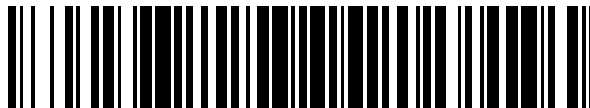


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 902**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2014 E 18167083 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3369435**

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

30 Prioridad:

18.07.2013 US 201361847851 P

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

18.05.2020

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:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 760 902 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 articular inflamatoria

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense 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 National Institute of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

15 Esta invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de estados clínicos asociados con enfermedades inflamatorias de las articulaciones y síntomas asociados con las mismas administrando a la articulación inflamada la composición antiinflamatoria terapéutica que comprende un constructo de expresión de interleucina-10 (IL-10) bacteriano o viral.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 En la siguiente discusión se describirán ciertos artículos y métodos a modo de antecedentes y de introducción. Nada de lo contenido en el presente documento debe interpretarse como una “admisión” de la técnica anterior. El solicitante se reserva expresamente el derecho a demostrar, cuando sea apropiado, que los artículos y métodos a los que se hace referencia en el presente documento no constituyen la técnica anterior según las disposiciones legales aplicables.

30 El dolor articular puede brotar por un número cualquier de motivos, como resultado de, por ejemplo, más de cien estados artríticos diferentes - de los cuales la artritis reumatoide y la artrosis son los más comunes - así como tendinitis, bursitis, inflamación del ligamento, sinovitis, gota y lupus eritematoso sistémico. Cuando se produce una lesión, se desencadena una cadena de eventos en el sistema inmunitario conocida como cascada inflamatoria, que provoca enrojecimiento, hinchazón y dolor. A continuación, los compuestos antiinflamatorios se encargan de curar la zona una vez que la amenaza ha disminuido. Cuando tiene lugar este proceso – conocido como inflamación local o aguda – es un signo de un sistema inmunitario sano. Sin embargo, si la inflamación persiste, puede conducir a un estado más crónico.

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

SUMARIO DE LA INVENCION

45 La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La divulgación proporciona métodos para tratar enfermedades inflamatorias de las articulaciones, síntomas asociados con enfermedades inflamatorias de las articulaciones, y ralentizar la progresión de la enfermedad administrando a un sujeto, normalmente inyectando en la articulación, un vector que expresa una secuencia codificante de interleucina-10 (IL-10). En algunas realizaciones, el constructo de expresión de IL-10 está encapsulado en micropartículas biodegradables, y en ciertos aspectos de estas realizaciones, las micropartículas están suspendidas en un diluyente para formar una composición terapéutica.

50 En aún otras realizaciones alternativas, las composiciones terapéuticas de la presente invención son constructos de expresión de IL-10 - con una estructura principal bacteriana - que se suministran como ADN “desnudo”. Es decir, los constructos de expresión de IL-10 se suministran sin encapsulación. En tales realizaciones, los constructos de expresión de IL-10 se suministran junto con uno o más diluyentes, y en aspectos preferidos de estas realizaciones, el constructo de expresión de IL-10 se suministra junto con uno o más adyuvantes. En algunos aspectos de esta realización, el uno o más adyuvantes pueden administrarse a un sujeto en el momento de la administración del constructo de expresión de IL-10 o hasta 10 días antes de la administración del constructo de expresión de IL-10, por ejemplo, como “pretratamiento”.

60 En algunos aspectos, la articulación inflamación está en la rodilla, el codo, la muñeca, el tobillo, la cadera, el hombro o la columna vertebral. Los estados que pueden tratarse mediante los métodos de la presente invención incluyen artritis reumatoide y artrosis, así como tendinitis, bursitis, inflamación del ligamento, sinovitis, gota y lupus eritematoso sistémico.

65

Por tanto, algunos aspectos de la divulgación proporcionan métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las articulaciones o trastornos o síntomas asociados con las mismas en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto de IL-10 antiinflamatorio terapéutico que comprende: ADN plasmídico que comprende una estructura principal bacteriana y al menos una secuencia codificante de IL-10 y un diluyente; proporcionando el compuesto de IL-10 antiinflamatorio terapéutico una dosis terapéuticamente efectiva a una articulación a 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 pretratamiento antes de administrar los compuestos terapéuticos de IL-10. Los adyuvantes que se prefieren particularmente incluyen, pero no se limitan a, manosa, sacarosa, glucosa, fosfato de calcio, dendrímeros, liposomas, incluyendo liposomas catiónicos, y oligodesoxinucleótidos. Los adyuvantes de la presente invención en realizaciones preferidas son aquellos adyuvantes que aumenta la captación o eficacia del constructo de expresión de IL-10. La administración simultánea o el pretratamiento 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 o hasta 10 días antes de la administración del compuesto de IL-10 antiinflamatorio terapéutico.

Otros aspectos alternativos de la divulgación proporcionan métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las articulaciones que comprenden administrar al sujeto una composición antiinflamatoria terapéutica que comprende: un constructo de expresión de IL-10; micropartículas que encapsulan el constructo de expresión de IL-10; y un diluyente; proporcionando la composición de micropartículas terapéutica una dosis terapéuticamente efectiva a una articulación a 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.

Aún otros aspectos de la divulgación son métodos para ralentizar la progresión de enfermedades inflamatorias de las articulaciones en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto de IL-10 antiinflamatorio terapéutico que comprende: ADN plasmídico que comprende una estructura principal bacteriana y al menos una secuencia codificante de IL-10, proporcionando el constructo de expresión de IL-10 terapéutico una dosis terapéuticamente efectiva a una articulación a 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 tales realizaciones, se administra preferiblemente un adyuvante con el compuesto de IL-10 antiinflamatorio terapéutico o hasta 10 días antes de la administración del compuesto de IL-10 antiinflamatorio terapéutico, por ejemplo, como pretratamiento.

Opcionalmente en las realizaciones descritas, el constructo de expresión de IL-10 comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear ubicada o bien a desde 100 hasta 2000 pb 5' con respecto a la al menos una secuencia codificante de IL-10 y/o bien desde 150 hasta 450 pb 3' con respecto a la al menos una secuencia codificante de IL-10. En otros aspectos de la presente invención, el constructo de expresión de IL-10 comprende dos secuencias de direccionamiento nuclear, estando situada una secuencia de direccionamiento nuclear a desde 100 hasta 2000 pb 5' de la al menos una secuencia codificante de IL-10, y una secuencia de direccionamiento nuclear está situada a desde 150 hasta 450 pb 3' de la al menos una secuencia codificante.

Preferiblemente, la composición terapéutica se administra mediante inyección en la(s) articulación/articulaciones, y en realizaciones preferidas la composición terapéutica se administra mediante inyección intraarticular.

En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica para interleucina-10 tiene una sustitución de aminoácido para fenilalanina de tipo natural 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 para interleucina-10 codifica para IL-10^{F129S}. En aún otros aspectos, el constructo de expresión de IL-10 comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 5' con respecto a la secuencia

codificante de IL-10, y en algunos aspectos, el constructo de expresión de IL-10 comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 3' con respecto a la secuencia codificante de IL-10.

5 En algunos aspectos de la presente invención, las micropartículas comprenden uno o más de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(N-vinilpirrolidona), poli(metacrilato de metilo), poli(vinilo alcohol), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(etilenglicol), poli(ácido metacrílico), polilactidas (PLA), poliglicolidas (PGA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), polianhídridos, policaprolactona, poli-3-hidroxibutirato o poliortoésteres. 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 presentan diferentes perfiles de liberación complementarios.

15 En determinadas realizaciones de los métodos, el constructo de expresión de IL-10 antiinflamatorio terapéutico (y cualquier adyuvante o adyuvante de "pretratamiento"), se suministra aproximadamente de 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 suministra aproximadamente de cada 40 a 120 días según sea necesario para el efecto terapéutico durante más de un año. En aún otras realizaciones, la composición antiinflamatoria terapéutica se suministra según sea necesario para el efecto terapéutico aproximadamente cada de 40 a 120 días, según sea necesario, para la vida del sujeto.

20 Los métodos de la divulgación también pueden emplearse como herramienta de investigación para identificar productos farmacéuticos, pequeñas moléculas y/o agentes biológicos que pueden usarse conjuntamente en un "cóctel" con las composiciones de expresión de IL-10 terapéuticos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 La Figura 1 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención.

30 La Figura 2 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del titular de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención.

35 La Figura 3 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención (datos agrupados).

40 La Figura 4 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del titular de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención (datos agrupados).

45 La Figura 5 muestra resultados que ilustran las mejoras en el rango de movimiento conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención (datos agrupados).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 Definiciones

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

60 El término adyuvante tal 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, un adyuvante se usa para aumentar la eficacia del compuesto antiinflamatorio de IL-10 terapéutico. Los adyuvantes de utilidad particular en la presente invención incluyen aquellos que potencian la captación o eficacia del constructo de expresión de IL-10 mediante, por ejemplo, macrófagos u otras células inmunitarias presentes en el líquido sinovial de la articulación.

