



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 253**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05021001 .2**

86 Fecha de presentación : **06.08.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1624053**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54

Título: **Sustancias para prevenir y tratar enfermedades autoinmunes.**

30

Prioridad: **06.08.2002 US 401652 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73

Titular/es: **Loma Linda University**
2488 Prospect Street
Loma Linda, California 92354, US

72

Inventor/es: **Escher, Alan P. y**
Li, Fengchun

74

Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro**

ES 2 275 253 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

Sustancias para prevenir y tratar enfermedades autoinmunes.

5 Antecedentes

Las enfermedades autoinmunes causan morbilidad y mortalidad humana significativa. Estas enfermedades incluyen aproximadamente 80 enfermedades, tales como artritis reumatoide, lupus sistémico y esclerosis múltiple, y afectan a aproximadamente el 5% de la población de los Estados Unidos. Una enfermedad autoinmune, la diabetes de tipo 1, es la enfermedad crónica más frecuente en niños, y tiene una incidencia mundial creciente a un ritmo constante.

Generalmente, la aparición de diabetes de tipo I comienza con la presentación en células presentadores de antígeno (APC) de autoantígenos sintetizados por células pancreáticas beta. Esta presentación produce la destrucción por el sistema inmune de las células pancreáticas beta mediada principalmente por linfocitos T auxiliares 1 (Th1) y linfocitos T citotóxicos y, por tanto, la pérdida de producción de insulina.

Muchos enfoques profilácticos y terapéuticos para la diabetes de tipo I intentan evitar la destrucción de las células beta induciendo al sistema inmune a eliminar, inactivar o suprimir los linfocitos auto-reactivos patogénicos, tal como administrando vacunas que solamente suministran autoantígeno o administrando sustancias que son efectores directos del sistema inmune, tales como citoquinas. Sin embargo, las vacunas basadas en ADN actualmente disponibles no son completamente eficaces para prevenir la enfermedad, y el uso de algunas de estas vacunas está asociado con la inducción o potenciación de la autoinmunidad en lugar de prevenir la enfermedad. Además, el uso de citoquinas está asociado con una morbilidad significativa.

FILIPPOVA M. *ET AL*: "Effects of plasmid DNA injection on cyclophosphamide-accelerated diabetes in NOD mice" ADN AND CELL BIOLOGY, New York, NY, US vol. 20, n° 3, 1 de marzo de 2001 (01-03-2001), páginas 175-181, XP002295859 ISSN: 1044-5498, describe una composición que comprende ADN plasmídico que codifica una forma secretada de GAD que podría prevenir y retardar la diabetes, pero no describe una sustancia que comprenda una secuencia polinucleotídica que codifique E3-GP19K.

Por lo tanto, existe una necesidad de un nuevo método para prevenir, retardar la aparición de, o tratar enfermedades autoinmunes usando vacunas que no estén asociadas con estas desventajas. Además, existe la necesidad de un nuevo método para prevenir, retardar la aparición de, o tratar la diabetes de tipo I usando vacunas que no estén asociadas con estas desventajas.

Sumario

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un uso de una construcción polinucleotídica que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica Δ BCL-2 para la fabricación de un medicamento para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I.

En una realización, el medicamento se fabrica en unidades de dosificación de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg. En otra realización, el medicamento se fabrica en unidades de dosificación de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 4 mg. En otra realización, el medicamento se fabrica en unidades de dosificación de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 3 mg. En otra realización, el medicamento se fabrica en una forma adecuada para la administración intramuscular. En otra realización, el medicamento se fabrica en una forma adecuada para administración intravenosa.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona un método para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I en un paciente. El método comprende seleccionar un paciente que sea susceptible al desarrollo de diabetes de tipo I, que esté desarrollando diabetes de tipo I o que tenga diabetes de tipo I; y administrar al paciente una o más de una dosis de una construcción polinucleotídica que comprenda una secuencia polinucleotídica que codifique Δ BCL-2.

En otra realización, una o más de una dosis es una pluralidad de dosis. En otra realización, administrar al paciente una o más de una dosis comprende inyectar por vía intramuscular al paciente una o más de una dosis. En otra realización, el método comprende adicionalmente, después de la administración, controlar al paciente para el desarrollo de diabetes de tipo I.

60 Figuras

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención llegarán a entenderse mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y figuras adjuntas en las que:

La Figura 1 son representaciones esquemáticas de tres sustancias de acuerdo con la presente invención; y

la Figura 2 son representaciones esquemáticas de los quince plásmidos que se ensayaron para su eficacia en la prevención, retardo de la aparición de o tratamiento de una enfermedad autoinmune de acuerdo con un método de la presente invención.

