



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 701**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09000207 .2**
96 Fecha de presentación : **05.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2058393**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2009**

54 Título: **Composiciones y métodos para prevenir y tratar trastornos inflamatorios de mediación inmune.**

30 Prioridad: **11.05.2005 US 680249 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.12.2010

73 Titular/es: **Loma Linda University**
Loma Linda Campus
Loma Linda, California 92350, US

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

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

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para prevenir y tratar trastornos inflamatorios de mediación inmune.

5 Referencia cruzada con solicitud relacionada

La presente Solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/680.249, titulada "Substances and Methods for Preventing and Treating Autoimmune Diseases", presentada el 11 de mayo de 2005.

10 Antecedentes

Los trastornos inflamatorios de mediación inmune (IMID) son un grupo de enfermedades que implican una respuesta inmune que es inapropiada o excesiva, y está causada o acompañada por desregulación del medio de citoquinas normal del organismo. Los IMID causan lesión inflamatoria aguda o crónica en uno o más de un sistema orgánico. Los IMID incluyen alergias, asma, el rechazo de trasplantes de órganos sólidos, y enfermedades autoinmunes, tales como hepatitis autoinmune, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, lupus sistémico y vitíligo.

Como ejemplo, un IMID, diabetes de tipo 1 o diabetes mellitus dependiente de insulina, es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en niños y adolescentes, y tiene una prevalencia e incidencia que aumenta de forma constante por todo el mundo. En la mayoría de los casos, la aparición de diabetes de tipo 1 comienza con la presentación por parte de células presentadoras de antígenos (APC) de autoantígenos sintetizados por células β pancreáticas. Esta presentación da como resultado la destrucción del sistema inmune de las células beta pancreáticas en su mayor parte por los linfocitos T ayudantes 1 (Th1) T citotóxicos. La destrucción específica de células β da como resultado la pérdida de la producción de insulina y causa la alta morbilidad y mortalidad asociadas a la enfermedad.

Aunque la inyección diaria de insulina puede mejorar la diabetes de tipo 1, no proporciona una sustitución precisa de niveles fisiológicos de la hormona. Un enfoque seguro, potente y práctico para detener la autoinmunidad podría usarse para revertir la enfermedad permitiendo que las células β se regeneren o recuperen la función, y también podría usarse para prevenir el rechazo de islotes transplantados usados como tratamiento para la enfermedad.

Muchos enfoques profilácticos y terapéuticos para diabetes de tipo 1 intentan prevenir la destrucción de células beta induciendo al sistema inmune para que elimine, inactive o suprima linfocitos auto-reactivos patógenos, tal como administrando vacunas que suministran autoantígeno exclusivamente, o administrando sustancias que son efectores directos del sistema inmune, tales como citoquinas. Las vacunas basadas en ADN disponibles actualmente, sin embargo, no son completamente eficaces para prevenir y aún menos eficaces para tratar la enfermedad, y el uso de algunas de estas vacunas está asociado con la inducción o potenciación de autoinmunidad en lugar de la prevención de la enfermedad. Adicionalmente, el uso de citoquinas está asociado con una morbilidad significativa debido a su supresión general del sistema inmune.

LI A. F. *et al*: "Co-delivery of pro-apoptotic BAX with a DNA vaccine recruits dendritic cells and promotes efficacy of autoimmune diabetes prevention in mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 22, n° 13-14, 16 de abril de 2004 (16-04-2004), páginas 1751-1763, XP004500430 ISSN: 0264-410X, que se considera la técnica anterior más relevante, muestra que el plásmido uno no metilado tiene eficacia terapéutica.

Por lo tanto, existe una necesidad de un nuevo método para prevenir, retardar la aparición de, o tratar trastornos inflamatorios de mediación inmune usando sustancias o composiciones que no estén asociadas con estas desventajas. Además, existe una necesidad de un nuevo método para prevenir, retardar la aparición de, o tratar trastornos inflamatorios de mediación inmune que no estén asociados con estas desventajas.

Sumario

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes, comprendiendo la composición:

- a) un primer plásmido que comprende un polinucleótido que codifica ácido glutámico descarboxilasa secretada 55 teniendo dicho polinucleótido la SEC ID N° 1, bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica ácido glutámico descarboxilasa secretada 55; y
- b) un segundo plásmido que comprende un polinucleótido que codifica BAX, teniendo dicho polinucleótido la SEC ID N° 2, bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica BAX;

donde la diabetes es causada por una respuesta inmune que es inapropiada o excesiva o tanto inapropiada como excesiva para ácido glutámico descarboxilasa secretada 55; y donde el primer plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y al menos algunos de la pluralidad de motivos CpG están metilados.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona el uso de la composición de acuerdo con la presente invención, para prevenir, retardar la aparición de o tratar uno o más de un trastorno inflamatorio de mediación inmune en un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune.