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

El término "citocina antiinflamatoria" tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que reduce la acción o producción de una o más citocinas o proteínas proinflamatorias producidas por nervios, neuronas, células gliales, células endoteliales, fibroblastos, músculo, células inmunitarias u otros tipos de célula. Las citocinas y proteínas inflamatorias incluyen, sin limitación, interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y similares. Ejemplos no limitativos de citocina antiinflamatorias incluyen interleucina-10 (IL-10) incluyendo IL-10 viral, interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13), alfa-MSH, factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF β 1), y similares. Por tanto, las moléculas de longitud completa y fragmentos de citocina antiinflamatorias, así como citocinas antiinflamatorias con modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (ya sean de naturaleza conservativa o no conservativa), en la secuencia nativa, están previstas para su uso en el presente documento, siempre que la citocina antiinflamatoria sea terapéuticamente efectiva. 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 debido a amplificación de PCR. Por consiguiente, las proteínas activas normalmente son sustancialmente homólogas a la secuencia parental, por ejemplo, las proteínas normalmente son homólogas en aproximadamente el 70 ... 80 ... 85 ... 90 ... 95 ... 98 ... 99%, etc. a la secuencia parental.

Una "secuencia codificante" de una citocina antiinflamatoria o una secuencia que "codifica para" una citocina antiinflamatoria es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) a un polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias control apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante nucleótidos que corresponden a un codón de inicio en el extremo aminoterminal y nucleótidos que corresponden a un codón de terminación de traducción en el extremo carboxilterminal.

El término "secuencias control" de ADN se refiere colectivamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de transcripción, dominios reguladores en el sentido de 5', orígenes de replicación, sitios de entrada de ribosomas internos, potenciadores, y similares, que proporcionan colectivamente la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No es necesario que todos estos tipos de secuencias control estén presentes siempre que la secuencia codificante seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada.

Los términos "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" de un constructo de expresión de IL-10 terapéutico usado en los métodos de la invención se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente del constructo de expresión de IL-10 para proporcionar la respuesta deseada, tal como una disminución en la inflamación de las articulaciones, alivio de síntomas provocados por enfermedades inflamatorias de las articulaciones y/o prevenir la progresión del daño articular debido a enfermedades inflamatorias de las articulaciones. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, la gravedad del estado que esté tratándose y el constructo de expresión de IL-10 particular que deba suministrarse, ya se suministre el constructo de expresión de IL-10 en una micropartícula o como ADN desnudo, el modo de administración (por ejemplo, inyección intraarticular), y similares. En el presente documento se proporcionan parámetros de dosificación para los presentes métodos; sin embargo, la optimización de una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por parte de un experto habitual en la técnica usando los métodos expuestos en el presente documento y 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 del constructo de expresión de IL-10 terapéutico. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen solución salina, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, ácido hialurónico formulado opcionalmente con un tensioactivo, Pluronic F-68, aceites vegetales y polietilenglicoles.

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

El término "articulación" se refiere a una estructura anatómica en la que se unen dos huesos, incluyendo los ligamentos que conectan los huesos entre sí, los tendones que unen los músculos a los huesos, la cápsula articular, la bolsa y la sinovia. Las articulaciones que pueden tratarse con los métodos en el presente documento incluyen articulaciones fijas, de bisagra, pivotantes o de rótula.

El término "inflamación articular" se refiere a todos los tipos de artritis provocados por inflamación, de los que la artritis reumatoide, la artrosis son los más comunes, así como tendinitis, bursitis, inflamación del ligamento, sinovitis, gota y 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 citocina antiinflamatoria en una célula.

5 “Unido operativamente” se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Por tanto, las secuencias control unidas operativamente a una secuencia codificante pueden efectuar la expresión de la secuencia codificante. No es necesario que las secuencias control sean contiguas a la secuencia codificante siempre que funcionan para dirigir la expresión de la misma. Por tanto, por ejemplo, secuencias no traducidas pero transcritas intervinientes pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse “unida operativamente” a la secuencia codificante.

15 El término “promotor” se usa en el presente documento en su sentido ordinario para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, derivándose la secuencia reguladora de un gen que puede unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante en el sentido de 3'. Los promotores de transcripción pueden incluir “promotores inducibles” (cuando la expresión de una secuencia de polinucleótido unida operativamente al promotor se induce mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), “promotores reprimibles” (cuando la expresión de una secuencia de polinucleótido unida operativamente al promotor se induce mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.) y “promotores constitutivos”.

20 Con el propósito de describir la posición relativa de secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular a lo largo de toda la presente solicitud, tal como cuando se describe una secuencia de nucleótidos particular como que está situada “en el sentido de 5'”, “en el sentido de 3'”, “3 prima (3'”) o “5 prima (5'”) en relación con otra secuencia, debe entenderse que es la posición de las secuencias en la hebra “sentido” o “codificante” de una molécula de ADN a la que se hace referencia como es convencional en la técnica.

25 El término “herramienta de investigación” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier método de la invención que use los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos para investigación científica, ya sea de naturaleza académica o comercial, incluyendo el desarrollo de otros agentes 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 previstas para facilitar la investigación y ayudar en tales actividades de desarrollo, incluyendo cualquier actividad realizada con la intención de producir información para respaldar un envío regulatorio.

30 Los términos “sujeto”, “individuo” o “paciente” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un vertebrado, preferiblemente un mamífero.

35 El término “composición terapéutica” o “composición antiinflamatoria terapéutica” tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición que tiene la capacidad de disminuir la inflamación de las articulaciones, proporcionar alivio de los síntomas provocados por enfermedades inflamatorias de las articulaciones y/o prevenir la progresión del daño articular debido a enfermedades inflamatorias de las articulaciones tal como se mide en cualquiera de los modelos animales conocidos o mediante una evaluación realizada en seres humanos.

40 “Tratamiento” de o “tratar” una inflamación articular incluye: (1) disminuir la inflamación de la articulación o provocar que la inflamación se produzca con menos intensidad en un sujeto que pueda estar predispuesto a una inflamación articular pero aún no experimenta ni muestra síntomas, o (2) inhibir la inflamación articular, es decir, detener el desarrollo de o invertir los síntomas o el daño fisiológico provocado por la inflamación.

45 Un “vector viral” tal como se usa en el presente documento es un virus o partícula vira producida de manera recombinante que comprende un constructo de expresión de IL-10 que debe suministrarse a una célula huésped, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores de alfavirus y similares.

50 La práctica de las técnicas descritas en el presente 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 la habilidad de aquellos que practican en la técnica. Pueden tenerse ilustraciones específicas de técnicas adecuadas mediante referencia a los ejemplos en el presente documento. Sin embargo, también pueden usarse naturalmente otros procedimientos convencionales equivalentes. Tales técnicas convencionales y descripciones pueden encontrarse en manuales de laboratorio convencionales tales 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 y Blackwell (Eds.), *Handbook of Experimental Immunology*, vols. I-IV (Blackwell Scientific Publications); Creighton (1993), *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman y 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*, cuarta ed. (W.H. Freeman); Gait (1984), “Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach” (IRL

Press); Nelson y Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry, tercera Ed. (W. H. Freeman); y Berg *et al.* (2002) Biochemistry, quinta Ed. (W.H. Freeman).

5 Obsérvese que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias a plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

10 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor interviniente, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o interviniente en ese intervalo establecido está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención intervalos que excluyen cualquier de los dos límites incluidos.

15 En la siguiente descripción se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, resultará evidente para un experto en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, características ampliamente conocidas y procedimientos ampliamente conocidos por los expertos en la técnica no se han descrito con el fin de evitar obstaculizar la invención.

20 Métodos de la invención

25 La presente invención proporciona una composición que comprende un constructo de expresión de IL-10 plasmídico bacteriano, en la que el constructo de expresión de IL-10 comprende una estructura principal bacteriana y una secuencia de ácido nucleico que codifica para interleucina-10 para su uso en un método de tratamiento de la artrosis o artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo el método inyectar la composición en una articulación inflamada del sujeto. La divulgación proporciona métodos para tratar enfermedades inflamatorias de las articulaciones, síntomas asociados con enfermedades inflamatorias de las articulaciones, y ralentizar la progresión de la enfermedad administrando a un sujeto - normalmente al que se le inyecta por medio de inyección intraarticular - un vector que expresa un constructo de expresión de interleucina-10 (IL-10) terapéutico. En algunas realizaciones, el constructo de expresión de IL-10 está encapsulado en micropartículas biodegradables, y en la mayoría de los aspectos de esta realización, las micropartículas están suspendidas en un diluyente para formar una composición terapéutica. Como alternativa, en realizaciones preferidas el vector de expresión de IL-10 terapéutico se suministra como vector “desnudo”, yendo el suministro del vector de expresión de IL-10 desnudo acompañado de o precedido por la administración de un adyuvante de captación de ácido nucleico. El adyuvante de captación de ácido nucleico puede administrarse o bien simultáneamente o bien hasta diez o más días antes de la administración del vector de expresión de IL-10 desnudo. Las composiciones para su uso en los métodos de la presente invención pueden ser para tratar una inflamación articular en la rodilla, codo, muñeca, tobillo, cadera, hombro, o columna vertebral. Estados que pueden tratarse son artritis reumatoide y artrosis, así como tendinitis, bursitis, inflamación del ligamento, sinovitis, gota y lupus eritematoso sistémico.