5 Descripción

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporcionan sustancias para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I. De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona un método para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I. En una realización preferida, el método que comprende usar una sustancia de acuerdo con la presente invención es una vacuna. Las sustancias y método de la presente invención no usan solamente el suministro de autoantígenos, y no usan moléculas que sean efectores directos del sistema inmune como en los métodos anteriores. En su lugar, la presente invención usa una vacuna para evitar la apoptosis de uno o más de un tipo de célula capaz de suprimir la enfermedad autoinmune. Como este uno o más de un tipo de célula capaz de suprimir la enfermedad autoinmune aún se someterá a la regulación fisiológica e inmune, el riesgo de inducir o potenciar la autoinmunidad se reduce enormemente por el presente método en comparación con algunos métodos de la técnica anterior. Además, como la presente invención no implica administrar sustancias que sean efectores directos del sistema inmune, tales como citoquinas, la presente invención no tiene el riesgo de efectos secundarios asociados con dichos efectores directos del sistema inmune. De forma más ventajosa, puede producirse una vacuna genética que comprenda principalmente ADN plasmídico en grandes cantidades a costes relativamente bajos y que no requiera una “cadena de frío” para el almacenamiento. Por lo tanto, las sustancias y métodos de acuerdo con la presente invención son tanto económicos como prácticos para su uso para prevenir, retardar la aparición o tratar una enfermedad autoinmune. Además, una vacuna genética de acuerdo con la presente invención modifica el material genético de un organismo directamente, que significa que los epítomos nativos se procesarán por el sistema inmune del organismo a diferencia de las vacunas basadas en proteínas. Las sustancias y el método de la presente invención se describirán ahora con detalle.

Como se usa en esta descripción, la expresión “enfermedad autoinmune” comprende enfermedades debidas en parte o totalmente a la destrucción de células normales o tejidos por el propio sistema inmune del organismo, y también comprende la destrucción de células y tejidos que se transplantaron en el organismo para ocupar el lugar de células o tejidos defectuosas o ausentes, tales como transplantes de células de los islotes, o transplantes de órganos parciales o completos, por el propio sistema inmune del organismo.

Como se usa en esta descripción, el término “comprende” y variaciones del mismo, tales como “que comprende” y “comprenden”, no pretenden excluir otros aditivos, componentes, enteros o etapas.

En una realización, la presente invención incluye una sustancia que puede usarse para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I. La sustancia es una construcción de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica, SEC ID N° 3, que codifica una forma truncada de BCL-2 denominada Δ BCL-2 en esta descripción.

Como entenderán los especialistas en la técnica con referencia a esta descripción, aunque se dan secuencias específicas para las secuencias polinucleotídicas descritas en esta descripción, tales como las secuencias polinucleotídicas que codifican Δ BCL-2, la presente invención incluye cualquier otra secuencia que no cause un cambio en la secuencia de aminoácidos traducida, así como cualquier secuencia que cause un cambio en la secuencia de aminoácidos traducida pero donde el cambio no afecte sustancialmente a la función de la secuencia de aminoácidos traducida de modo que la haga inadecuada para los usos contemplados en esta descripción.

Con referencia ahora a la Figura 1, se muestran representaciones esquemáticas de tres sustancias, una de acuerdo con la presente invención. Como puede observarse, cada sustancia comprende una construcción de ADN plasmídico. La sustancia A comprende una construcción plasmídica que comprende un polinucleótido que codifica un autoantígeno para la enfermedad autoinmune, tal como ácido glutámico descarboxilasa secretada que es un autoantígeno para la diabetes de tipo 1, seguido por un polinucleótido, SEC ID N° 1, que codifica BAX. La sustancia B comprende una construcción plasmídica que comprende un polinucleótido, SEC ID N° 2, que codifica E3-GP19k sin un polinucleótido que codifique un autoantígeno para la enfermedad autoinmune. La sustancia C comprende una construcción plasmídica que comprende un polinucleótido, SEC ID N° 3, que codifica una forma truncada de la proteína anti-apoptótica BCL-2 sin un polinucleótido que codifique un autoantígeno para la enfermedad autoinmune. Como se usa en las Figuras, “CMV” representa el elemento promotor de citomegalovirus, “pA” representa un sitio de poliadenilación, e “IRES” representa un sitio de unión a ribosomas interno del virus EMCV, SEC ID N° 4.

Para demostrar las ventajas de la presente invención, se construyeron quince plásmidos y se usaron como vacunas. Cada construcción se clonó en el vector pND2. Con referencia ahora a la Figura 2, se muestran representaciones esquemáticas de los quince plásmidos que se ensayaron para su eficacia en la prevención, retardo de la aparición de o tratamiento de una enfermedad autoinmune. Como puede observarse, cada plásmido estaba bajo el control transcripcional plasmídico del mismo promotor (CMVp) para asegurar la expresión de ambas fases de lectura abierta en cada célula transfectada. Durante la construcción de estos plásmidos que contienen el ADNc que codifica BCL-2, se descubrió que sucedían delecciones de los plásmidos debido al gran tamaño del ADNc. Por lo tanto, se usó una versión truncada de *bcl-2* denominada Δ *bcl-2* para construir los plásmidos. Como se muestra en la Figura 2, los plásmidos comprendían ADNc que codifica GAD citoplásmica, SEC ID N° 5 (plásmido 1); GAD secretada (SGAD), SEC ID N° 6 (plásmido 2); una luciferasa secretada de control, SEC ID N° 7 (plásmido 3); la proteína humana anti-apoptótica

ES 2 275 253 T3

BCL-2 truncada (Δ BCL-2), SEC ID N° 3 (plásmido 4); la proteína anti-apoptótica BAX, SEC ID N° 1 (plásmido 5); E3-GP19k, SEC ID N° 2 (plásmido 6), Δ BCL-2, SEC ID N° 3; en combinación con GAD citoplásmica, SEC ID N° 5, GAD secretada, SEC ID N° 6, y luciferasa secretada, SEC ID N° 7 (plásmidos 7-9, respectivamente), BAX, SEC ID N° 1, en combinación con GAD citoplásmica, SEC ID N° 5, GAD secretada, SEC ID N° 6, y luciferasa secretada, SEC ID N° 7 (plásmidos 10-12, respectivamente); y E3-GP19k, SEC ID N° 2, en combinación con GAD citoplásmica, SEC ID N° 5, GAD secretada, SEC ID N° 6, y luciferasa secretada, SEC ID N° 7 (plásmidos 13-15, respectivamente).