Figuras

Éstas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor en relación con la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 es una representación esquemática de pSG5, Plásmido 1, donde el Plásmido 2 es la forma metilada del Plásmido 1;

La figura 2 es una representación esquemática de pND2, Plásmido 3;

La figura 3 es una representación esquemática de pSG5-SGAD55, Plásmido 4, donde el Plásmido 5 es la forma metilada del Plásmido 4;

La figura 4 es una representación esquemática de pND2-hBAX, Plásmido 6;

La figura 5 es un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 1, el grupo de control;

La figura 6 es un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 2 tratados con 40 μ g de Plásmido 1 y 10 μ g de Plásmido 3 (el grupo de control del vector);

La figura 7 es un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 3 tratados con 40 μ g de Plásmido 2 y 10 μ g de Plásmido 3;

La figura 8 es un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 4 tratados con 40 μ g de Plásmido 5 y 10 μ g de Plásmido 3;

La figura 9 es un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 5 tratados con 40 μ g de Plásmido 2 y 10 μ g de Plásmido 6;

La figura 10 es un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 6 tratados con 40 μ g de Plásmido 4 y 10 μ g de Plásmido 6;

La figura 11 es un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 7 tratados con 40 μ g de Plásmido 5 y 10 μ g de Plásmido 6 (una composición de acuerdo con la presente invención); y

La figura 12 es una representación esquemática de una sustancia de acuerdo con la presente invención para prevenir, retardar la aparición de o tratar uno o más de un trastorno inflamatorio de mediación inmune en un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune.

Descripción

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona una composición para prevenir, retardar la aparición de o tratar uno o más de un trastorno inflamatorio de mediación inmune en un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune. De acuerdo con un ejemplo, se proporciona un método para prevenir, retardar la aparición de o tratar un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune. En un ejemplo, el método comprende administrar al organismo una sustancia o una composición de acuerdo con la presente invención.

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

Como se usa en esta descripción, el término “autoantígeno” comprende un antígeno endógeno que estimula la producción de autoanticuerpos, como en una reacción autoinmune, así como parte de dichos antígenos endógenos, o antígenos endógenos modificados que desencadenan la misma respuesta que el antígeno endógeno completo, como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción. Por ejemplo, en el contexto de esta descripción, ácido glutámico descarboxilasa secretada 55 y BAX humanizada son ambas autoantígenos.

Como se usa en esta descripción, la expresión “antígeno donador” comprende un antígeno de un aloinjerto que se transplantó al organismo para tomar el lugar de células o tejidos defectuosos o ausentes, tales como por ejemplo trasplantes de células de islotes, y trasplantes de órganos parciales o completos incluyendo corazones, pulmones, riñones e hígados transplantados, y que estimula la producción de anticuerpos que producen una reacción inmune, así como parte de dichos antígenos donadores, o antígenos donadores modificados que desencadenan la misma respuesta que el antígeno donador completo, como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción.

Como se usa en esta descripción, la expresión “trastornos inflamatorios de mediación inmune” comprende tanto enfermedades debidas en parte o en total a la destrucción de células o tejidos normales por el sistema inmune del organismo, y también comprende la destrucción por el sistema inmune del organismo de células o tejidos (aloinjertos) que fueron transplantados al organismo para tomar el lugar de células o tejidos defectuosos o ausentes, tales como por ejemplo trasplantes de células de islotes, y trasplantes de órganos parciales o completos incluyendo corazones, pulmones, riñones e hígados transplantados.

Como se usan en esta descripción, los términos “hBAX” y “BAX” son intercambiables.

Un motivo CpG es una región polinucleotídica caracterizada por restos citosina en la secuencia CG que estimula el sistema inmune en mamíferos para que inicie una secuencia de reacciones que conduce a una reacción inmune e inflamación.