40 Por tanto, la divulgación proporciona en general métodos para tratar enfermedades inflamatorias de las articulaciones y síntomas y el daño fisiológico asociado con enfermedades inflamatorias de las articulaciones. La divulgación también proporciona el uso de los métodos en la investigación de enfermedades inflamatorias de las articulaciones, incluyendo la identificación de productos farmacéuticos, moléculas pequeñas y/o agentes biológicos que pueden usarse conjuntamente (en un “cóctel”) con el constructo de expresión de IL-10 terapéutico. Los métodos comprenden la etapa de administrar a un sujeto, preferiblemente mediante inyección en una articulación, un constructo de expresión de IL-10 que comprende una estructura principal bacteriana o viral y al menos una secuencia codificante de IL-10. En algunas realizaciones, el constructo de expresión de IL-10 está opcionalmente encapsulado en micropartículas biodegradables. Las composiciones antiinflamatorias están suspendidas generalmente en un diluyente para el suministro a una articulación. El constructo de expresión de IL-10 puede comprender al menos una secuencia de direccionamiento nuclear, siendo la al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 5', 3' o ambos con respecto a la secuencia codificante de IL-10.

55 Los compuestos antiinflamatorios pueden consistir en un vector bacteriano o vector viral “desnudo” que puede expresar la al menos una secuencia codificante de IL-10, o el compuesto antiinflamatorio puede consistir en un vector bacteriano o viral encerrado en micropartículas u otro dispositivo de suministro. La administración del constructo de expresión de IL-10 terapéutico puede ir acompañada de o precedida por la administración de un adyuvante, y en el caso del suministro de constructos de expresión de IL-10 desnudos, puede administrarse un adyuvante de captación de ácido nucleico simultáneamente o hasta diez días o más antes de la administración del constructo de expresión de IL-10 desnudo.

60 El constructo de expresión de IL-10 usado en la presente invención comprende una estructura principal bacteriana (ADN plasmídico o ADNp) al menos una secuencia codificante de IL-10, al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 5' (en el sentido de 5'), 3' (en el sentido de 3') o ambos de la al menos una secuencia codificante de IL-10, y una o más secuencias control de ADN. Opcionalmente, el ADNp también puede comprender una o más secuencias codificantes de citocina antiinflamatoria adicionales, y/o una secuencia marcadora para

5 permitir la selección de células transformadas durante la amplificación del ADNp. La estructura principal bacteriana puede ser cualquier estructura principal bacteriana conocida por los expertos en la técnica. Estructuras principales seleccionadas normalmente son aquellas que, por ejemplo, contienen o carecen de sitios de restricción apropiados para permitir la facilidad de clonación, pueden producirse y aislarse con facilidad, no son inmunogénicas, y similares. Por ejemplo, en la presente invención pueden usarse estructuras principales bacterianas derivadas de *E. coli*.

10 El ADN plasmídico comprende al menos una secuencia codificante de IL-10. La secuencia codificante de IL-10 puede codificar para IL-10 de tipo natural, o la IL-10 puede ser una IL-10 mutante. Una IL-10 mutante de interés contiene una o más mutaciones que provocan sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácido en comparación con la IL-10 de tipo natural en la región "bisagra" de la proteína IL-10. La proteína IL-10 humana es un homodímero, comprendiendo cada monómero 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 en forma de V no covalente. La región "bisagra" seleccionada como diana para la mutación según la presente invención comprende los aminoácidos entre las hélices alfa D y E en uno o ambos monómeros de aproximadamente la posición de aminoácido X a la posición Y de la IL-10 de tipo natural. Por ejemplo, se han descrito proteínas IL-10 de rata y humanas mutantes en las que la fenilalanina en la posición 129 de la secuencia de tipo natural se ha reemplazado por un residuo de serina (véase, 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^{F129S}. Otras sustituciones para la fenilalanina de tipo natural en la posición de aminoácido 129 pueden ser, por ejemplo, treonina, alanina o cisteína. Por tanto, la presente invención abarca en aún otro aspecto una o más sustituciones en la posición de aminoácido 129 o en otros aminoácidos dentro de la región bisagra de la proteína IL-10, o equivalentes funcionales de las mismas.

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

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

40 Además de una estructura principal bacteriana, al menos una secuencia codificante de IL-10 y opcionalmente una o más secuencias codificantes de citocina antiinflamatoria adicionales y, opcionalmente, una o más secuencias de direccionamiento nuclear, el ADN plasmídico comprende una o más secuencias control de ADN, tales como secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de transcripción, dominios reguladores en el sentido de 5', orígenes de replicación, sitios de entrada de ribosomas internos y similares, que proporcionan colectivamente la replicación, transcripción y traducción de la secuencia(s) codificante(s) de citocina antiinflamatoria en una célula receptora. No es necesario que todas estas secuencias control estén siempre presentes siempre que las secuencias codificantes de citocina antiinflamatoria puedan replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada. Las secuencias promotoras incluyen, pero no se limitan a, promotores de β-actina de pollo o humanos, promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus, promotores de gliceraldehídos 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), promotor del factor de elongación 1α (eF1α), promotor de GFAP, promotor del virus de leucemia murina (MLV), promotor de la timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple, y promotores del elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE); los dominios reguladores en el sentido de 5' incluyen, pero no se limitan a, potenciadores del promotor prematura inmediato de citomegalovirus, potenciador del virus de tumor de mama de ratón (MMTV) y potenciador del virus 40 de simio (SV40); y las señales de poliadenilación de interés en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, señal de poliadenilación de SV40, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, y señales de poliadenilación sintéticas. Opcionalmente, el ADN plasmídico comprenderá también un gen marcador de selección, tal como el que codifica para la resistencia a antibióticos. Los genes marcadores incluyen, pero no se limitan a, neomicina, higromicina-B, ampicilina, kanomicina o puromicina.

60 Por ejemplo, se usaron 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 timidina cinasa de herpes simple que acciona un marcador de resistencia a neomicina en algunos experimentos que demuestran la utilidad de la presente invención. En otros experimentos, se usaron plásmidos que comprenden 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 ampicilina. Detalles de estos plásmidos se dan a conocer en Milligan, *et al.*, Pain 126:294-308 (2006).

Alternativamente, el vector puede ser un vector viral. En general, las cinco clases usadas más comúnmente de sistemas virales usados en terapia génica pueden categorizarse en dos grupos según si sus genomas se integran en la cromatina de la célula huésped (oncorretrovirus y lentivirus) o persisten en el núcleo celular predominantemente como episomas extracromosómicos (virus adenoasociados, adenovirus, virus del herpes, y lentivirus de integración deficiente). Por ejemplo, se utilizan virus de la familia *Parvoviridae*. *Parvoviridae* es una familia de virus de ADN no envuelto, monocatenario, pequeño con genomas de aproximadamente 5000 nucleótidos de longitud. Entre los miembros de la familia se incluye virus adenoasociado (AAV), un parvovirus dependiente que por definición requiere la infección conjunta con otro virus (normalmente un adenovirus o virus del herpes) para iniciar y sostener un ciclo infeccioso productivo. En ausencia de un virus auxiliar de este tipo, AAV es todavía competente para infectar o transducir una célula diana mediante unión mediada por receptor e internalización, penetrando en el núcleo tanto en células que no se dividen como células que se dividen.

Otro sistema de suministro viral útil con los constructos de expresión de IL-10 es un sistema basado en virus de la familia *Retroviridae*. Los retrovirus comprenden virus animales de ARN monocatenario que se caracterizan por dos características únicas. En primer lugar, el genoma de un retrovirus es diploide, consistiendo en dos copias del ARN. En segundo lugar, este ARN se transcribe mediante la enzima asociada a viriones transcriptasa inversa en ADN bicatenario. Este ADN bicatenario o provirus puede integrarse entonces en el genoma huésped y pasarse de la célula parental a células de progeñe como componente integrado de manera estable del genoma huésped.

