct ggaagtcaag aggtgtgtt gctgtgaatc
841 ttacgggaag atcaaccocg agctgggtg ctgcaaccoc catcacctta gccgatctg
901 cgaactagag tctccccccc ctcttactc cagatacccg atggatttct tcaaaccaac
961 tgcagactgt ccagatgctg tgcctctctc cgtgaaaaca gggggaacga attatctggc
1021 ccctgggggg ctttcagatt cccaacttct tctggagcct ggggatcggg cacactgggtg
1081 cgtggtggca tactgggagg agaagacgag agtggggagg ctctactgtg tccaggagcc
1141 ctctctggat atctctatg atctacctca ggggaatggc ttttgccctg gacagctcaa
1201 ttoggacaac aagagtcagc tgggtgcagaa ggtgcggagc aaaatcggct gcggcattca
1261 gctgacgcgg gaggtggatg gtgtgtgggt gtacaaccgc agcagttacc ccatcttcat
1321 caagtccgcc aacttgaca acccggactc caggacgctg ttggtacaca aggtgttccc
1381 cggtttctcc atcaaggctt tcgactacga gaaggcgtac agcctgcagc ggcccaatga
1441 ccacgagttt atgcagcagc cgtggacggg ctttaccgtg cagatcagct ttgtgaaggg
1501 ctggggtcag tctacacccc gccagttcat cagcagctgc ccgtgctggc tagaggtcat
1561 cttcaacagc cggtagccgc gtgoggaggg gacagagcgt gagctgagca ggccacactt
1621 caaactactt tctgtctaat attttctctc tgagtgtctg cttttctatg aaactctttg
1681 gtcgtttttt tttgtttgt tggttggttt tcttctctc gtctctgtt gtgttctgtt
1741 ttgtttcgtc ctttgagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt tttggaagaa
1801 ggggcaggta tgatcggcag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac
1861 caccaaacac agtgtatgaa gggggcggt catcatttca cttgtcagga gtgtgtgtga
1921 gtgtgaggtg gcggctgtgt gtgcacgcgt gtgcaggagc ggcagatggg gagacaacgt
1981 gctctctctt ttgtgtctct tatggatgct ccagcagag aggtttcagc tccaagcgg
2041 tgtctctcct gcccttgga cagctcagc gggcgagagg cagtacctgg gcaagctggc
2101 ggctggggtc ccagcagctg ccaggagcac ggctctgtcc ccagcctggg aaagccctg
2161 cccctcctct cctcatcaa ggacacgggc ctgtccacag gctctgagc agcagcctg
2221 ctagtggccg aaccagaacc aattattttc atccttgtct tattccttc ctgccagccc
2281 ctgccattgt agcgtttttc ttttttggcc atctgtctct ggatctccct gagatgggct
2341 tccaagggc tgccggggca gccccctcac agtattgctc acccagtgcc ctctcccctc
2401 agcctctccc ctgcctgccc tgggtgacatc aggttttcc cggacttaga aaaccagctc
2461 agcactgcct gctcccattc tgtgtgttaa gctctgctat taggcccagca agcggggatg
2521 tccctgggag ggacatgott agcagtcccc tccctccaa gaaggatttg gtcogtcata
2581 acccaaggta ccactctagg ctgacacctc actctcttt ctttctctc aactcata
2641 cactcgtatg atacttogac actgttctta gctcaatgag catgtttaga ctttaacata
2701 agctattttt ctaactacaa aggtttaaat gaacaagaga agcattctca ttggaattt
2761 agcattgtag tgctttgaga gagaaaggac tctgaaaaa aaacctgaga tttattaag
2821 aaaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac ttgtaaatat aaagacgttt
2881 tataagcatc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaat aaagaaaaa