Se generaron todos los plásmidos, se amplificó la fase de lectura abierta usando PCR, y los productos de amplificación se inspeccionaron después de la secuenciación de ADN y se descubrió que estaban sin mutaciones. Cada construcción se usó después para transfectar células COS-7 de simio de forma transitoria para los análisis de inmunotransferencia de los lisados celulares, que confirmaron que estaba codificado un producto génico del tamaño correcto (datos no mostrados).

A continuación, se determinaron los efectos de los 15 plásmidos en ratones diabéticos no obesos (NOD) del siguiente modo. Primero se aisló el ADN plasmídico usando kits Qiagen Endofree (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, US) y se inyectaron por vía intramuscular 300 μ g de cada uno de los 15 ADN plasmídicos a grupos de quince ratones NOD hembra de 4-5 semanas de edad. Se seleccionó la dosis de 300 μ g como la dosis relevante para el entorno clínico humano en base al peso del organismo. La aparición de la diabetes se controló hasta la edad de 35 semanas, usando análisis de glucosa en orina y sangre. Los ratones se consideraron diabéticos después de un ensayo positivo para altos niveles de glucosuria, con niveles de glucosa en sangre mayores de 300 mg/dl en dos días consecutivos.

Los resultados de estos experimentos demostraron lo siguiente. El porcentaje de animales diabéticos a las 35 semanas de edad varió del 73-93% para ratones vacunados con los plásmidos 1-3; del 60-67% para ratones vacunados con los plásmidos 4 ó 7-9; del 47-85% para ratones vacunados con los plásmidos 5 y 10-12; y del 53-73% para ratones vacunados con los plásmidos 6 y 13-15. Los animales de control (los no vacunados) tuvieron una incidencia de diabetes de aproximadamente el 93%. Por lo tanto, la administración de 300 μ g de vector plasmídico solo o de 300 μ g de vector plasmídico que codifica antígenos solos, plásmidos 1-3, no produjo supresión significativa de la diabetes. Los ratones vacunados con los plásmidos 6-9 y 11 mostraron una supresión estadísticamente significativa de la diabetes en comparación con ratones no tratados ($P < 0,05$ para el plásmido 7, y $P < 0,02$ para el plásmido 9). Además, los ratones que recibieron pND2-E3-GP19k, plásmido 6 o pND2-SGAD55-BAX, plásmido 11, mostraron una incidencia significativamente disminuida de la diabetes a las 35 semanas en comparación con ratones que recibieron el plásmido pND2-GAD65, plásmido 1 o pND2-GAD65-BAX, plásmido 10 ($P < 0,04$), y ratones que recibieron pND2-GAD65- Δ BCL2, plásmido 7 o pND2-SGAD55- Δ BCL2, plásmido 8, mostraron diabetes significativamente disminuida en comparación con ratones que recibieron pND2-GAD65, plásmido 1 ($P < 0,05$). La supresión de la diabetes se asoció con inflamación de islotes disminuida (datos no mostrados). Estos resultados se describirán ahora con mayor detalle.

Los ratones que se vacunaron con plásmidos que comprenden Δ bcl-2, plásmidos 4 y 7-9, mostraron un retardo de 4-5 semanas en la aparición de la diabetes independientemente del antígeno co-expresado, y una disminución en la incidencia de la diabetes a las 35 semanas de edad (60-67% en comparación con aproximadamente el 93% para los ratones de control no vacunados) independientemente del antígeno co-expresado. Por lo tanto, la co-expresión del autoantígeno GAD no suprimió el efecto.

Los ratones que se vacunaron con plásmidos que comprende *bax*, plásmido 5 y 10-12, no mostraron supresión de la diabetes, con la excepción de *sgad55-bax*, plásmido 11. Aunque los ratones vacunados con el plásmido 11 comenzaron a desarrollar la diabetes en un momento similar a los otros ratones vacunados con un plásmido que comprende sólo *bax*, plásmido 5, la incidencia de la diabetes en ratones vacunados con el plásmido 11 a la 35 semanas de edad fue sólo del 47% en comparación con una incidencia del 93% para los ratones de control no vacunados ($p < 0,05$).

Los ratones que se vacunaron con plásmidos que comprenden *E3-gp19k*, plásmidos 6 y 13-15 mostraron amplias diferencias en la aparición de la diabetes, dependiendo del antígeno que se co-expresó. Los ratones que se vacunaron con el plásmido que comprende *E3-gp19k* sin autoantígeno, plásmido 6, comenzaron a desarrollar la diabetes con un retardo de 4-5 semanas, y mostraron una diabetes disminuida a las 35 semanas de edad (53% frente al 93% para los ratones de control no vacunados para el control) ($p < 0,05$). Los ratones que se vacunaron con los plásmidos que comprenden *E3-gp19k* sin autoantígeno, plásmidos 13-15, suprimieron el efecto, tanto con respecto al retardo en la aparición de la diabetes como con respecto a la incidencia de animales diabéticos a las 35 semanas.