En algunos casos los lentivirus son los miembros preferidos de la familia de retrovirus para su uso en la presente divulgación. Los vectores de lentivirus se someten a menudo a pseudotipado con la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), y se han derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA); visna, que provoca encefalitis (visna) o neumonía en ovejas; virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), que provoca anemia hemolítica autoinmune y encefalopatía en caballos; virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), que provoca inmunodeficiencia en gatos; virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV) que provoca linfadenopatía y linfocitosis en ganado bovino; y virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), que provoca inmunodeficiencia y encefalopatía en primates no humanos. Los vectores que se basan en VIH conservan generalmente <5% del genoma parental, y <25% del genoma se incorpora a constructos de empaquetamiento, lo que minimiza la posibilidad de la generación de VIH competente para la replicación reversible. La bioseguridad se aumenta adicionalmente mediante el desarrollo de vectores autoinactivadores que contienen deleciones de los elementos reguladores en la secuencia de repetición termina larga en el sentido de 3', eliminando la transcripción de la señal de empaquetamiento que se requiere para la movilización del vector. La ventaja principal del uso de vectores lentivirales es que la transferencia génica es persistente en la mayoría de los tejidos o tipos de células debido a la integración del vector viral. Sin embargo, también puede usarse lentivirus que es deficiente para integrarse.

Los adenovirus (Ad) son un grupo homogéneo de virus caracterizado de manera relativamente amplia, que incluyen más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT internacional n.º WO 95/27071. Los adenovirus son virus icosaédricos de tamaño medio (90-100 nm), sin envuelta (sin una bicapa lipídica externa) compuestos por una cápside de núcleo y un genoma de ADN lineal bicatenario. 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 consisten en ADN bicatenario y son los virus sin envuelta más grandes. Debido a su gran tamaño, pueden transportarse a través del endosoma (es decir, no es necesaria la fusión de la envuelta). El virión también tiene una única "espiga" o fibra asociada con cada base de pentona de la cápside que ayuda a la unión a la célula huésped por medio del receptor de adenovirus Coxsackie en la superficie de la célula huésped.

El genoma de adenovirus es ADN bicatenario (ds) no segmentado, lineal, que tiene entre 26 y 45 kb, permitiendo al virus portar teóricamente de 22 a 40 genes. Aunque esto es significativamente mayor que otros virus en su grupo Baltimore, es todavía un virus muy simple y depende en gran medida de la célula huésped para su supervivencia y replicación. Una vez que el virus ha accedido satisfactoriamente a la célula huésped, el endosoma se acidifica, lo que altera la topología del virus provocando 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. El ADN viral se libera posteriormente, que puede entrar en el núcleo por medio del poro nuclear. Tras esto, el ADN se asocia con moléculas de histona. Por tanto, puede producirse la expresión génica viral y pueden generarse nuevas partículas de virus.

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

También pueden usarse otros sistemas virales o no virales conocidos por los expertos en la técnica para suministrar constructos de expresión de IL-10 a la articulación, incluyendo, pero sin limitarse a, vectores de transposición de adenovirus con genes deletados que mantiene de manera estable los transgenes codificados por virus *in vivo* a través de la integración en células huésped (véase Yant, *et al.*, Nature Biotech. 20:999-1004 (2002)); sistemas derivados de virus Sindbis o virus del bosque Semliki (véase Perri, *et al.*, J. Virol. 74(20):9802-07 (2002)); sistemas derivados de virus de la enfermedad de Newcastle o virus Sendai; o vectores de ADN de minicírculo que carecen de secuencias de ADN bacterianas (véase Chen, *et al.*, Molecular Therapy. 8(3):495-500 (2003)). El ADN de minicírculo tal como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0214329 da a conocer vectores que proporcionan niveles persistentemente altos de transcripción de ácido nucleico.

Una vez que el constructo de expresión de IL-10 se ha construido, amplificado y aislado mediante técnicas conocidas en la técnica, el constructo de expresión de IL-10 se encapsula entonces opcionalmente, en algunas realizaciones, dentro de micropartículas. Las técnicas para encapsular el constructo de expresión de IL-10 varían dependiendo del tipo de micropartículas usadas y tales técnicas se describen en más detalle más adelante. Las micropartículas pueden estar compuestas de cualquier polímero biodegradable. Para usarse satisfactoriamente como polímero biodegradable en las formulaciones de suministro de fármaco controlado, el material tiene que ser químicamente inerte y estar libre de impurezas lixiviables. De manera ideal, el polímero también tiene una estructura física apropiada, con un envejecimiento no deseado mínimo y puede procesarse fácilmente. Algunos de los materiales incluyen poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(N-vinilpirrolidona), 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 en la presente invención incluyen polilactidas (PLA), poliglicolidas (PGA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), polianhídridos, policaprolactona, poli-3-hidroxi-butarato y poliortoésteres. Tales polímeros biodegradables se han caracterizado extensamente y pueden formularse para presentar propiedades de degradación deseadas tal como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Edlund & Albertsson, Degradable Aliphatic Polyesters, págs. 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-glicolidas) (PLGA). PLGA es un copolímero que se usa en un huésped de dispositivo terapéutico aprobado por la FDA, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. PLGA se sintetiza por medio de copolimerización de apertura de anillo aleatoria de dos monómeros diferentes, los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) de ácido glicólico y ácido láctico. Los catalizadores comunes usados 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 PLGA mediante enlaces éster, produciendo así un poliéster alifático lineal como producto.

Dependiendo de la relación de lactida con respecto a glicolida usada para la polimerización, pueden obtenerse diferentes formas de PLGA: se identifican habitualmente en cuanto a la relación de monómeros usada (por ejemplo, PLGA 75:25 identifica un copolímero cuya composición es el 75% (por ciento molar) de ácido láctico y el 25% (por ciento molar) de ácido glicólico). PLGA se degrada mediante la hidrólisis de sus enlaces éster en presencia de agua. Se ha mostrado que el momento requerido para la degradación de PLGA se refiere a la relación de monómeros usada en la producción: cuanto mayor sea el contenido de unidad de glicolida, menor será el tiempo requerido para la degradación. Una excepción a esta regla es el copolímero con una relación de monómeros 50:50 que presenta la degradación más rápida (aproximadamente dos meses). Además, los polímeros que tienen los extremos ocupados con ésteres (en oposición al ácido carboxílico libre) muestran vidas medias de degradación más largas. Resulta de uso particular en la presente invención 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 preferida para su uso en la presente invención 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 de la presente invención, se usa PLGA que tiene una composición del 50% de ácido láctico y del 50% de ácido glicólico.

Adicionalmente, los constructos de expresión de IL-10 (ADNp) pueden encapsularse en lotes de micropartículas que tienen diferentes perfiles de liberación; por ejemplo, el 10% del ADNp que debe suministrarse puede encapsularse en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de un día a cuatro semanas; el 30% del ADNp que debe suministrarse puede encapsularse en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de tres semanas a seis semanas; el 30% del ADNp que debe suministrarse puede encapsularse en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de seis semanas a diez semanas; y el 30% del ADNp que debe suministrarse puede encapsularse en micropartículas que tienen, por ejemplo, un perfil de liberación de ocho semanas a doce semanas. En una realización de este tipo, puede usarse un único tipo de polímero biodegradable, pero usarse en formulaciones con diferentes perfiles de liberación; alternativamente pueden usarse diferentes polímeros biodegradables que tienen diferentes características de liberación. En aún otra realización, la formulación de las micropartículas puede variarse para cambiar la superficie de las micropartículas para potenciar o retardar, según se desee, el desplazamiento de la composición terapéutica a través de, por ejemplo, el líquido 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 los constructos de expresión de IL-10 de la presente invención se suministran como ADN desnudo en oposición a estar encapsulado, también se usan diluyentes para la administración al sujeto. Tales diluyentes (o excipientes) incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin toxicidad indebida. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden comprender sorbitol, alumbre, dextrano, sulfato, aniones poliméricos grandes, cualquier 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 en las mismas sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácido mineral tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácido orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento de pH, y similares, en tales vehículos. En un aspecto de la invención, se usan diferentes diluyentes basándose en su capacidad para migrar a través del sitio seleccionado como diana en la articulación. Por ejemplo, para el suministro en un ser humano adulto, pueden preferirse diluyentes que favorecen una propagación más rápida de la composición terapéutica a través de la articulación; a la inversa, en niños o animales pequeños en los que el tamaño de la articulación es de menor importancia, puede usarse un diluyente que no dispersa la composición terapéutica rápidamente. Una discusión exhaustiva de diluyentes/excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005). Los diluyentes preferidos incluyen, pero no se limitan a, Physiosol®, líquido sinovial artificial, NaCl al 0,9% libre de conservantes, solución para inyección de Ringer con lactato y solución Elliotts B®.

La síntesis y la administración de las composiciones que deben usarse en los métodos de la presente invención implican una serie de etapas. En primer lugar, se construye un plásmido que comprende los diversos componentes descritos anteriormente. Entonces se amplifica el ADN plasmídico (ADNp) y se aísla mediante técnicas ampliamente conocidas en la técnica. Una vez que el ADNp está aislado, puede combinarse con polímeros para formar micropartículas que contienen ADNp. Los métodos para la formación de micropartículas varían dependiendo de los polímeros usados, sin embargo, normalmente se emplea una técnica de emulsión doble. En primer lugar, se disuelve un polímero en un disolvente orgánico. A continuación, se suspende ADNp en una disolución acuosa y se añade a la disolución de polímero. Las dos disoluciones se mezclan entonces para formar una primera emulsión. Las disoluciones pueden mezclarse mediante vórtex o agitación o mediante el paso a través de un medio particulado que produce turbulencia, o la mezcla puede sonicarse. Lo más preferible es cualquier método mediante el cual el ácido nucleico reciba la menor cantidad de daño en forma de corte, cizallamiento o degradación, al tiempo que todavía permita la formación de una emulsión apropiada. Durante este proceso, el polímero se forma en micropartículas, muchas de las cuales contienen ADNp. Si se desea, puede aislarse una pequeña cantidad del ácido nucleico en este punto con el fin de evaluar la integridad, por ejemplo, mediante electroforesis en gel.