Como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción, cuando se hace referencia a una proteína codificada por una secuencia de polinucleótidos, la proteína incluye “sustituciones conservativas” en las que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la materia de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permaneciera sustancialmente sin cambios. Una sustitución conservativa se produce cuando un resto de aminoácido se sustituye por otro que tiene una cadena lateral similar. Los restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se conocen en la técnica e incluyen familias con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina (Lys/K), arginina (Arg/R), histidina (His/H)), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico (Asp/Device 400), a continuación ácido glutámico (Glu/E)), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina (Gly/G), asparagina (Asn/N), glutamina (Gln/Q), serina (Ser/S), treonina (Thr/T), tirosina (Tyr/Y), cisteína (Cys/C)), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina (Ala/A), valina (Val/V), leucina (Leu/L), isoleucina (Ile/I), prolina (Pro/P), fenilalanina (Phe/F), metionina (Met/M), triptófano (Trp/W)), cadenas laterales β -ramificadas (por ejemplo, treonina (Thr/T), valina (Val/V), isoleucina (Ile/I)) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina (Tyr/Y), fenilalanina (Phe/F), triptófano (Trp/W) e histidina (His/H)).

Ventajosamente, las composiciones de la presente invención se basan en polinucleótidos y pueden producirse en grandes cantidades a un coste relativamente bajo y no requieren una “cadena de frío” para su almacenamiento. Ventajosamente, el método usa una sustancia o una composición para inducir apoptosis de uno o más de un tipo de célula que, a su vez, induce células T reguladoras inmunosupresoras, en lugar de efectores directos del sistema inmune tales como citoquinas. Por lo tanto, el presente método está asociado con un menor riesgo de inducción o potenciación de autoinmunidad en comparación con algunos métodos de la técnica anterior, dado que estos uno o más de un tipo de células capaces de suprimir el trastorno inflamatorio de mediación inmune siguen estando sometidas a regulación fisiológica e inmune. Más ventajosamente, el presente método comprende administrar al organismo una sustancia o composición que suministra material genético al organismo, modificando, de este modo, directamente el material genético del organismo y permitiendo que los epítomos nativos sean procesados por el sistema inmune del organismo, a diferencia de métodos que comprenden administrar al organismo una sustancia o composición a base de proteínas. Por lo tanto, las composiciones de acuerdo con la presente invención son económicas y prácticas para su uso para prevenir, retardar la aparición de o tratar un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune. Las composiciones de la presente invención se describirán a continuación con detalle.

De acuerdo con un ejemplo, se proporciona una sustancia para prevenir, retardar la aparición de o tratar uno o más de un trastorno inflamatorio de mediación inmune en un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune, donde el trastorno inflamatorio de mediación inmune está causado al menos en parte por una respuesta inmune del organismo a un autoantígeno, o a un antígeno donador en el caso de trasplante de aloinjerto. La sustancia comprende un plásmido que comprende un polinucleótido que codifica un autoantígeno o un antígeno donador bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador, y comprende además un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica, donde el plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y donde al menos algunos de la pluralidad de motivos CpG están metilados, donde el trastorno inflamatorio de mediación inmune es causado por una respuesta inmune que es inapropiada o excesiva o tanto inapropiada como excesiva para el autoantígeno o el antígeno donador. En una realización preferida, el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador, y el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica son un único promotor. En una realización preferida, el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador, o el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica una proteína

pro-apoptótica, o tanto el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador, como el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica conservan su función promotora después de la metilación. En otra realización, el plásmido comprende una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para permitir la traducción del polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador, y el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica a partir del mismo transcrito.

En una realización, la presente invención es una composición que comprende un primer plásmido y un segundo plásmido. El primer plásmido comprende un polinucleótido que codifica un autoantígeno o un antígeno donador bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador. El segundo plásmido comprende un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica. El primer plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y al menos algunos de la pluralidad de motivos CpG están metilados. El trastorno inflamatorio de mediación inmune está causado por una respuesta inmune que es inapropiada o excesiva o tanto inapropiada como excesiva para el autoantígeno o el antígeno donador. En una realización preferida, el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador conserva su función promotora después de la metilación. En otra realización, el segundo plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y al menos algunos de la pluralidad de motivos CpG están metilados. En una realización preferida, el promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica conserva su función promotora después de la metilación. En una realización, la composición comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una proporción de entre 1/1000 y 1000/1. En otra realización, la composición comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una proporción de entre 1/100 y 100/1. En otra realización, la composición comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una proporción de entre 1/10 y 10/1.