A continuación, se caracterizaron las respuestas inmunes usando un ensayo ELISpot específico de GAD y un ELISA de isotipos séricos de IgG anti-GAD para determinar si la supresión de la diabetes por la administración de las sustancias de la presente invención estaba asociada con la supresión de la actividad tipo Th1 inflamatoria, y la regulación positiva de la respuesta tipo Th2 anti-inflamatoria.

En ensayo ELISpot se realizó del siguiente modo. Se aislaron esplenocitos de los ratones en el momento de la aparición de la diabetes, o al final del periodo de observación para animales no diabéticos. Después se estimularon las células con proteína GAD recombinante, y se contó la cantidad de células que secretaban IFN-gamma (para la actividad tipo Th1), e IL-4 (para la actividad tipo Th2), siguiendo un protocolo convencional del fabricante. Después se restó la cantidad de células secretoras de citoquinas en ausencia de estimulación con GAD, y se analizaron los resultados.

ES 2 275 253 T3

Para IFN-gamma los datos indican claramente que la supresión de la diabetes por el plásmido 6, que codifica E3-GP19k solo, o por los plásmidos 4 y 7-9, que codifican Δ BCL-2 solo o junto con un antígeno, se asociaron con una supresión de la actividad específica de GAD. Por lo tanto, E3-19k y Δ BCL-2 podrían inducir una respuesta inmune que sería capaz de suprimir la auto-reactividad contra células beta. Sorprendentemente, la combinación SGAD55-BAX no pareció suprimir significativamente la actividad tipo Th1. Además, SGAD55 solo, que no suprimió la diabetes, suprimió la respuesta tipo Th1 específica de GAD.

Con respecto A IL-4, los datos indicaron un aumento en la actividad específica de GAD para ratones que recibieron el plásmido 6 que codifica E3-GP19k solo (supresión de la diabetes), el plásmido 13 que codifica SGAD55 y E3-19k (sin supresión de la diabetes), y el plásmido 8 con SGAD55 y Δ BCL2 (supresión de la diabetes). Por tanto, no siempre la actividad tipo Th2 aumentada estuvo asociada con una actividad tipo Th1 disminuida o supresión de la enfermedad.

El ELISA se realizó del siguiente modo. Se usaron sueros animales para el ELISA de los isotipos IgG2a,b e IgG1 anti-GAD que indican una actividad tipo Th1 y tipo Th2, respectivamente. El ELISA de IgG2a,b anti-GAD indicó que tres de los ADN plasmídicos que codificaban Δ BCL-2, los plásmidos, 4, 8 y 9, mostraban una reducción significativa en la actividad de tipo Th1, en comparación con el plásmido 5 que codifica BAX, pero no con los ratones de control no vacunados. El ELISA de IgG1 anti-GAD indicó que todos los ADN plasmídicos que codificaban BAX, los plásmidos 5 y 10-12, produjeron una actividad de tipo Th2 disminuida.

Estos datos tomados en conjunto indican que, primero, *bax*, un ADNc plasmídico que codifica una proteína pro-apoptótica, puede usarse como adyuvante molecular para vacunas genéticas para prevenir enfermedades autoinmunes, tales como una vacuna que comprende un polinucleótido que codifique una forma secretada de un autoantígeno. Segundo, un ADNc plasmídico que codifique E3-GP19k o que codifique BCL-2 solo truncada podría suprimir la enfermedad autoinmune, aunque un ADNc plasmídico que codifique E3-GP19k o que codifique una BCL-2 truncada combinado con un autoantígeno sería menos eficaz.

Una realización de la presente invención se refiere a un método para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I. El método comprende, primero, seleccionar un paciente que sea susceptible al desarrollo de diabetes de tipo I, que esté desarrollando diabetes de tipo I o que tenga diabetes de tipo I. La selección puede hacerse usando métodos convencionales, como entenderán los especialistas en la técnica con referencia a esta descripción. La selección puede hacerse identificando en el paciente la presencia de autoanticuerpos anti-insulina o anti-GAD o autoanticuerpos tanto anti-insulina como anti-GAD, la presencia de hiperglucemia creciente, la presencia de glucosuria, la presencia de una predisposición genética a la diabetes o más de uno de estos.

A continuación se administra al paciente una o más de una dosis de una construcción plasmídica de acuerdo con la presente invención. Es decir, una construcción plasmídica que comprenda un polinucleótido que codifique una forma truncada de la proteína pro-apoptótica BCL-2 pero sin un polinucleótido que codifique un autoantígeno para la enfermedad autoinmune. En una realización preferida, al organismo se le administran dos construcciones plasmídicas de acuerdo con la presente invención. En una realización particularmente preferida, al organismo se le administran tres construcciones plasmídicas de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferida, la construcción plasmídica se administra en una pluralidad de dosis. En otra realización preferida, la dosis está entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. En otra realización preferida, la dosis está entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg. En otra realización preferida, la dosis es de aproximadamente 0,05 mg/kg. En una realización preferida, una dosis adecuada para un adulto humano está entre aproximadamente 0,5 mg y 5 mg. En una realización preferida, una dosis adecuada para un adulto humano está entre aproximadamente 1 mg y 4 mg. En una realización preferida, una dosis adecuada para un adulto humano está entre aproximadamente 2,5 mg y 3 mg. En otra realización preferida, la dosis se administra semanalmente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 veces. En una realización particularmente preferida, la dosis se administra semanalmente 4 veces. En otra realización particularmente preferida, la dosis se administra sólo una vez.