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

La capacidad para internalizar micropartículas de diferente tamaño varía con el tipo de célula. En determinadas realizaciones, se seleccionaron como diana macrófagos y células de presentación de antígeno. Tales células internalizan de manera más eficiente micropartículas de menos de aproximadamente 5 μ (véase Shakweh, *et al.*, Eur J of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 61(1-2):1-13 (2005)). Por tanto, si se desea, pueden hacerse pasar las partículas a través de tamices de cribado para eliminar de manera selectiva aquellas mayores del tamaño deseado. En un aspecto particular de la invención, se usan micropartículas de menos de 5 μ en la composición terapéutica, y en otros aspectos particulares de la invención, se usan micropartículas de menos de 3 μ en la composición terapéutica. Tras el lavado, las partículas pueden o bien usarse inmediatamente o bien liofilizarse para su almacenamiento. La distribución de tamaño de las micropartículas preparadas mediante los métodos descritos en el presente documento puede determinarse con, por ejemplo, un contador Coulter™ o difracción láser. Alternativamente, el tamaño promedio de las partículas puede determinarse mediante visualización bajo un microscopio equipado con un portaobjetos calibrado o un ocular. Alternativamente, puede usarse un microscopio electrónico de barrido para evaluar tanto el tamaño como la morfología de las micropartículas.

Una vez obtenidas las micropartículas que contienen constructo de expresión de IL-10, las micropartículas pueden suspenderse inmediatamente en diluyente o liofilizarse para su almacenamiento. La combinación de las micropartículas y diluyente forma la composición de micropartículas terapéutica que puede administrarse mediante inyección en una articulación a un sujeto animal. Los vectores recombinantes pueden introducirse o bien *in vivo* o

bien *in vitro* (también denominado *ex vivo*) para tratar la inflamación articular. Si se transducen *in vitro*, se elimina la célula receptora deseada o líquido sinovial del sujeto, se trata con micropartículas que contienen ADNp y vuelve a introducirse en el sujeto. Alternativamente, pueden transformarse células singénicas o xenogénicas para el suministro, no generando tales células normalmente una respuesta inmunitaria inapropiada en el sujeto. Si se administran *in vivo*, los vectores recombinantes o células transformadas con los vectores *in vitro* se suministran directamente mediante inyección en la articulación.

Los constructos de expresión de IL-10 se administran, en una realización alternativa, como ADN desnudo. En una realización de este tipo, los constructos de expresión de IL-10 se amplifican, por ejemplo, usando prácticas de fabricación de buena calidad. Las BPF se aplican en los Estados Unidos mediante la U.S. Food and Drug Administración (FDA), en la sección 501(B) de la Ley de alimentos, medicamentos y cosméticos de 1938 (21 USCS § 351).

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

Un adyuvante de interés particular es D-manosa. La D-manosa es un azúcar de hexosa simple con un peso molecular de 180,2 y se conoce que: reduce los procesos inflamatorios durante la curación de heridas (Kossi J, *et al.*, Eur Surg Res, 31(1):74-82 (1999), reduce las explosiones oxidativas requeridas durante la inflamación (Rest RF, *et al.*, J Leukoc Biol, 43(2):158-164 (1988)), suprime la artritis inducida por adyuvantes en un modelo de rata (Willenborg DO, *et al.*, Immunol Cell Biol, 70(Pt 6):369-377 (1996)), inhibe la IL-1 β inducida por LPS, TNF- α , reduce el NF-kB/p65 crítico para la expresión de citocinas proinflamatorias y reduce el flujo de leucocitos tras la instilación intratraqueal de LPS, que es un modelo de lesión pulmonar aguda asociada con septicemia 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 glicoproteína transmembrana implicado en la defensa del huésped de inmunidad innata reconociendo ligandos manosilados (por ejemplo, hidrolasas liposómicas) que pueden incluir una variedad de 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, *et al.*, Adv Exp Med Biol, 479:1-14 (2000); Stahl PD, *et al.*, Curr Opin Immunol, 10(1):50-55 (1998)).

Dado 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 suministrarse aproximadamente de cada 40 a 120 días (o según se requiera) según sea necesario para el efecto terapéutico para terapia a corto plazo. Sin embargo, cuando se desee terapia a largo plazo, la composición terapéutica puede suministrarse aproximadamente de cada 40 a 120 días (o más o menos) según sea necesario para el efecto terapéutico durante más de un año; y si es necesario, durante toda la vida del sujeto. La frecuencia de dosificación depende de la dosificación, el adyuvante usado y la salud del sujeto.

Los intervalos de dosificación de las composiciones terapéuticas usadas en los métodos de la presente invención varían de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad del estado que esté tratándose, el sitio de la articulación y el constructo de expresión de IL-10 particular que debe suministrarse, si el constructo de expresión de IL-10 está encapsulado o no, el modo de administración, y similares. Los intervalos de dosificación incluyen una dosis terapéuticamente efectiva por articulación a aproximadamente 1-1000 μ g de ADN de vector, aproximadamente 5-750 μ g de ADN de vector, aproximadamente 10-600 μ g de ADN de vector, 20-500 μ g de ADN de vector, 25-250 μ g de ADN de vector o 50-100 μ g de ADN de vector.

Los constructos de expresión de IL-10 o las micropartículas que contienen los constructos de expresión de IL-10 usados en los métodos de la presente invención pueden administrarse conjuntamente en un "cóctel" con otros agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la inflamación articular incluyendo glucocorticoides; metotrexato; hidroxcloroquina; sulfasalazina; lefunomida; agentes anti-TNF tales como etanercept, infliximab y adalimumab; abatacept; ácido hialurónico, particularmente ácido hialurónico de alto peso molecular (>1 MDa) tal como Hyalgan, Orthovisc o Synvisc a una dosis de, por ejemplo, el 0,5-2,5% (de 5 a 25 mg/ml) desde 1 hasta 5 ml, así desde 5 mg hasta 125 mg por articulación; y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Adicionalmente, los constructos de expresión de IL-10 o las micropartículas que contienen los constructos de expresión de IL-10 usados en los métodos de la presente invención puede administrarse conjuntamente con células, tales como células madre mesenquimatosas u otras células madre, incluyendo células madre modificadas mediante bioingeniería para expresar constructos de expresión de IL-10. Generalmente, cualquier método conocido en la técnica puede usarse para monitorizar el éxito de tratamiento en seres humanos, incluyendo indicadores tanto clínicos como fenotípicos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención tal como se muestra en las realizaciones específicas descritas ampliamente. Por tanto, las presentes realizaciones deben considerarse en todos los aspectos ilustrativos y no restrictivos.

Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunas desviaciones y errores experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión a atmosférica o casi atmosférica.

Amplificación y purificación de ADNp

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

Preparación y caracterización de micropartículas

Se prepararon micropartículas usando un protocolo de emulsión/evaporación de disolvente doble modificado (A.M. Tinsley-Bown, *et al.*, J. of Controlled Release 66(2-3): 229-41 (2006)). Resumiendo, se disolvió un de PLGA 50:50 (PM 75.000, Lactel Absorbable Polymers) en acetato de etilo (Sigma). Se emulsionaron vehículo solo (solución salina tamponada con fosfato (PBS) + sacarosa al 3% (p/v) (Sigma)) o ADNp en vehículo en la disolución de PLGA seguida de una segunda emulsión en un poli(alcohol vinílico) al 5% (p/v), cloruro de calcio al 28%, sacarosa al 3% (Sigma) y disolución de acetato de etilo al 7% (v/v). Tras 4 horas de endurecimiento en una disolución de lavado, se recogieron las micropartículas resultantes, se liofilizaron y se almacenaron a 4°C. Se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) para examinar la morfología de las micropartículas. Los diámetros de >1000 micropartículas presentes en 10 imágenes diferentes se midieron con software NIH ImageJ y se usaron los 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 se sometieron a prueba los niveles de endotoxina de las micropartículas resultantes mediante el ensayo LAL, usando una dilución en serie como control para la inhibición. Las micropartículas utilizadas presentaban una morfología esférica y lisa bajo SEM y un potencial zeta de $-28,04 \pm 2,12$ mV. Las micropartículas presentaban una distribución de tamaño heterogénea con un diámetro medio global de $4,67 \pm 0,26$ µm, que es consistente con métodos similares de fabricación de micropartículas y la eficiencia de encapsulación de ADNp para las partículas era del 55,1%.