En una realización de la presente invención, el organismo es un mamífero. En otra realización, el organismo es un ser humano. En una realización, el trastorno inflamatorio de mediación inmune se selecciona entre el grupo constituido por el rechazo de trasplantes de órganos sólidos, hepatitis autoinmune, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, lupus sistémico, diabetes de tipo I y vitiligo. En otra realización, el polinucleótido 1) codifica el autoantígeno o el antígeno donador, o 2) codifica la proteína pro-apoptótica, o 3) codifica el autoantígeno o el antígeno donador y adicionalmente codifica la proteína pro-apoptótica, se seleccionan entre el grupo constituido por ADN y ARN. En otra realización, el autoantígeno se selecciona entre el grupo constituido por anhidrasa carbónica II, colágeno, CYP2D6 (citocromo P450, familia 2, subfamilia Device 400, polipéptido 6), ácido glutámico descarboxilasa, ácido glutámico descarboxilasa secretada 55, SEC ID N° 1, insulina, proteína básica de mielina y SOX-10 (secuencia SRY que contiene el gen 10). En otra realización, la proteína pro-apoptótica se selecciona entre el grupo constituido por BAX, SEC ID N° 2, una caspasa modificada, Receptor del Factor de Necrosis Tumoral, Receptor de Muerte 3 (DR3), Receptor de Muerte 4 (DR4), Receptor de Muerte 5 (DR5) y un receptor FAS. En una realización preferida, la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma es un sitio interno de unión al ribosoma del virus EMCV, SEC ID N° 3.

De acuerdo con otro ejemplo, se proporciona un método para prevenir, retardar la aparición de o tratar un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune. En una realización, el método comprende administrar al organismo una composición de acuerdo con la presente invención.

En una realización, el método comprende, en primer lugar, seleccionar un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune. La selección puede realizarse usando métodos convencionales como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción. Por ejemplo, si el trastorno inflamatorio de mediación inmune es esclerosis múltiple, la selección puede realizarse identificando en el paciente la presencia de lesiones de desmielinización en el sistema nervioso central en diferentes momentos usando escáneres TAC o formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). Análogamente, si el trastorno inflamatorio de mediación inmune es diabetes, la selección puede realizarse identificando en el paciente la presencia de auto-anticuerpos anti-insulina o anti-GAD o ambos auto-anticuerpos anti-insulina y/o anti-GAD, la presencia de un aumento de hiperglucemia, la presencia de glucosuria, la presencia de una predisposición genética a la diabetes o más de una de éstas.

El método comprende administrar al organismo una o más de una dosis de una composición de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, la sustancia o composición se administra en una pluralidad de dosis. En otra realización preferida, la dosis es de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del organismo y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del organismo. En otra realización preferida, la dosis es de entre aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal del organismo y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del organismo. En otra realización preferida, la dosis es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal del organismo y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del organismo. En otra realización preferida, la dosis es de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal del organismo. En una realización preferida, el organismo es un ser humano y la dosis es de entre aproximadamente 0,5 mg y 5 mg. En otra realización preferida, el organismo es un ser humano y la dosis es de entre aproximadamente 1 mg y 4 mg. En otra realización preferida, el organismo es un ser humano y la dosis es de entre aproximadamente 2,5 mg y 3 mg. En otra realización preferida, la dosis se administra semanalmente entre 2 veces y aproximadamente 100 veces. En otra realización preferida, la dosis se administra semanalmente entre 2 veces y aproximadamente 20 veces. En otra realización preferida, la dosis se administra semanalmente entre 2 veces y apro-

ximadamente 10 veces. En otra realización preferida, la dosis se administra semanalmente 4 veces. En otra realización preferida, la dosis se administra solamente una vez.

La administración de la una o más de una dosis de una sustancia o una composición al organismo puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción. En una realización preferida, la administración al organismo de una o más de una dosis de una sustancia o una composición se realiza mediante una vía seleccionada entre el grupo constituido por epidérmica, intradérmica, intramuscular, intranasal, intravenosa y oral.

Cuando el método comprende administrar una composición de la presente invención, el primer plásmido y el segundo plásmido pueden administrarse secuencial o simultáneamente, como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción.