La administración puede ser por cualquier vía adecuada. En una realización preferida, la vía es intramuscular o intravenosa.

Además, el método puede comprender, después de la administración, el control del paciente para el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

Ejemplo 1

De acuerdo con la presente invención, la aparición de la diabetes en un paciente se retarda o previene, por ejemplo, del siguiente modo. Primero, el paciente se selecciona en base a la presencia de autoanticuerpos anti-insulina y anti-GAD en la circulación. A continuación, se inyecta al paciente por vía intramuscular 0,05 mg/kg de una construcción plasmídica que comprende una secuencia polinucleotídica, SEC ID N° 1, que codifica la proteína pro-apoptótica BAX y que codifica SGAD, SEC ID N° 6, o que comprende una secuencia polinucleotídica, SEC ID N° 2, que codifica la proteína de no viral E3-GP19k, o que comprende una secuencia polinucleotídica, SEC ID N° 3, que codifica Δ BCL-2. La inyección se repite semanalmente durante 3 semanas mientras se controla el nivel de autoanticuerpos anti-insulina

ES 2 275 253 T3

y anti-GAD en circulación. El tratamiento finaliza cuando el nivel de autoanticuerpos anti-insulina y anti-GAD en circulación ha vuelto a la normalidad.

5 Aunque la presente invención se ha analizado con considerable detalle con referencia a ciertas realizaciones preferidas, son posibles otras realizaciones. Por lo tanto, el alcance de las reivindicaciones adjuntas no debe limitarse a la descripción de las realizaciones preferidas contenidas en esta descripción.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Sustancia para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I, comprendiendo la sustancia una construcción polinucleotídica que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica Δ BCL-2.

2. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sustancia se usa cuando existen autoanticuerpos anti-insulina o anti-GAD (GAD = Ácido Glutámico Descarboxilasa) o autoanticuerpos tanto anti-insulina como anti-GAD en un paciente.

10 3. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sustancia se usa cuando existe hiperglucemia creciente en un paciente.

15 4. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sustancia se usa cuando existe la presencia de glucosuria en un paciente.

5. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sustancia se usa cuando existen predisposición genética a la diabetes de tipo I en un paciente.

20 6. Uso de una construcción polinucleotídica que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína adenoviral E3-GP19k para la fabricación de un medicamento para prevenir, retardar la aparición de o tratar la diabetes de tipo I.

25 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el medicamento se usa cuando existen autoanticuerpos anti-insulina o anti-GAD o autoanticuerpos tanto anti-insulina como anti-GAD en un paciente.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el medicamento se usa cuando existe hiperglucemia creciente en un paciente.

30 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el medicamento se usa cuando existe presencia de glucosuria en un paciente.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el medicamento se usa cuando existe una predisposición genética a diabetes de tipo I en un paciente.

35 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el medicamento se fabrica en una forma adecuada para administración intramuscular.

40 12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 donde el medicamento se fabrica en una forma adecuada para administración intravenosa.