2941 tgcactttgc ttaataataa atgcaataaa caaatgocaa attaaaaaag ataaacaaa
3001 gattgggtgt ttttctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttcta aaggagtta
3061 tgttccatta aacgattttt aaaatgtaca cttgaaaaaa aaaaaaaaa a
(SEQ ID NO: 1)

```

FIG. 1B

MFRTKRSALVRRRLWRSRAPGGEEDEEEGAGGGGGGGGELRGEGATD
SRAHGAGGGGPGRAGCCLGKAVEGAKGHHHPHPAAGAGAAGGAEADLKALTHSVLKK
LKERQLELLLQAVESRGGTRTACLLLPGRLCDRLGPGAPAGAQAQPPSSYSLFLLLC
KVFRWPDLRHSSEVKRLCCCESYGKINPELVCCNPHHLSRLCELESPPPPYSRYPMDF
LKPTADCPDAVPSSAETGGTNYLAPGGLSDSQLLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGRL
YCVQEPSLDIFYDLFQGNFCLGQLNSDNKSQLVQKVRISKIGCGIQLTREVDGVVWYN
RSSYPIFIKSATLDNFDSTRLLVHKVFPGFSIKAFDYEKAYSLQRPNDHEFMQQPWTG
FTVQISFVKGWGQCYTRQFISSCPCWLEVIFNSR
(SEQ ID NO:2)

EFFECTO DE SMAD7 AS Y TGFβ EN LA ACTIVACIÓN DE NFκB EN CÉLULAS SENSORIALES HEK-BLUE ESTIMULADAS CON TNFα

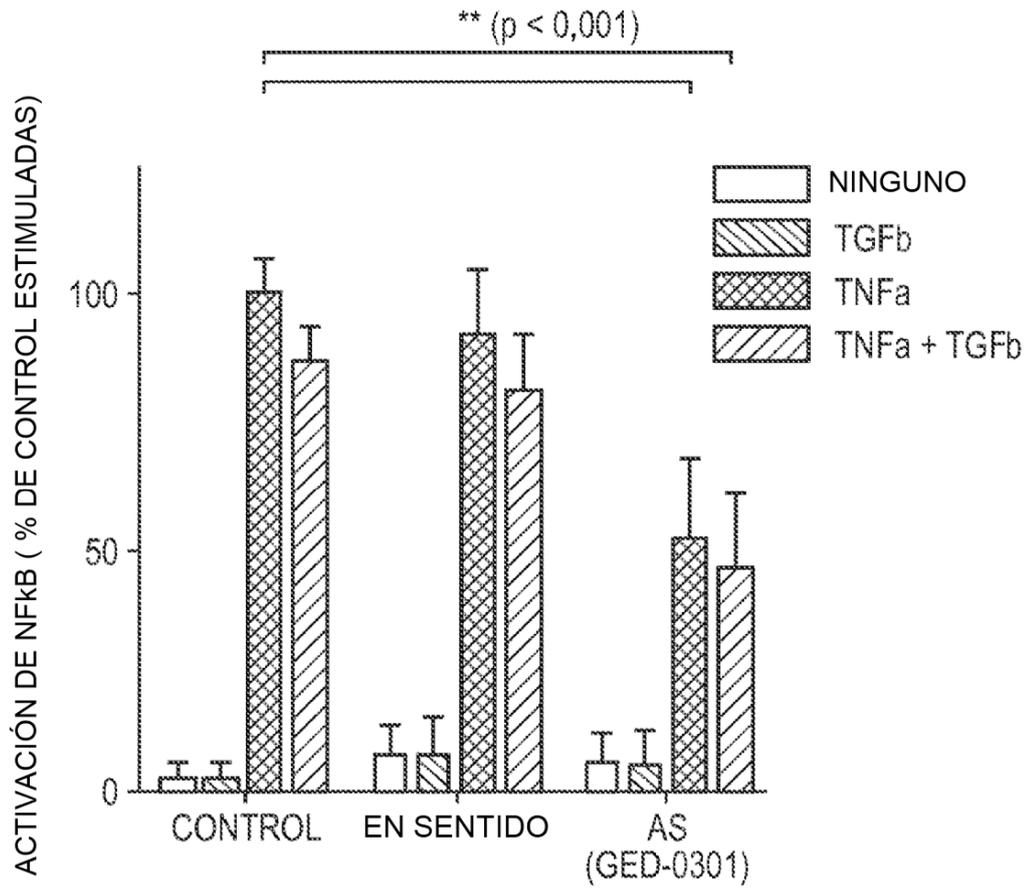


FIG. 2A

EFFECTO DE SMAD7 AS Y TGFβ EN LA ACTIVACIÓN DE NFκB EN CÉLULAS SENSORIALES HEK-BLUE ESTIMULADAS CON CD40L

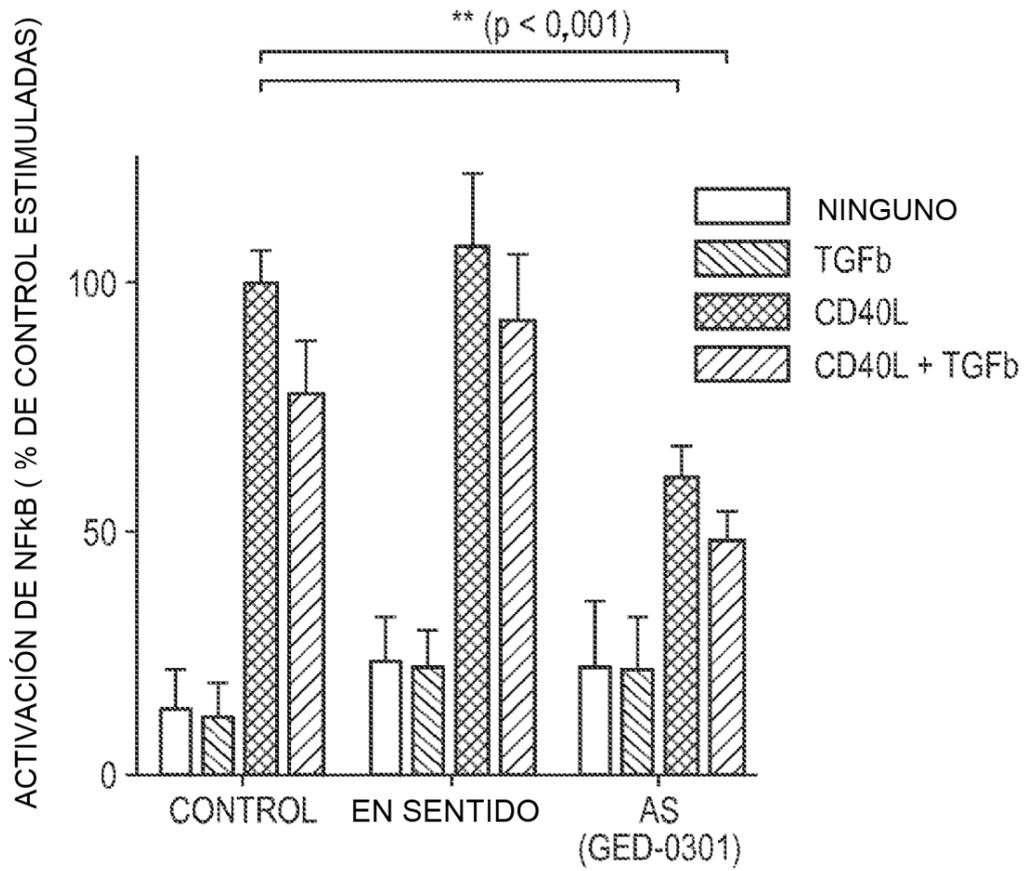


FIG. 2B

ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS; ANÁLISIS-MÉTODO FAC

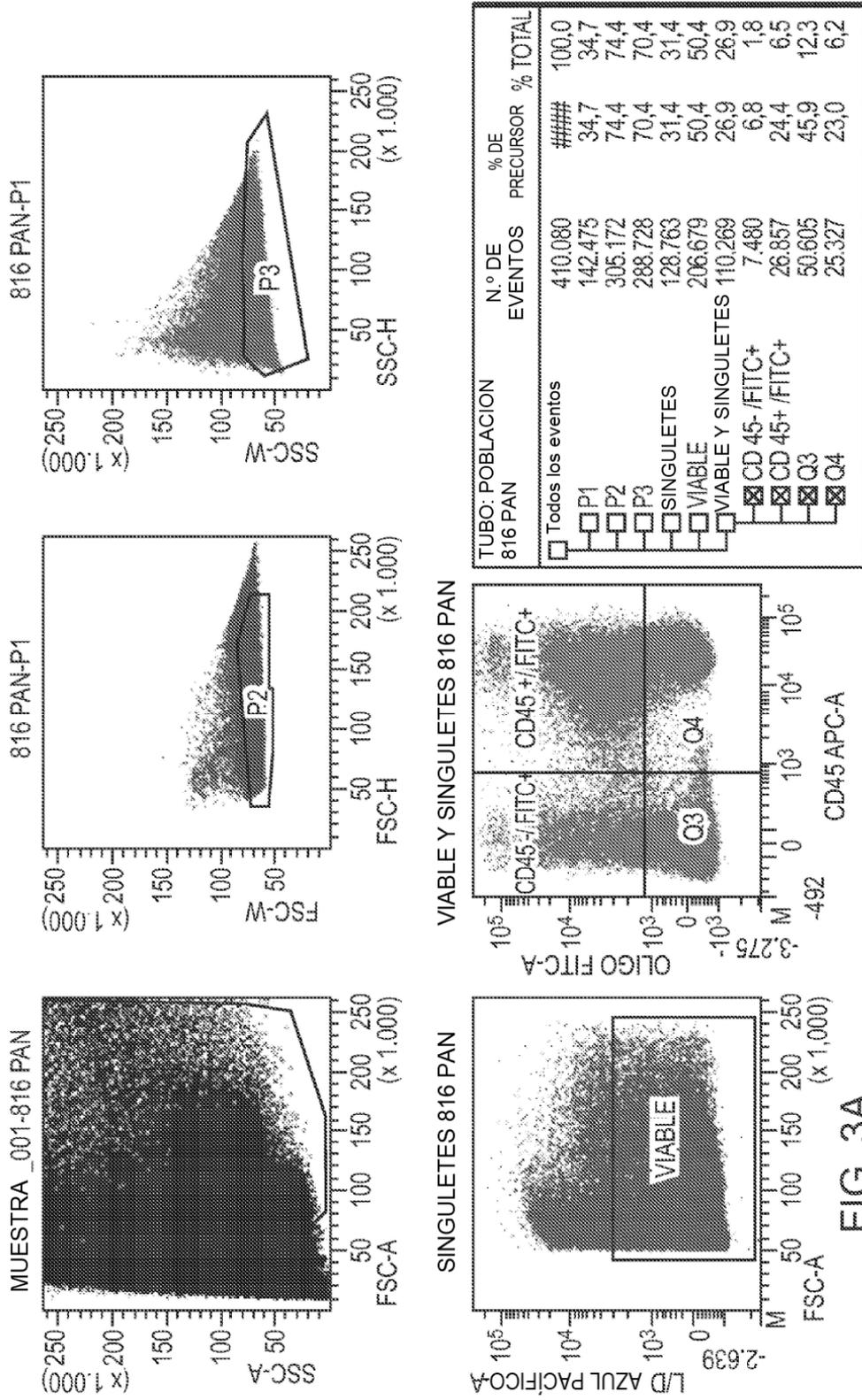


FIG. 3A

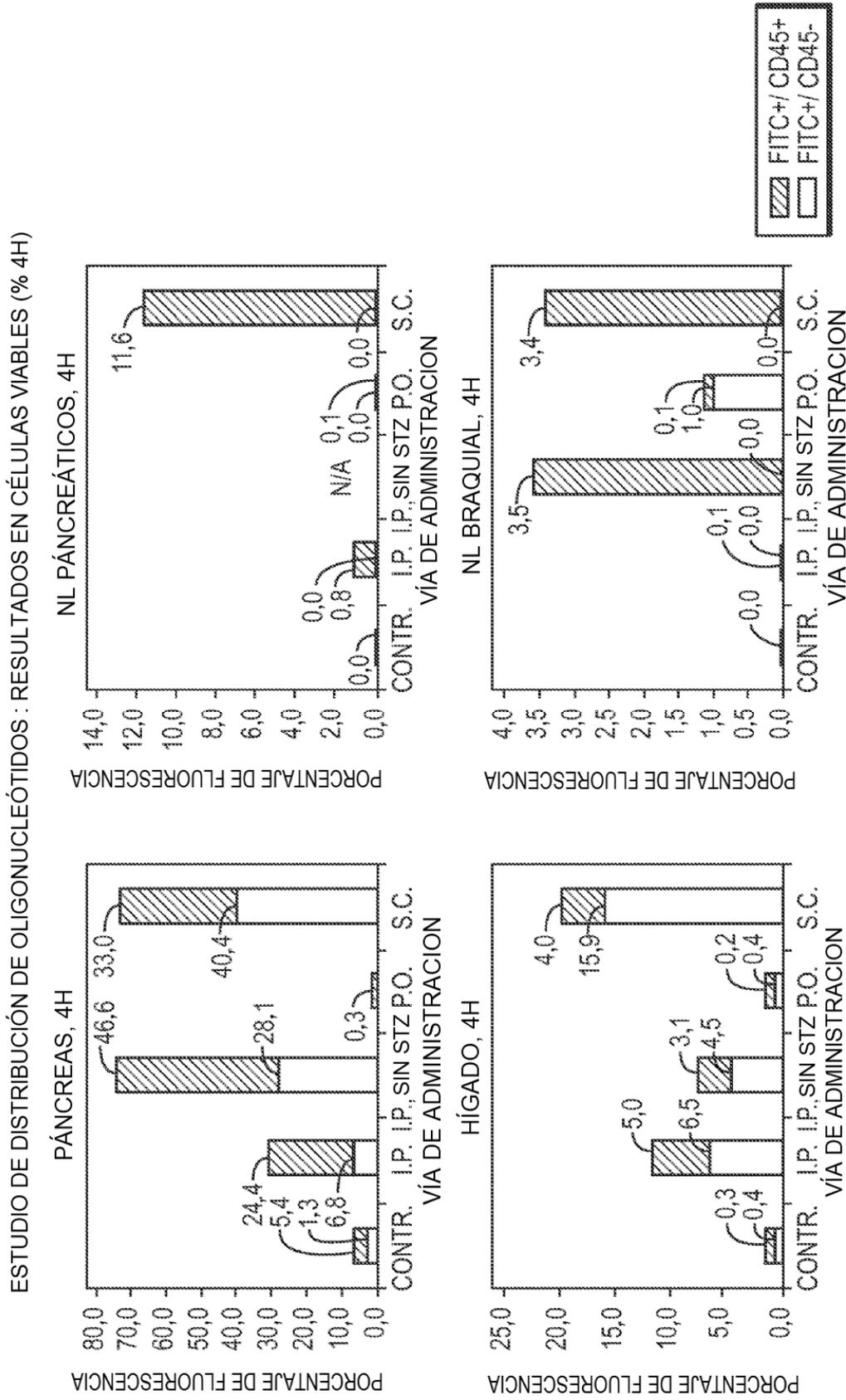
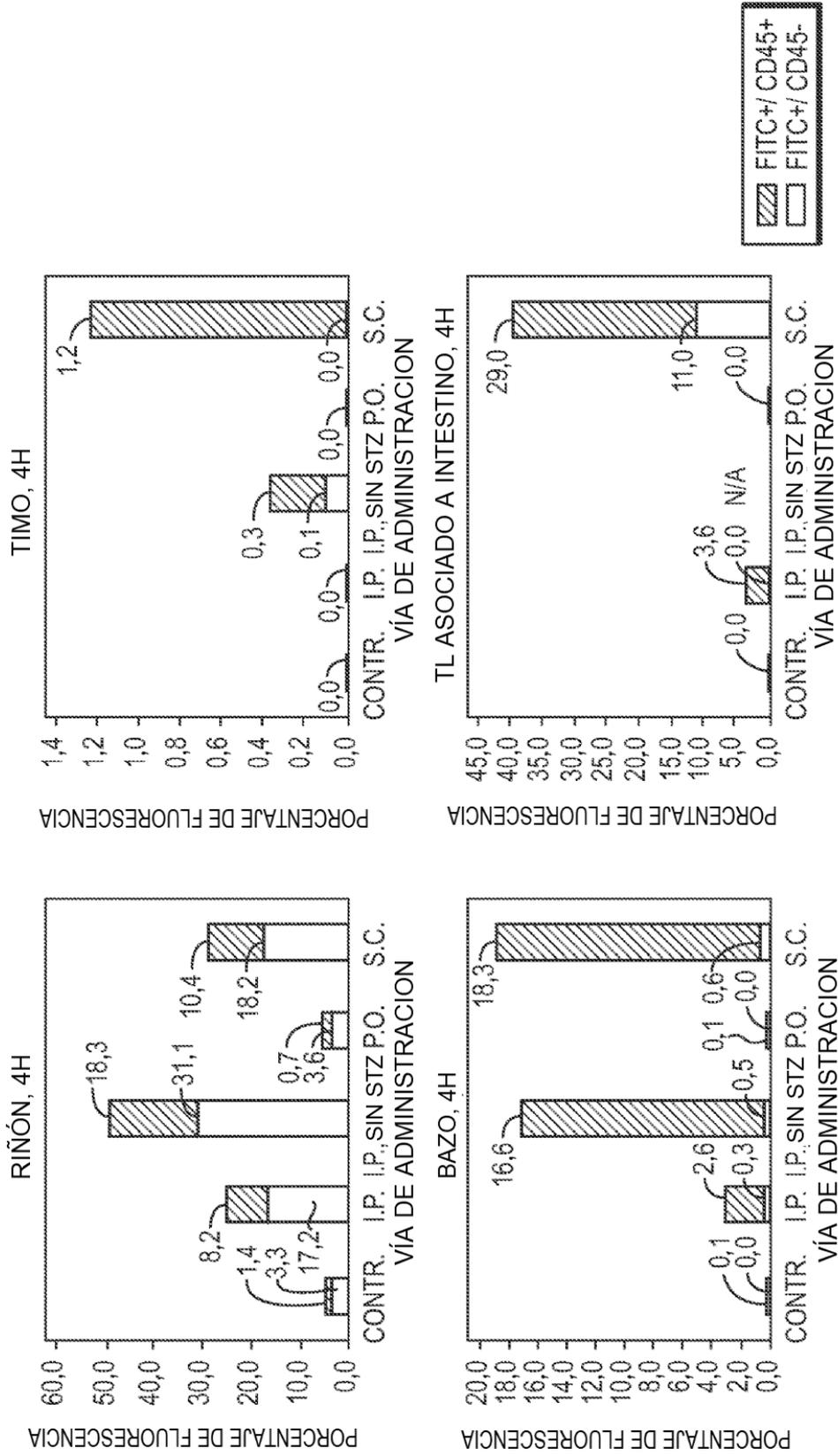