En una realización, el método comprende además, después de la administración, supervisar el organismo para observar el desarrollo o avance del trastorno inflamatorio de mediación inmune. En una realización, supervisar el organismo comprende someter a ensayos al organismo en busca de niveles de anticuerpos para el autoantígeno o el antígeno donador, donde reducir los niveles de anticuerpos significa prevenir con éxito el trastorno inflamatorio de mediación inmune, retardar la aparición del trastorno inflamatorio de mediación inmune o tratar al organismo para el trastorno inflamatorio de mediación inmune. En otra realización, donde el trastorno inflamatorio de mediación inmune es artritis reumatoide, supervisar el organismo comprende someter a ensayos al organismo para fatiga, falta de apetito, fiebre de baja graduación, dolores musculares y de las articulaciones, y rigidez. En otra realización, donde el trastorno inflamatorio de mediación inmune es diabetes de tipo I, supervisar el organismo comprende someter a ensayos al organismo para los niveles de glucosa en sangre, donde reducir los niveles de glucosa en sangre significa prevenir con éxito el trastorno inflamatorio de mediación inmune, retardar la aparición del trastorno inflamatorio de mediación inmune o tratar al organismo para enfermedad autoinmune. En una realización, donde el trastorno inflamatorio de mediación inmune es diabetes de tipo I, supervisar el organismo comprende someter a ensayos al organismo para niveles de glucosuria, donde reducir los niveles de glucosuria significa prevenir con éxito el trastorno inflamatorio de mediación inmune, retardar la aparición del trastorno inflamatorio de mediación inmune o tratar al organismo para enfermedad autoinmune.

Ejemplo I

De acuerdo con la presente invención, la aparición de diabetes en un mamífero, se previno, se retardó o una diabetes que ya existía anteriormente se trató de la siguiente manera. Los mamíferos usados en este ejemplo, ratones diabéticos no obesos (NOD) hembra, es el modelo animal usado más a menudo como sustituto para ensayar enfoques tanto para la supresión de diabetes de tipo 1 como para la supresión de otras enfermedades autoinmunes en seres humanos. Los enfoques exitosos en este modelo animal generalmente son predictivos de éxito en seres humanos.

Para comparar la eficacia de una composición para prevenir, retardar la aparición de o tratar uno o más de un trastorno inflamatorio de mediación inmune de acuerdo con la presente invención en un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune, se prepararon seis plásmidos. Remitiéndonos ahora a de la figura 1 a la figura 4, se muestran, respectivamente, una representación esquemática de pSG5, el Plásmido 1, donde el Plásmido 2 es la forma metilada del Plásmido 1 (figura 1); una representación esquemática de pND2, Plásmido 3 (figura 2); una representación esquemática de pSG5-SGAD55, Plásmido 4, donde el Plásmido 5 es la forma metilada del Plásmido 4 (figura 3); y una representación esquemática de pND2-hBAX, Plásmido 6 (figura 4).

El Plásmido 1 se adquirió de Stratagene (San Diego, CA, US). Los restantes plásmidos se produjeron usando técnicas convencionales. pSG5, Plásmido 1, y pSG-SGAD55, Plásmido 4, se metilaron para producir pSG5 metilado, Plásmido 2, y pSG5-SGAD55 metilado, Plásmido 5, mediante amplificación en una cepa de *E. coli* portadora de un plásmido que codifica la metilasa SssI (New England Biolabs, Beverly, MA, US). SssI metila el motivo dinucleotídico CpG en ADN de una manera correspondiente a metilasas de mamífero añadiendo covalentemente un único grupo metilo al motivo dinucleotídico CpG. La metilación con éxito se confirmó digiriendo el ADN plasmídico aislado con la enzima de restricción HpaII que digiere el ADN no metilado, pero no el metilado, donde la resistencia a la digestión por HpaII indica metilación con éxito.

Remitiéndonos a de la figura 1 a figuras 4, las abreviaturas mostradas son convencionales, como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción, incluyendo: AMP (gen de resistencia a ampicilina para selección en *E. coli*); BGH pA (secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina); origen ColE1 (origen de replicación en *E. coli*); origen f1 (origen de replicación para el que el fago filamentosos f1 genera ADN de cadena sencilla); hBAX (ADNc de bax humana), SEC ID N° 2; promotor de HCMV (promotor del citomegalovirus); intrón de HCMV (intrón de citomegalovirus); MCS (sitio de clonación múltiple); origen pUC (origen de replicación para *E. coli* a partir del plásmido pUC); sgad55 (construcción de ADNc de GAD secretada), SEC ID N° 1; promotor de SV40 (promotor del virus de simio 40); SV40 pA (secuencia de poliadenilación del virus de simio 40); y T7 (promotor T7).