FIG.1

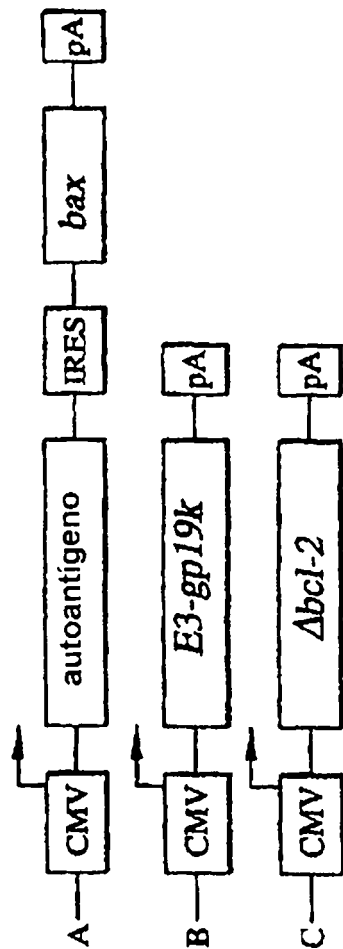
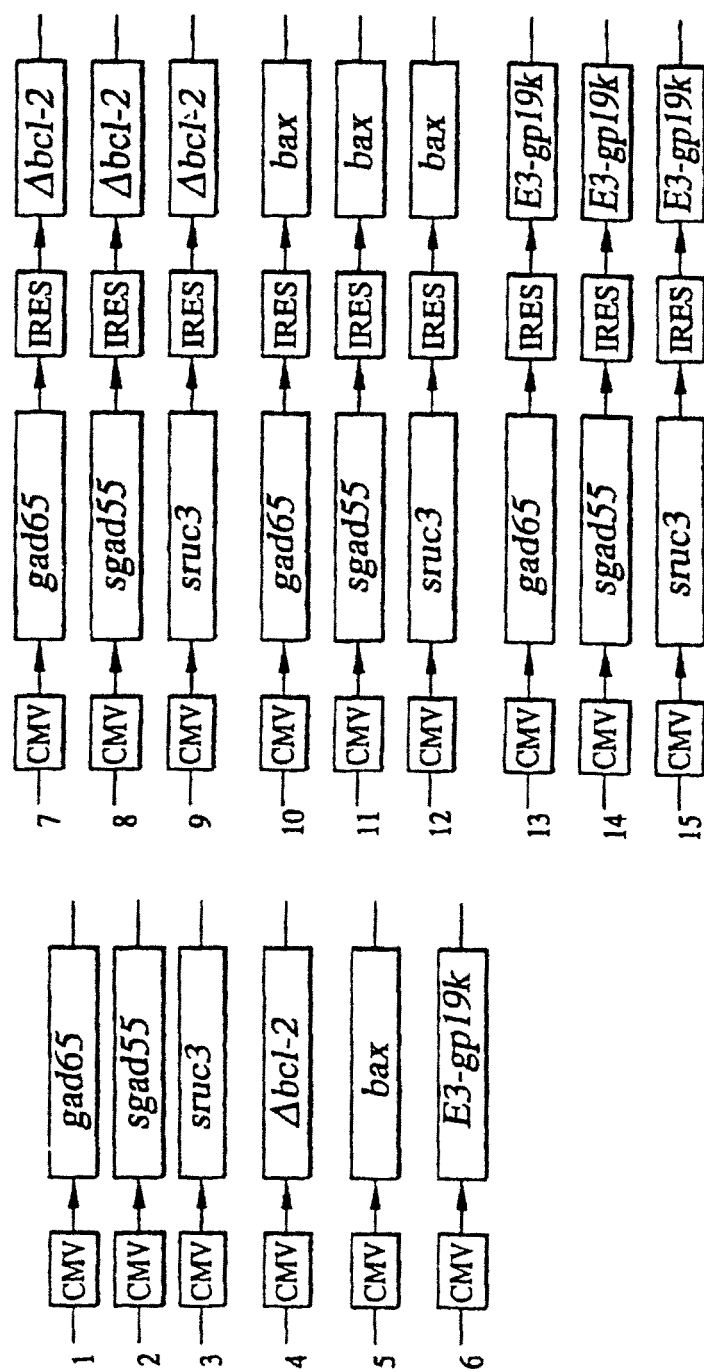


FIG.2



ES 2 275 253 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Loma Linda University
ESCHER, Alan P.
5 Li, Fengchun

<120> Sustancias para Prevenir y Tratar Enfermedades Autoinmunes

10 <130> 14102-1PCT

<140> a ceder
<141> 06-08-2003

15 <150> US 60/401.652
<151> 06-08-2003

20 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.2

25 <210> 1
<211> 579
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 1

35 atggacgggt cgggggagca gccagaggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60
aagacagggg cccttttgc ttaggggttc atccaggatc gacagggcg aatggggggg 120
gaggcaccgc agctggccct ggaccgggtg cctcaggatg cgtccacca gaagctgagc 180
40 gagtgtctca agcgcacgg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240
gcgcgcgtgg acacagactc ccccgagag gtctttttcc gagtggcagc tgacatgttt 300
tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtccgctttt tctactttgc cagcaaactg 360
45 gtgctcaagg ccctgtgcac caagggtgac gaactgatca gaaccatcat gggctggaca 420
ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accaggggtg ttgggacggc 480
50 ctctctctct actttgggac gccacgtgg cagaccgtga ccctctttgt ggcgggagtg 540
ctcaccgcct cgctcaccat ctggaagaag atgggctga 579

55 <210> 2
<211> 492
60 <212> ADN
<213> Adenovirus humano de tipo 2

65

ES 2 275 253 T3

<400> 2

5	atgaggtaca tgatttttagg cttgctcgcc cttgoggcag tctgcagcgc tgccaaaaag	60
	gttgagttta aggaaccagc ttgcaatggt acatttaaata cagaagctaa tgaatgcact	120
	actcttataa aatgcaccac agaacaagaa aagcttatta ttccgcacaa agacaaaatt	180
10	ggcaagtatg ctgtatatgc tatttggcag ccagggtgaca ctaacgacta taatgtcaca	240
	gtcttccaag gtgaaaatcg taaaactttt atgtataaat ttccatttta tgaatgtgc	300
15	gatattacca tgtacatgag caaacagtac aagttgtggc cccacaaaa gtgtttagag	360
	aacactggca ccttttgttc caccgctctg cttattacag cgttgccttt ggtatgtacc	420
20	ttactttatc tcaaatacaa aagcagacgc agttttattg atgaaaagaa aatgccttga	480
	ttttccgctt gc	492

25 <210> 3
 <211> 599
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

35	atggcgacg ctgggagaag tggttacgat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat	60
	tataagctgt cgcagagggg ctacgagtggt gatgctaccg cggctgccgc ggggcoctgcg	120
40	ctcagcccgg tgccacctgt ggtccacctg accctccgcc aggcggcgca cgacttctcc	180
	cgcgctacc gccgcgactt cgcggagatg tccagccagc tgcacctgac gcccttcacc	240
45	gcgcggggat gctttgccac ggtgggtggag gagctcttca gggacggggg gaactggggg	300
	aggattgtgg ccttctttga gttcgggtgg gtcattgtgt tggagagcgt caaccgggag	360
	atgtcgcccc tgggtggacaa catcgccctg tggatgactg agtacctgaa ccggcacctg	420
50	cacacctgga tccaggataa cggaggtctg gatgcctttg tggaaactgta cggccccagc	480
55	atgcggcctc tgtttgattt ctcttggtct tctctgaaga ctctgctcag ttgggcctctg	540
	gtgggagctt gcatcaccct gggtgccctat ctgggcacaa agtgaagtca acatgcctg	599