La encapsulación de ADNp total se evaluó extrayendo ADNp de micropartículas por medio de disolución de hidróxido de sodio, midiendo la absorbancia a 260 nm y comparando los valores obtenidos con patrones de ADN a concentraciones conocidas. Las cargas de ADNp finales eran de $8,78 \pm 0,65$ µg de ADNp/mgPLGA 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 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 había expuesto 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 contenía bromuro de etidio, corriendo el gel a 75 V durante 2 horas y obteniendo imágenes del gel con transiluminación UV a 305 nm. Se evaluó la actividad biológica del ADNp extraído acuoso mediante transfección mediada por lipofectamina en células 293 de riñón embrionario humano según los protocolos del fabricante (Invitrogen) y se evaluaron las concentraciones de proteína IL-10 en sobrenadantes de cultivo celular recogidos 24 horas tras la transfección con ADNp extraído acuoso y no encapsulado mediante ELISA (R&D Systems). Se llevó a cabo un perfil de liberación *in vitro* incubando micropartículas en PBS a lo largo del tiempo en un baño de agua a 37°C y se cuantificaron los contenidos de ADNp en el sobrenadante mediante un ensayo PicoGreen (Milligan, *et al.*, Neuron Glia Biology 2(4) 293-308 (2006)).

La electroforesis en gel de agarosa de ADNp extraído acuoso de micropartículas en comparación con ADNp no encapsulado indicó que se conservada una cantidad significativa de la integridad estructural de ADNp relajado y superenrollado tras la encapsulación, aunque se observó una ligera detección de ADNp linealizado y se observaron ligeras alteraciones en la migración de especies de ADNp multimérico tras la encapsulación. Comparando los niveles de expresión de proteína IL-10 resultantes en los sobrenadantes de células 293 de riñón embrionario humano 24 horas tras la transfección mediada por lipofectamina con ADNp extraído de micropartículas adaptadas a la dosis o no encapsulado, se determinó que el ADNp-IL-10 extraído de micropartículas presentaba una retención de actividad biológica del 96,8% para la producción resultante de IL-10 (datos no mostrados). El análisis de liberación de ADNp *in vitro* demostró que el 30% del ADNp se liberó tras 3 días y se consiguió una liberación constante durante más de 75 días. Este perfil de liberación de dos fases es una característica común de la liberación de macromoléculas de una emulsión a base de micropartículas de PLGA, debiéndose la fase potenciada de liberación de ADNp inicial a un contenido de ADNp aumentado en o cerca de la superficie de las micropartículas que fue seguida de una liberación y difusión sostenida de ADNp desde el interior de las micropartículas (Yeo, Archive of Endotoxin Res. 27(1): 1-12 (2004)). Los niveles de endotoxina de micropartículas con y sin ADNp encapsulado estaban 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).

D-manosa

En realizaciones en las que se emplea un adyuvante tal como D-manosa, la D-manosa (n.º de catálogo M6020) puede adquirirse libre de portador de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La D-manosa se combina con BSA al 0,1% en solución salina estéril y se administra por medio de inyección intraarticular o bien simultáneamente con el constructo de expresión de IL-10 o bien de uno a diez días antes de la administración del constructo de expresión de IL-10. La D-manosa se suministra normalmente a una dosificación de 2,5 µg - 500 µg por articulación en perros.

Administración para el tratamiento de inflamación articular en perros

El constructo de expresión de IL-10 (ADNp-IL-10^{F129S}) como ADNp "desnudo" se administró mediante inyección intraarticular aguda a una articulación afectada en una serie de perros. Bajo sedación IV y monitorización anestésica, se recortó quirúrgicamente la articulación afectada del paciente canino para eliminar todo el pelo sobre la articulación afectada y se esterilizó utilizando un lavado quirúrgico, tal como clorhexidina al 2%. Se monitorizaron la frecuencia cardíaca, la tensión arterial, la saturación de oxígeno, la ventilación y el ritmo cardíaco del paciente. Se insertó una aguja hipodérmica de calibre 22 o 20 en el espacio sinovial. Se aspiró el líquido sinovial antes de la administración del ADNp para garantizar una colocación apropiada 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 había aspirado el líquido sinovial, se administró la composición antiinflamatoria terapéutica a la articulación utilizando la misma aguja intraarticular. Se inyectó hasta 1 mg de equivalente de ADN plasmídico, aunque se encontró que tan solo 700 µg eran efectivos. Cuando el volumen por inyección en la articulación durante la administración supero 1 ml, se aspiró líquido articular para compensar. Tras la colocación satisfactoria de la composición antiinflamatoria terapéutica dentro del espacio articular, se revirtió en el paciente los efectos sedantes y se monitorizó clínicamente. Cualquier cambio en la tensión arterial, frecuencia cardíaca, oxigenación, ventilación o ritmo cardíaco durante el procedimiento se corrigió con los tratamientos médico apropiados. Los efectos anticipados de la sedación incluyen bradicardia, hipotensión, hipoventilación. La terapia con oxígeno fue continua durante todo el procedimiento para maximizar los niveles de saturación de oxígeno. Medicamentos sedantes que se adaptan a un paciente individual y medicamentos únicos o combinaciones de los siguientes:

A: dexmedetomidina 0,5 mg/m², reversión (atipamazol 0,05-0,2 mg/lb)

B: opioides -- butorfanol(0,05-0,1 mg/lb),

C: propofol - i.v. para el efecto

D: benzodiazepinas (diazepam): 0,1-0,2 mg/lb

Los sujetos permanecieron en el centro veterinario durante el día (menos de 12 horas) y entonces se les permitió que se marcharan a casa.

Las evaluaciones clínicas incluyeron evaluaciones de comportamiento de inventario de dolor breve canino del titular, una escala analógica visual, clínica, veterinaria, para el dolor y la movilidad, goniometría, la reducción/dependencia de productos farmacéuticos y la monitorización por video y de paso. La Figura 1 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención. Obsérvese que la administración de los constructos de expresión de IL-10 de la presente invención dio como resultado una mejora funcional significativa y la reducción de

dolor, en todos de la marcha, el trote, la manipulación, el rango de movimiento y la discapacidad funcional, particularmente en la marca de las 11 semanas.

5 La Figura 2 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del titular de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención. Obsérvese que de nuevo hubo una mejora significativa en todos los parámetros de actividad, calidad de vida, levantarse, caminar, correr y subir escaleras incluso en la semana 1.

10 La Figura 3 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación clínica de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención (datos agrupados). Los resultados de la evaluación clínica muestran resultados positivos significativos, particularmente en dolor.

15 La Figura 4 muestra resultados en forma de gráficos de barras que ilustran la evaluación del titular de la mejora funcional y la reducción de dolor conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención (datos agrupados). Obsérvese 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 en la semana 1.

20 La Figura 5 muestra resultados que ilustran mejoras en el rango de movimiento conseguidas tratando la artrosis de articulaciones de extremidades anteriores en perros tras la administración de los constructos de expresión de IL-10 terapéuticos de la presente invención (datos agrupados). Obsérvese que el cambio en grados de ángulo mostró una mejora significativa.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición que comprende un constructo de expresión de IL-10 plasmídico bacteriano, en la que el constructo de expresión de IL-10 comprende una estructura principal bacteriana y una secuencia de ácido nucleico que codifica para interleucina-10 para su uso en un método de tratamiento de la artrosis o artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicho método inyectar la composición en una articulación inflamada del sujeto.
- 10 2.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en el método el constructo de expresión de IL-10 se administra con un adyuvante.
- 3.- La composición para su uso según la reivindicación 2, en la que el adyuvante se selecciona de D-manosa, sacarosa, glucosa, fosfato de calcio, dendrímeros, oligonucleótidos, ácido hialurónico de alto peso molecular o liposomas.
- 15 4.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica para interleucina-10 tiene una sustitución de aminoácido de serina, alanina, treonina o cisteína para fenilalanina de tipo natural en la posición de aminoácido 129.
- 20 5.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica para interleucina-10 codifica para IL-10F^{129S}.
- 25 6.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el constructo de expresión comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 5' con respecto a la secuencia codificante de IL-10.
- 7.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el constructo de expresión comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear 3' con respecto a la secuencia codificante de IL-10.
- 30 8.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende micropartículas que encapsulan el constructo de expresión.
- 35 9.- La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que las micropartículas comprenden a polímero que comprende poli(ácido láctico-co-glicólico).
- 10.- La composición para su uso según la reivindicación 9, en la que las micropartículas comprenden un polímero que comprende poli(ácido láctico-co-glicólico) 50:50.
- 40 11.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el método comprende administrar una composición que comprende 1-1000 µg de un constructo de expresión de IL-10 bacteriano y 5-1000 µg de D-manosa.
- 45 12.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en el método la D-manosa se administra simultáneamente con el constructo de expresión de IL-10.
- 13.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en el método la D-manosa se administra hasta diez días antes de la administración del constructo de expresión de IL-10.
- 50 14.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ADN plasmídico comprende al menos una secuencia de direccionamiento nuclear tanto 5' y 3' con respecto a la secuencia codificante de IL-10.
- 55 15.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la articulación es una rodilla, codo, muñeca, tobillo, cadera, hombro o columna vertebral.