Siete grupos de ratones NOD hembra (10-12 ratones/grupo) se supervisaron en busca de diabetes (definida como glucosa en sangre en ayunas > 140 mg/dl) desde la edad de 10 semanas. Un grupo se dejó sin tratamiento como control. Los otros 6 grupos recibieron cuatro inyecciones intradérmicas cutáneas ventrales, de 50 µg de plásmido total

en el momento de la aparición de diabetes y después una inyección adicional cada semana durante las siguientes tres semanas. Los ratones se supervisaron y aquellos ratones que no respondían, o que respondían pero recaían, recibieron una segunda serie de cuatro inyecciones de 50 μ g de plásmido total, una inyección a la semana cuando la glucosa en sangre en ayunas era > 140 mg/dl. A los 7 grupos de ratones se les administraron plásmidos de la siguiente manera:

Grupo 1: sin administración (grupo de control)

Grupo 2: 40 μ g de Plásmido 1 y 10 μ g de Plásmido 3 (el grupo de control del vector)

Grupo 3: 40 μ g de Plásmido 2 y 10 μ g de Plásmido 3

Grupo 4: 40 μ g de Plásmido 5 y 10 μ g de Plásmido 3

Grupo 5: 40 μ g de Plásmido 2 y 10 μ g de Plásmido 6

Grupo 6: 40 μ g de Plásmido 4 y 10 μ g de Plásmido 6

Grupo 7: 40 μ g de Plásmido 5 y 10 μ g de Plásmido 6 (una composición de acuerdo con la presente invención)

Remitiéndonos ahora a de la figura 5 a la figura 11, se muestran, respectivamente, un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 1, el grupo de control (figura 5); un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 2 tratados con 40 μ g de Plásmido 1 y 10 μ g de Plásmido 3 (el grupo de control del vector) (figura 6); un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 3 tratados con 40 μ g de Plásmido 2 y 10 μ g de Plásmido 3 (figura 7); un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 4 tratados con 40 μ g de Plásmido 5 y 10 μ g de Plásmido 3 (figura 8); un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 5 tratados con 40 μ g de Plásmido 2 y 10 μ g de Plásmido 6 (figura 9); un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 6 tratados con 40 μ g de Plásmido 4 y 10 μ g de Plásmido 6 (figura 10); y un gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre en ayunas frente a la edad de ratones NOD individuales para el Grupo 7 tratados con 40 μ g de Plásmido 5 y 10 μ g de Plásmido 6 (una composición de acuerdo con la presente invención) (figura 11).

Como puede observarse en las figuras, la metilación en solitario (figura 7), metilación y la presencia de SGAD55 en solitario, metilación y la presencia de BAX en solitario (figura 9), y la presencia de SGAD55 y BAX en solitario (figura 10), no retarda la aparición de, previene ni trata la diabetes. Como puede observarse en la figura 11, sin embargo, metilación y la presencia de SGAD55 y BAX retarda la aparición de, previene o trata la diabetes ($P < 0,001$ en comparación con otros grupos). Además, el tratamiento recibido por el Grupo 7 era capaz de revertir la diabetes ya presente con eficacia. Por lo tanto, estos resultados demuestran que una composición que comprende un primer plásmido metilado que comprende un polinucleótido que codifica un autoantígeno o un antígeno donador bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno donador, y un segundo plásmido que comprende un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica retarda la aparición de, previene y trata el trastorno inflamatorio de mediación inmune causado por una reacción autoinmune al autoantígeno o al antígeno donador.

Ejemplo II

Prevención de la diabetes

De acuerdo con la presente invención, la aparición de diabetes en un paciente humano se retarda, trata o previene, por ejemplo, de la siguiente manera. En primer lugar, el paciente se selecciona en base a la presencia de autoanticuerpos anti-insulina y anti-GAD circulantes, u otros criterios como entenderán los expertos en la materia en referencia a esta descripción. A continuación, al paciente se le inyectan por vía intradérmica 0,05 mg/kg de peso corporal de una sustancia de acuerdo con la presente invención. Remitiéndonos ahora a la figura 12, se muestra una representación esquemática de una sustancia para una composición de la presente invención para prevenir, retardar la aparición de o tratar uno o más de un trastorno inflamatorio de mediación inmune en un organismo que es susceptible de desarrollar el trastorno inflamatorio de mediación inmune, que está desarrollando el trastorno inflamatorio de mediación inmune o que tiene el trastorno inflamatorio de mediación inmune. Como puede observarse, la sustancia comprende un plásmido que comprende un polinucleótido que codifica SGAD55, SEC ID N° 1, y BAX, SEC ID N° 2, ambas bajo el control del promotor SV40p. Además, el plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y al menos algunos de la pluralidad de motivos CpG están metilados. Además, el plásmido comprende componentes adicionales como se han mostrado, y como se han descrito anteriormente. La inyección se repite semanalmente mientras se supervisa el nivel de autoanticuerpos anti-insulina y anti-GAD circulantes. El tratamiento finaliza cuando el nivel de autoanticuerpos anti-insulina y anti-GAD circulantes, o los otros criterios, han vuelto a un nivel normal.