60 <210> 4
 <211> 619
 <212> ADN
 65 <213> Virus de la encefalomiocarditis

ES 2 275 253 T3

<400> 4

5	tctagataat acgactcact atagggcgaa ttccccctct cctcccccc cccctaacgt	60
	tactggccga agccgcttgg aataaggccg gtgtgcgttt gtctatatgt tattttccao	120
	catattgccg tcttttggca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct tcttgaagag	180
10	cattcctagg ggtctttccc ctctcgccaa aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa	240
	ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag acaaacaacg tctgtagcga ccctttgcag	300
15	gcagcggaac cccccacctg gogacaggtg' cctctgcggc caaaagccag gtgtataaga	360
	tacacctgca aaggcggcac aacccagtg ccacgttgtg agttggaata gttgtggaaa	420
20	gagtcaaats gctctctca agogtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtag	480
	cccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt gtttagtcga	540
25	ggttaaaaaa cgtctaggcc ccccaaccac ggggacgtgg ttttctttg aaaaacacga	600
	ttattatatt gcctctaga	619

30 <210> 5

<211> 1868

<212> ADN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

40	gagctccacc gcggtggcgg ccgctctaga ccaccatggc atctccgggc tctggctttt	60
	ggtcttttcgg gtcggaagat ggctctgggg attccgagaa tcccggcaca gcgcgagcct	120
45	ggtgccaaagt ggctcagaag ttacggggcg gcatcgaaa caaactgtgc gccctgtctt	180
	acggagacgc cgagaagccg gcggagagcg gcgggagcca acccccgcgg gccgcccgc	240

50

55

60

65

ES 2 275 253 T3

	ggaaggcgcg ctgcgcctgc gaccagaagc cctgcagctg ctccaaagtg gatgtcaact	300
	acgcggtttct ccatgcaaca gacctgctgc cggcggtgtga tggagaaagg cccacttttg	360
5	cgtttctgca agatgttatg aacattttac ttcagtatgt ggtgaaaagt ttcgatagat	420
	caaccaaagt gattgatttc cattatccta atgagcttct ccaagaatat aattgggaat	480
10	tggcagacca accacaaaat ttggaggaaa ttttgatgca ttgccaaaca actctaaaat	540
	atgcaattaa aacagggcat cctagatact tcaatcaact ttctactggt ttggatatgg	600
	ttggattagc agcagactgg ctgacatcaa cagcaaatat taacatgttc acctatgaaa	660
15	ttgctccagt atttgtgctt ttggaatatg tcacactaaa gaaaatgaga gaaatcattg	720
	gctggccagg gggctctggc gatgggatat tttctcccg tggcgccata tctaacatgt	780
20	atgccatgat gatcgacgc ttttaagatgt tcccagaagt caaggagaaa ggaatggctg	840
	ctcttcccag gctcattgcc ttcacgtctg aacatagtc ttttctctc aagaaggag	900
	ctgcagcctt agggattgga agagacagcg tgattctgat taaatgtgat gagagaggga	960
25	aaatgattcc atctgatctt gaaagaagga ttcttgaagc caaacagaaa gggtttgttc	1020
	ctttctctgt gagtgcaca gctggaacca ccgtgtacgg agcatttgac cccctcttag	1080
30	ctgtogctga catttgcaaa agtataaga tctggatgca tgtggatgca gcttggggtg	1140
	ggggattact gatgtcccg aaacacaagt ggaaactgag tggcgaggag agggccaact	1200
35	ctgtgacgtg gaatccacac aagatgatgg gagtccctt gcagtggctt gctctctgg	1260
	ttagagaaga gggattgatg cagaattgca accaaatgca tgccctctac ctctttcagc	1320
	aagataaaca ttatgacctg tctatgaca ctggagacaa ggccttacag tgcggacgcc	1380
40	acgttgatgt ttttaaaacta tggctgatgt ggagggcaaa ggggactacc gggtttgaag	1440
	cgcattgtga taaatgtttg gagttggcag agtatattata caacatcata aaaaaccgag	1500
45	aaggatatga gatggtgttt gatgggaagc ctgaggacac aaatgtctgc ttctggtaca	1560
	ttcttccaag cttgcgtact ctggaagaca atgaagagag aatgagtcgc ctctcgaagg	1620
	tggctccagt gattaaagcc agaatgatgg agtatggaac cacaatggtc agctaccaac	1680
50	cottgggaga caaggtcaat ttcttccgca tggtcattct aaaccagcg gcaactcacc	1740
	aagacattga ctctctgatt gaagaatag aacgcottgg acaagattta taataacctt	1800
55	gctcaccaag ctgttccact tctctaggtg gcgacctga gggcgctc gagggggggc	1860
	ccggtacc	1868

<210> 6

<211> 1638

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> forma secretada de GAD humana