Figura 1

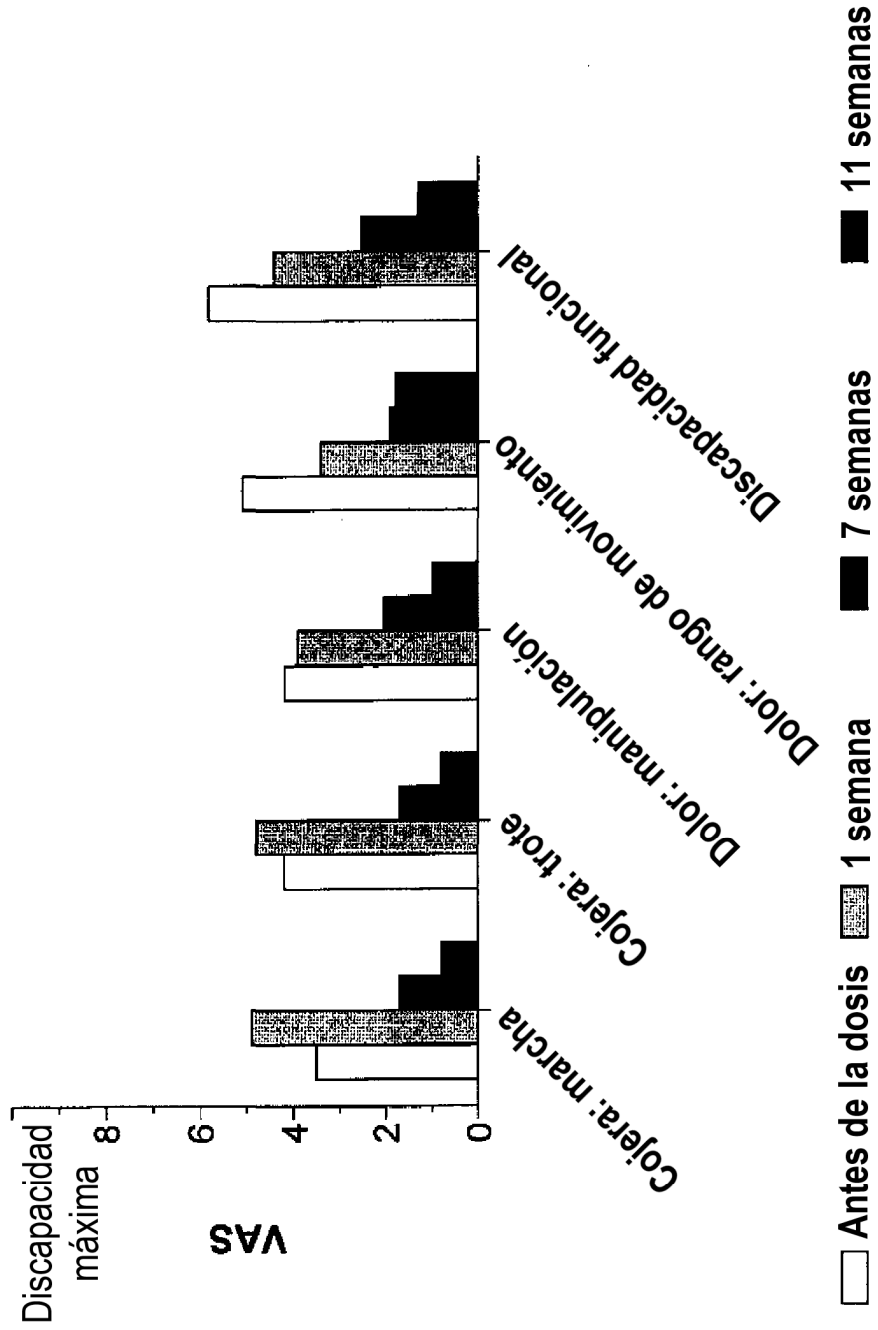


Figura 2:

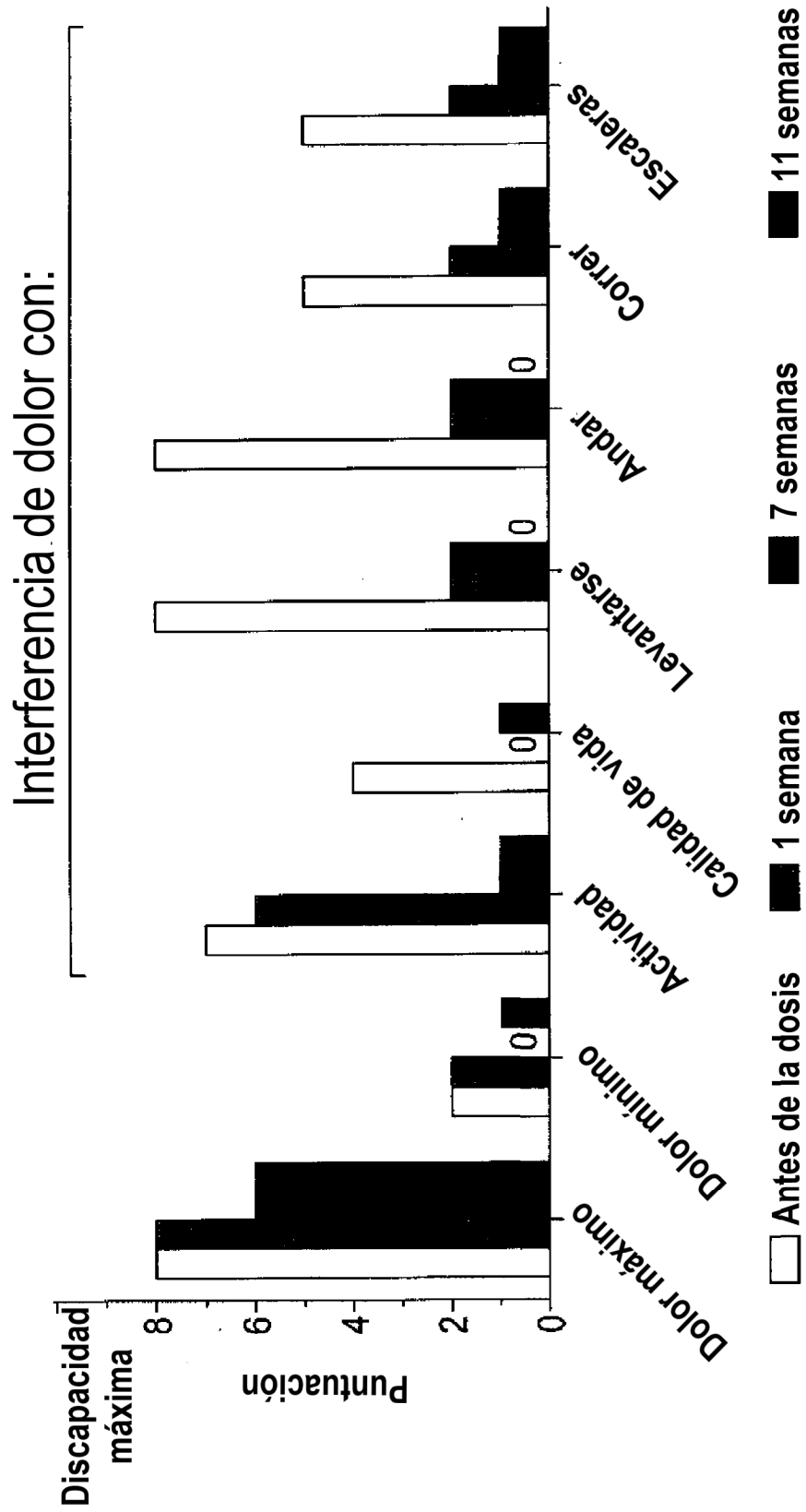


Figura 3

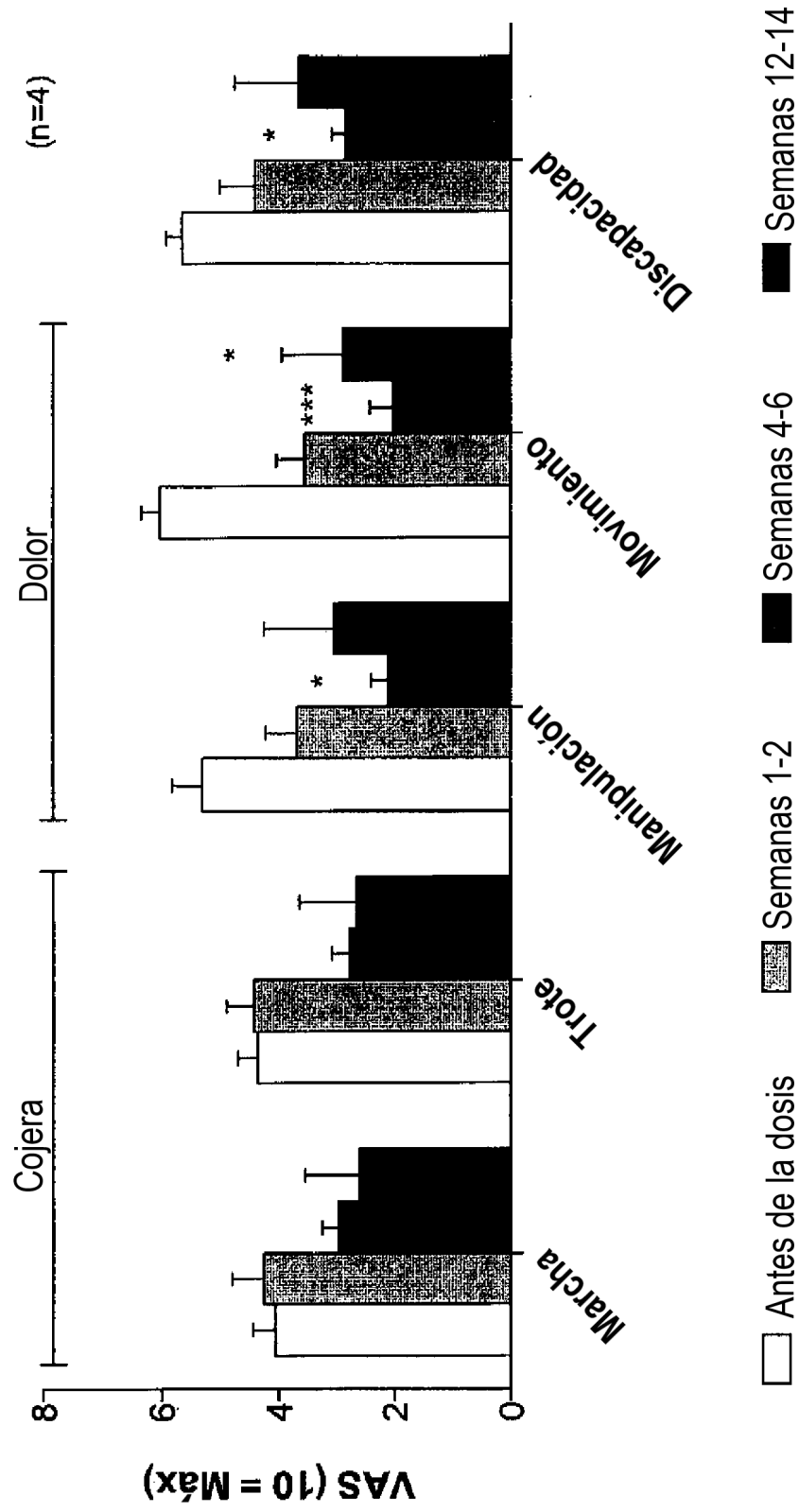


Figura 4

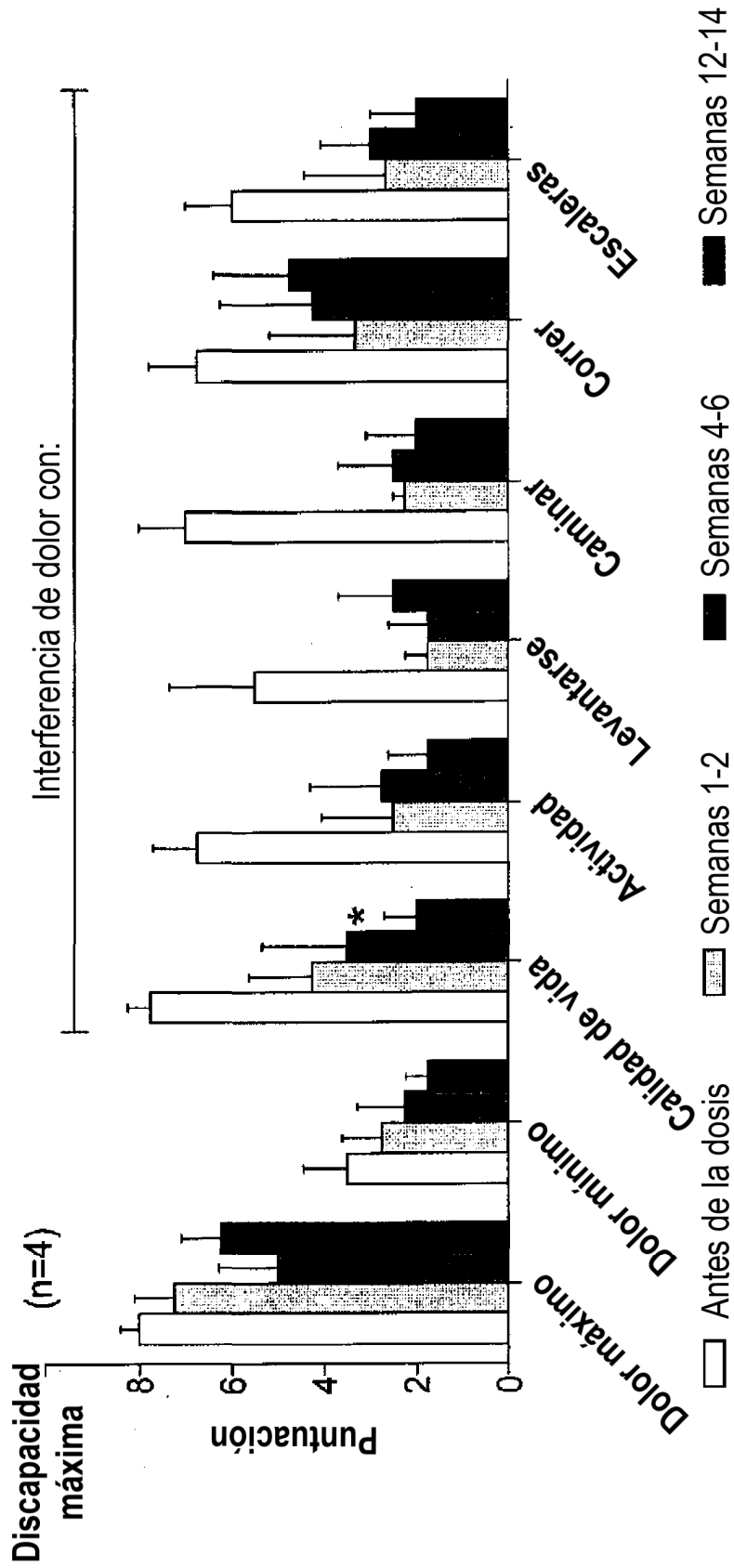
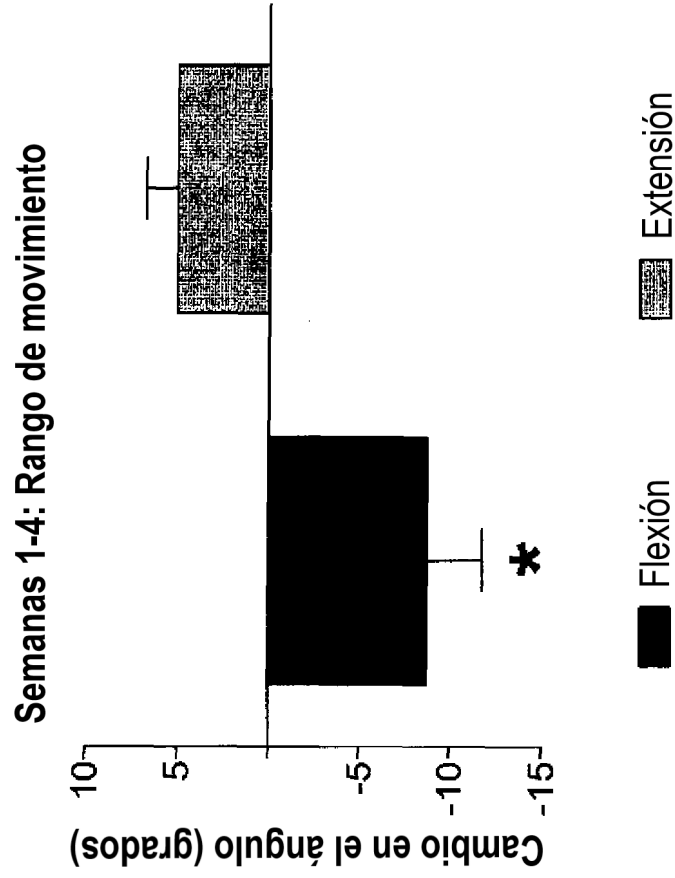


Figura 5



Mejora significativa en la flexión
n=6

Nota: Las mejoras de extensión están limitadas de manera inherente por la anatomía