ES 2 348 701 T3

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

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes, estando la composición **caracterizada** porque comprende:

- a) un primer plásmido que comprende un polinucleótido que codifica ácido glutámico descarboxilasa secretada 55, SEC ID N° 1, bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica ácido glutámico descarboxilasa secretada 55; y
- b) un segundo plásmido que comprende BAX, teniendo dicho polinucleótido la SEC ID N° 2, bajo el control de un promotor capaz de promover el polinucleótido que codifica BAX;

donde la diabetes es causada por una respuesta inmune que es inapropiada o excesiva o tanto inapropiada como excesiva para ácido glutámico descarboxilasa secretada 55; y donde el primer plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y al menos algunos de la pluralidad de motivos CpG están metilados.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que el segundo plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y en la que al menos algunos de la pluralidad de motivos CpG están metilados.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer plásmido y el segundo plásmido están en una proporción de entre 1/1000 y 1000/1.

4. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer plásmido y el segundo plásmido están en una proporción de entre 1/100 y 100/1.

5. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer plásmido y el segundo plásmido están en una proporción de entre 1/10 y 10/1.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que el organismo es un mamífero.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que el organismo es un ser humano.

8. La composición de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido que codifica la ácido glutámico descarboxilasa secretada 55, o el polinucleótido que codifica BAX, o tanto el polinucleótido que codifica la ácido glutámico descarboxilasa secretada 55 como el polinucleótido que codifica BAX es ADN.

9. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento en una forma adaptada para la administración de dosis de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del organismo y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del organismo, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes.

10. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento en una forma adaptada para la administración de dosis de entre aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal del organismo y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del organismo, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes.

11. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento en una forma adaptada para la administración de dosis de entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal del organismo y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del organismo, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes.

12. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento en una forma adaptada para la administración de dosis, en el que se administra una dosis semanalmente entre 2 veces y aproximadamente 100 veces, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes.

13. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento en una forma adaptada para la administración de dosis, en el que se administra una dosis semanalmente entre 2 veces y aproximadamente 20 veces, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes.

14. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento en una forma adaptada para la administración de dosis, en el que se administra una dosis semanalmente

ES 2 348 701 T3

entre 2 veces y aproximadamente 10 veces, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes.

- 5 15. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento en una forma adaptada para la administración de dosis, en el que las dosis están adaptadas para ser administradas al organismo mediante una vía seleccionada entre el grupo constituido por epidérmica, intradérmica, intramuscular, intranasal, intravenosa y oral, para prevenir, retardar la aparición de o tratar diabetes en un organismo que es susceptible de desarrollar diabetes, que está desarrollando diabetes o que tiene diabetes.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