ES 2 275 253 T3

<400> 6

	atgtacagga tgcaactcct gtcttgcaatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt	60
5	gcacctactt acgcgtttct ccatgcaaca gacctgctgc cggcgtgtga tggagaaagg	120
	cccacttttg cgtttctgca agatgttatg aacattttac ttcagtatgt ggtgaaaagt	180
10	ttcgatagat caaccaaagt gattgatttc cattatccta atgagcttct ccaagaatat	240
	aattgggaat tggcagacca accacaaaat ttggaggaaa ttttgatgca ttgccaaaca	300
15	actctaaaat atgcaattaa aacagggcat cctagatact tcaatcaact ttctactggg	360
	ttggatatgg ttggattagc agcagactgg ctgacatcaa cagcaaatac taacatgttc	420
20	acctatgaaa ttgctccagt atttgtgctt ttggaatatg tcacactaaa gaaaatgaga	480
	gaaatcattg gctggccagg gggctctggc gatgggatat tttctcccg	540
	tctaacatgt atgccatgat gatcgcacgc ttttaagatgt tcccagaagt caaggagaaa	600
25	ggaatggctg ctcttccag gctcattgcc ttcaagcttg aacatagtca tttttctctc	660
	aagaagggag ctgcagcctt agggattgga agagacagcg tgattctgat taaatgtgat	720
30	gagagagggg aaatgattcc atctgatctt gaaagaagga ttcttgaagc caaacagaaa	780
	gggtttgttc ctttctctgt gagtgccaca gctggaacca ccgtgtacgg agcatttgac	840
35	cccctcttag ctgtcgtga catttgcaaa aagtataaga tctggatgca tgtggatgca	900
	gcttggggtg ggggattact gatgtccga aaacacaagt ggaaactgag tggcgtggag	960
40	agggccaact ctgtgacgtg gaatccacac aagatgatgg gagtccctt gcagtggctc	1020
	gctctcctgg ttagagaaga gggattgatg cagaattgca accaaatgca tgcctctac	1080
45	ctctttcagc aagataaaca ttatgacctg tcctatgaca ctggagacaa ggccttacag	1140
	tgcggacgcc acgttgatgt ttttaacta tggctgatgt ggagggcaaa ggggactacc	1200
	gggtttgaag cgcattgtga taaatgtttg gagttggcag agtatttata caacatcata	1260
50	aaaaaccgag aaggatatga gatgggtgtt gatgggaagc ctgaggacac aaatgtctgc	1320
	ttctggatga ttctccaag cttgcgtact ctggaagaca atgaagagag aatgagtcgc	1380
55	ctctogaagg tggctccagt gattaaagcc agaattgatg agtatggaac cacaatggc	1440
	agctaccaac ccttgggaga caaggctaat ttcttccgca tggcatctc aaaccagcg	1500
60	gcaactcacc aagacattga cttctgatt gaagaaatag aacgccttgg acaagattta	1560
	taataacctt gctaccaag ctgttccact totctaggta gcgacctga gggccgctc	1620
65	gagggggggc ccggtacc	1638

<210> 7

ES 2 275 253 T3

<211> 1271

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> forma secretada de la luciferasa de Renilla

10

<400> 7

```

15      atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaancagt      60
      gcacctactg aattcagctt aaagatgact tcgaaagttt atgatccaga acaaaggaaa      120
      cggatgataa ctggtcgcga gtgggtgggcc agatgtaaac aaatgaatgt tcttgattca      180
20      tttatttaatt attatgattc agaaaaacat gcagaaaatg ctgttatttt ttacatgggt      240

      aacgcggcct cttcttattt atggcgacat gttgtgccac atattgagcc agtagcgcgg      300
25      tgtattatac cagatcttat tggtatgggc aaatcaggca aatctggtaa tggttcttat      360
      aggttacttg atcattacaa atatcttact gcatggtttg aacttcttaa ttaccaaaag      420
30      aagatcattt ttgtcggcca tgattggggg gctgcttttg catttcatta tagctatgag      480
      catcaagata agatcaaacg aatagttcac gctgaaagtg tagtagatgt gattgaatca      540
35      tgggatgaat ggcctgatat tgaagaagat attgogttga tcaaactctga agaaggagaa      600
      aaaatggttt tggagaataa cttcttcgtg gaaaccatgt tgccatcaaa aatcatgaga      660
40      aagttagaac cagaagaatt tgcagcatat cttgaaccat tcaaagagaa aggtgaagtt      720
      cgtcgtccaa cattatcatg gcctcgtgaa atcccgttag taaaaggtag taaacctgac      780
      gttgtacaaa ttgttaggaa ttataatgct tatctacgtg caagtgatga ttaccacaaa      840
45      atgtttattg aatcggatcc aggattcttt tccaatgcta ttgttgaagg cgccaagaag      900
      tttcctaata ctgaatttgt caaagtaaaa ggtcttcatt ttctgcaaga agatgcacct      960
50      gatgaaatgg gaaaatatat caaatcgttc gttgagcgag ttctcaaaaa tgaacaataa      1020
      ttactttggg tttttattta catttttccc gggtttaata atataaatgt cattttcaac      1080
55      aattttattt taactgaata tttcacaggg aacattcata tatgttgatt aatttagctc      1140
      gaactttact ctgtcatatc attttggaa attacctctt tcaatgaaac ttataaaca      1200
      gtgggtcaat taattaatat atattataat tacatttggt atgtaataaa ctoggtttta      1260
60      ttataaaaaa a
                                         1271

```

65