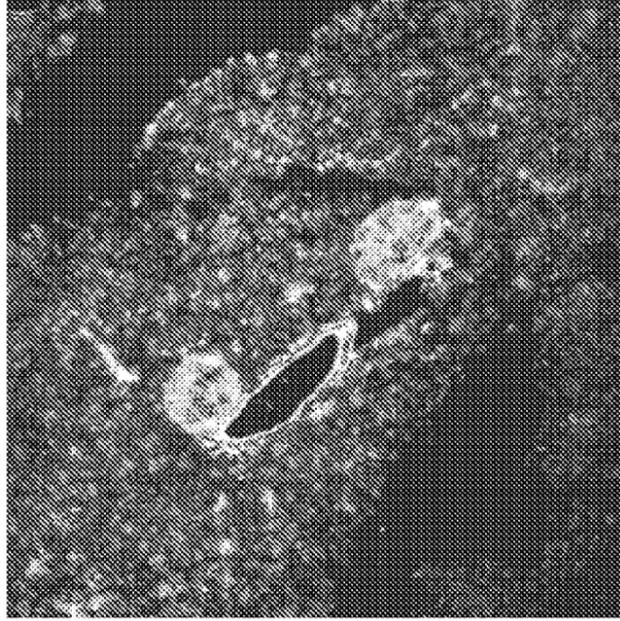
FIG. 3B

ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS : RESULTADOS EN CÉLULAS VIABLES (% , 4H)



OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO FLUORESCENTE EN PÁNCREAS
DE RATÓN DESPUÉS DE INYECCIÓN SUBCUTÁNEA

CONTROL (4 h)



DAPI

INSULINA

GED-0301 FL-AS (4 h)



GED0301-FL

CD45

FIG. 4

ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DE GED-0301 EN RATONES NOD HIPERGLUCÉMICOS, NIVELES DE GLUCOSA
SMAD7 ANTISENTIDO ESTUDIO DE INTERVENCIÓN EN NOD DE GED-0301

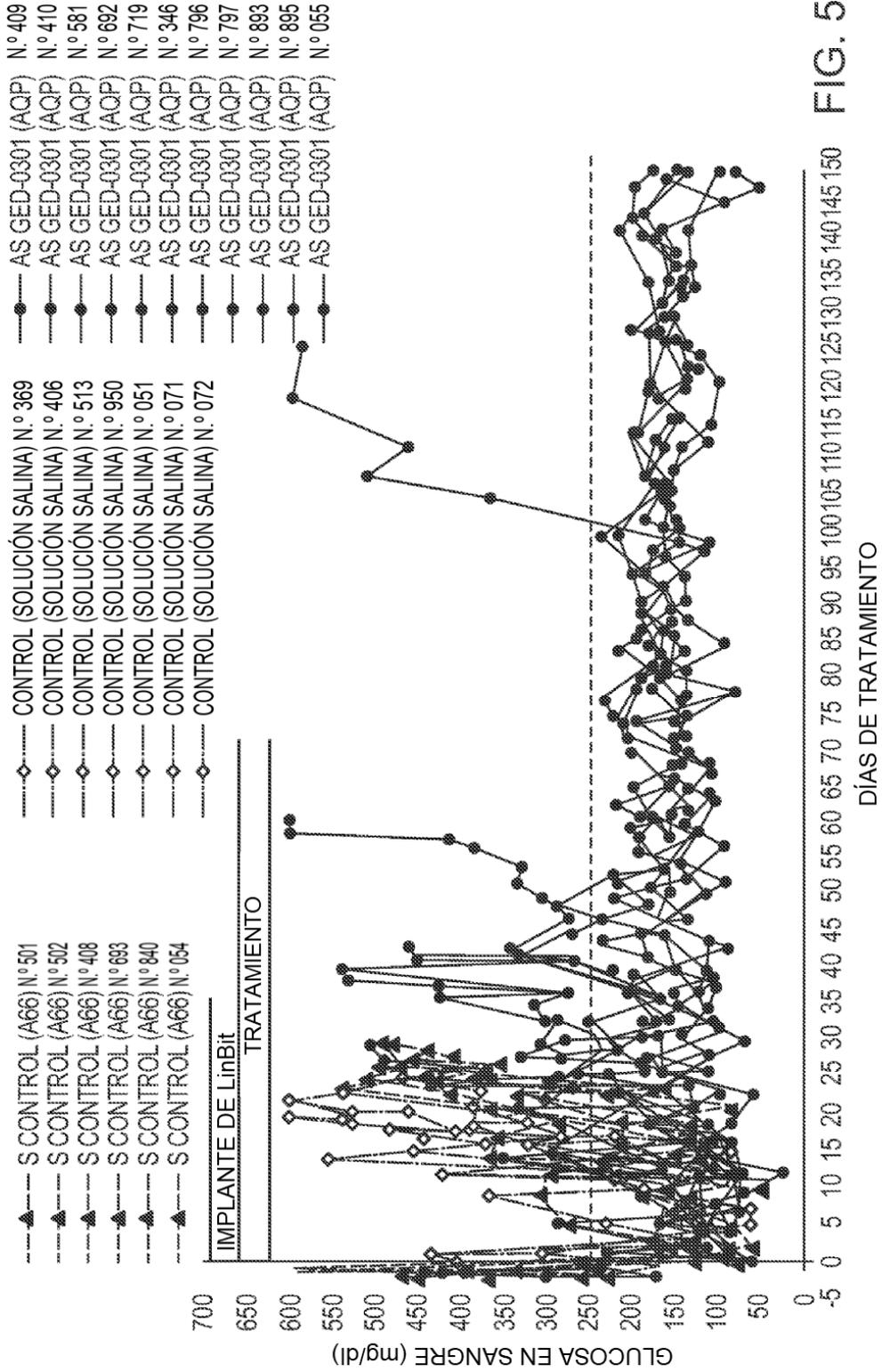


FIG. 5A

ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DE GED-0301 EN RATONES NOD HIPERGLUCÉMICOS, GRÁFICO DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER

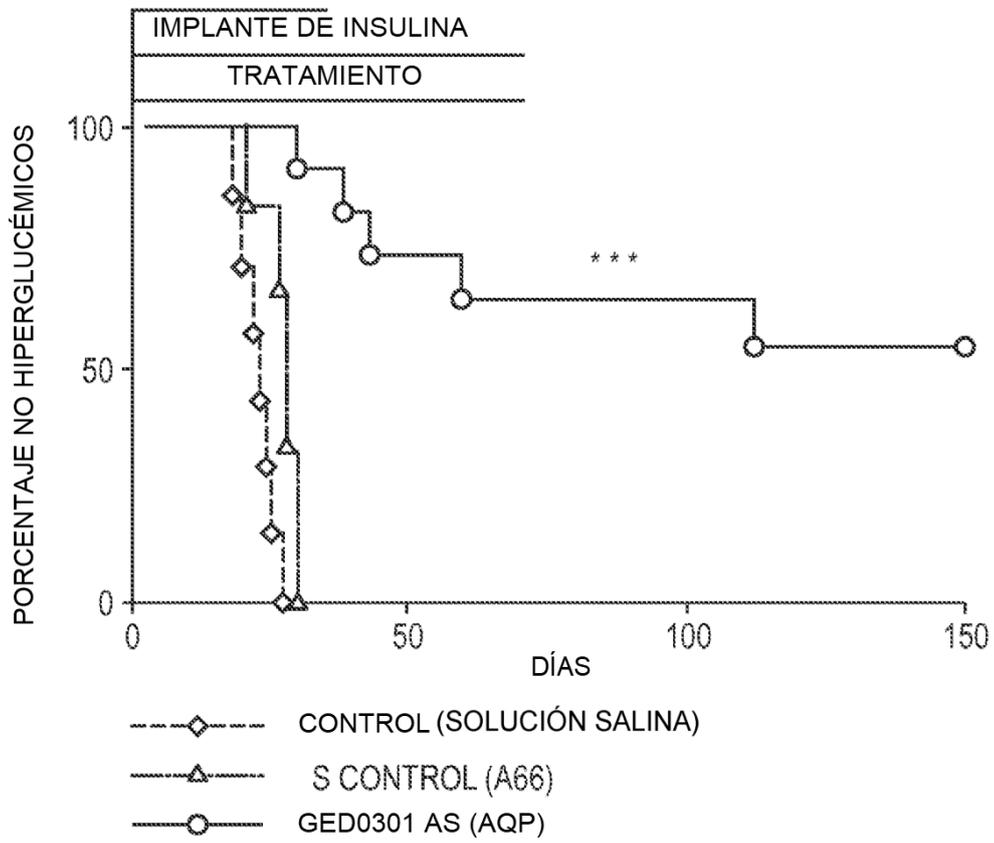


FIG. 5B

ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DE GED-0301 EN RATONES NOD HIPERGLUCÉMICOS, PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL DE GLUCOSA (OGTT)

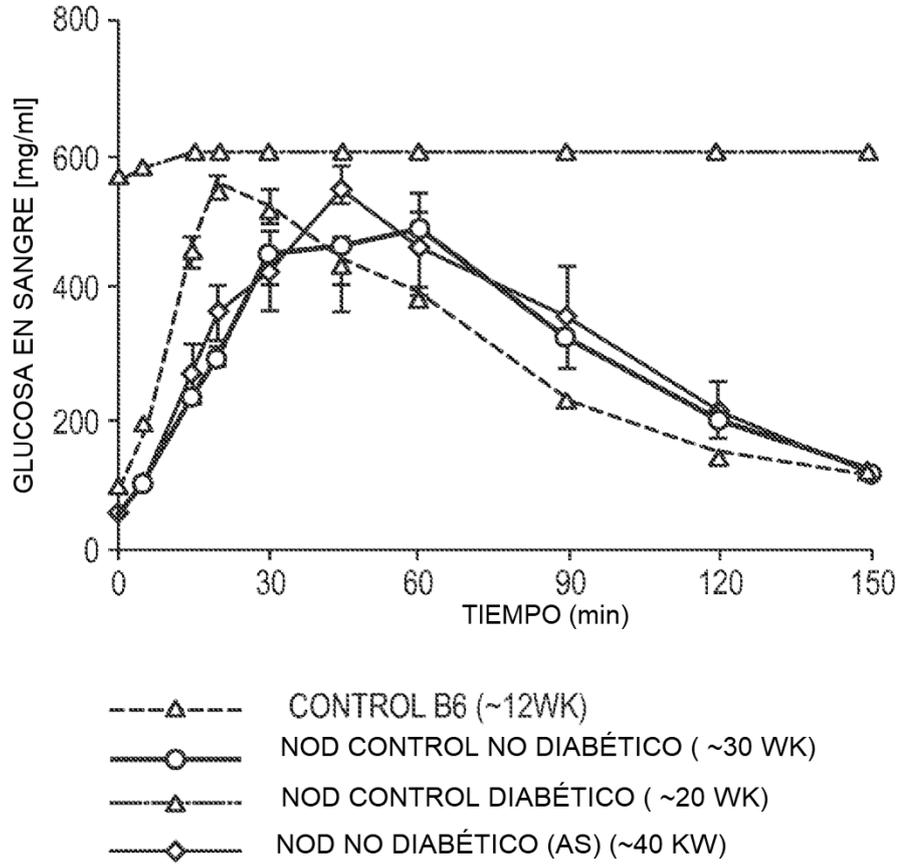


FIG. 6

ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DE GED-0301 EN RATONES NOD HIPERGLUCÉMICOS,
SECCIONES DE PÁNCREAS REPRESENTATIVAS TEÑIDAS PARA DETECCIÓN
DE INSULINA Y GLUCAGÓN

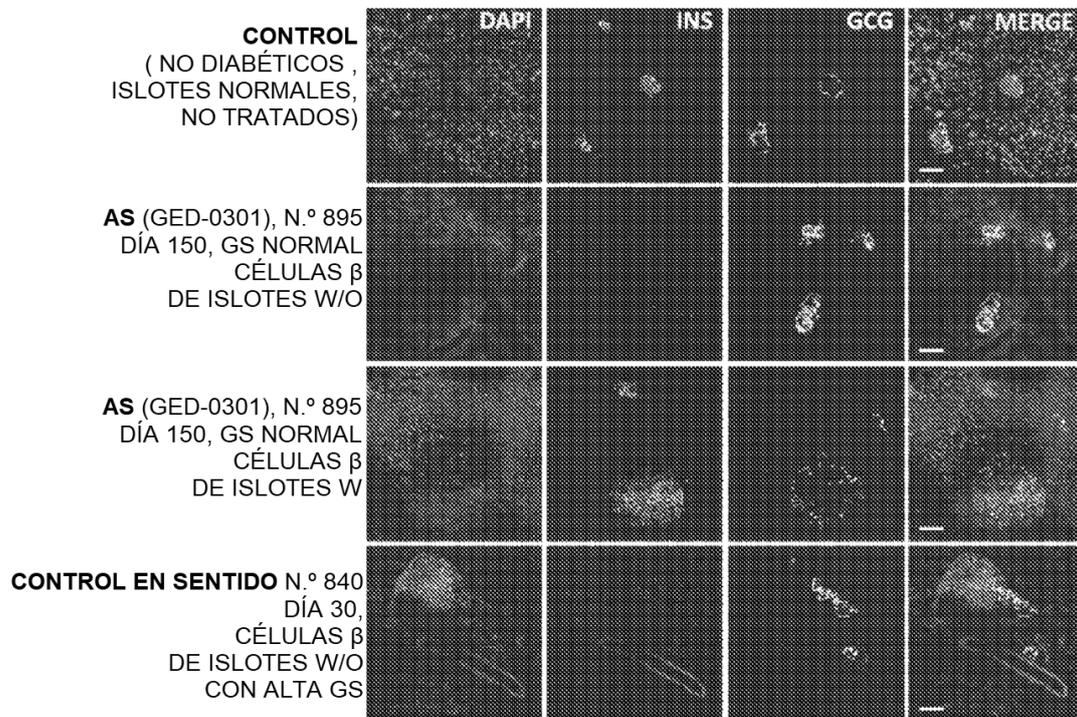


FIG. 7