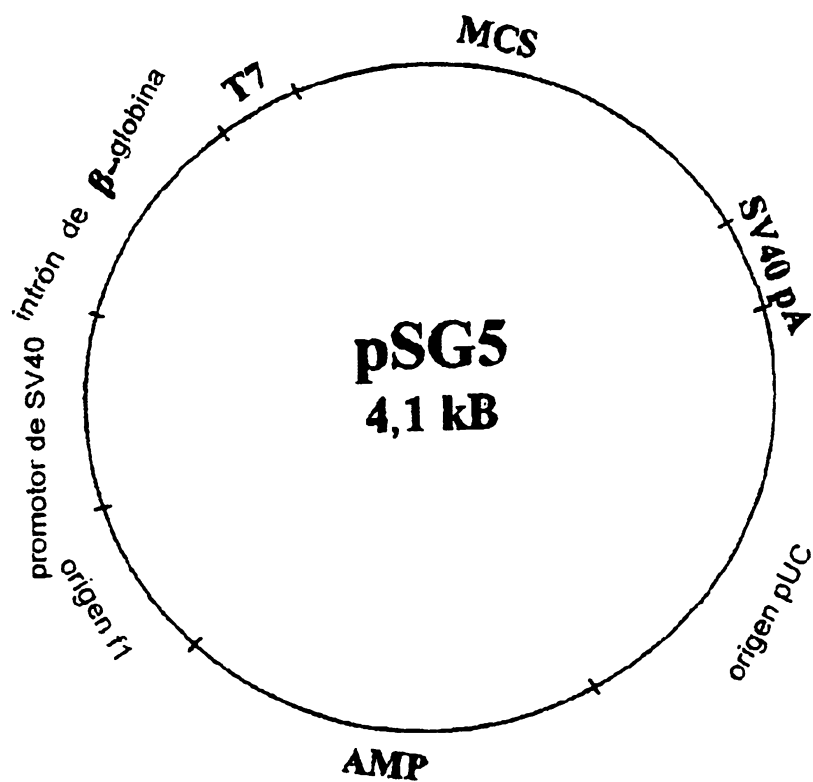


Fig. 2

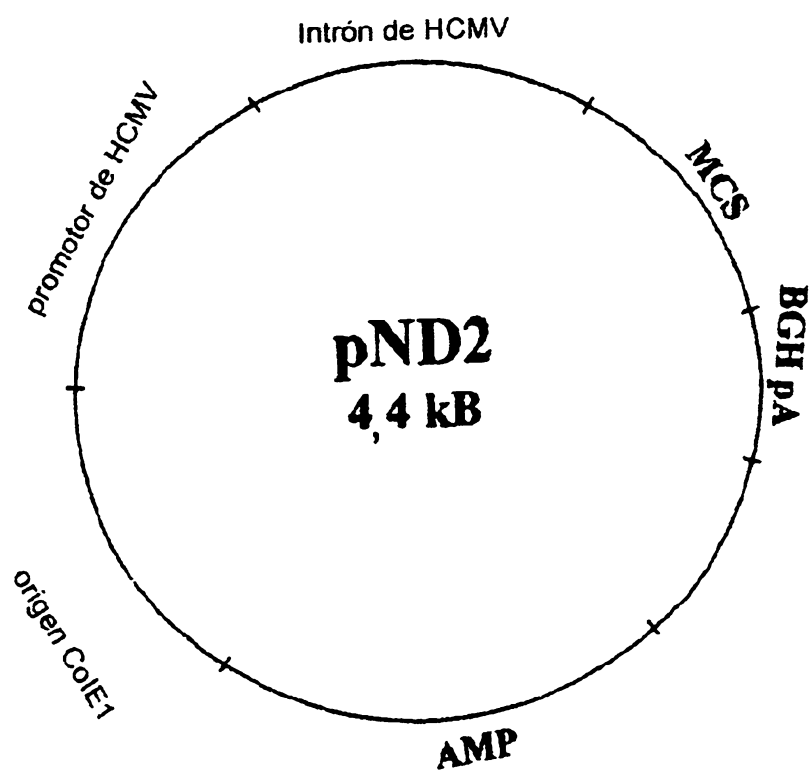


Fig. 3

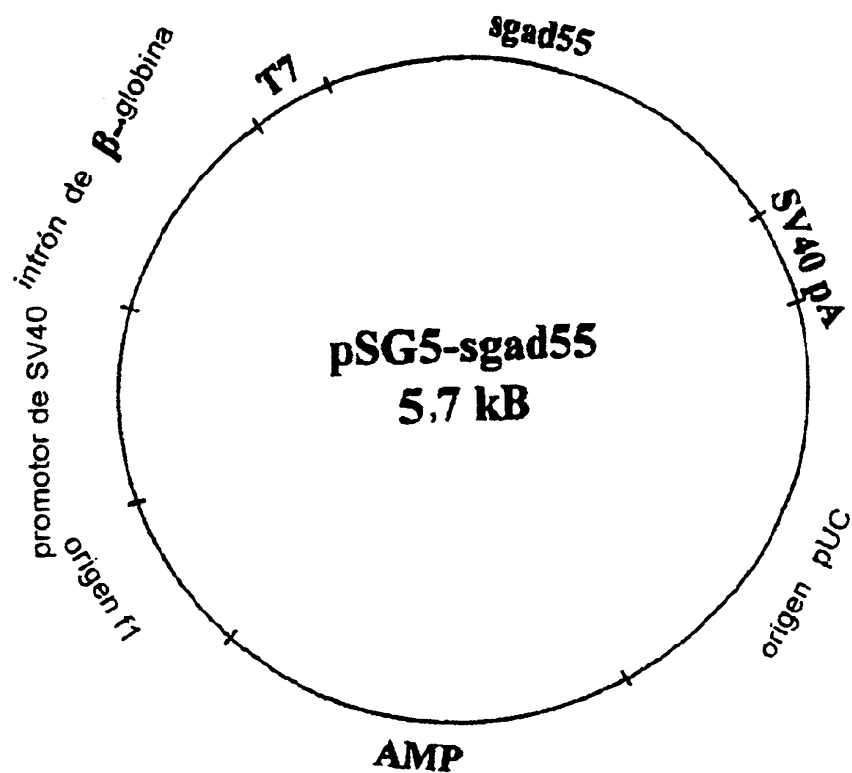


Fig. 4

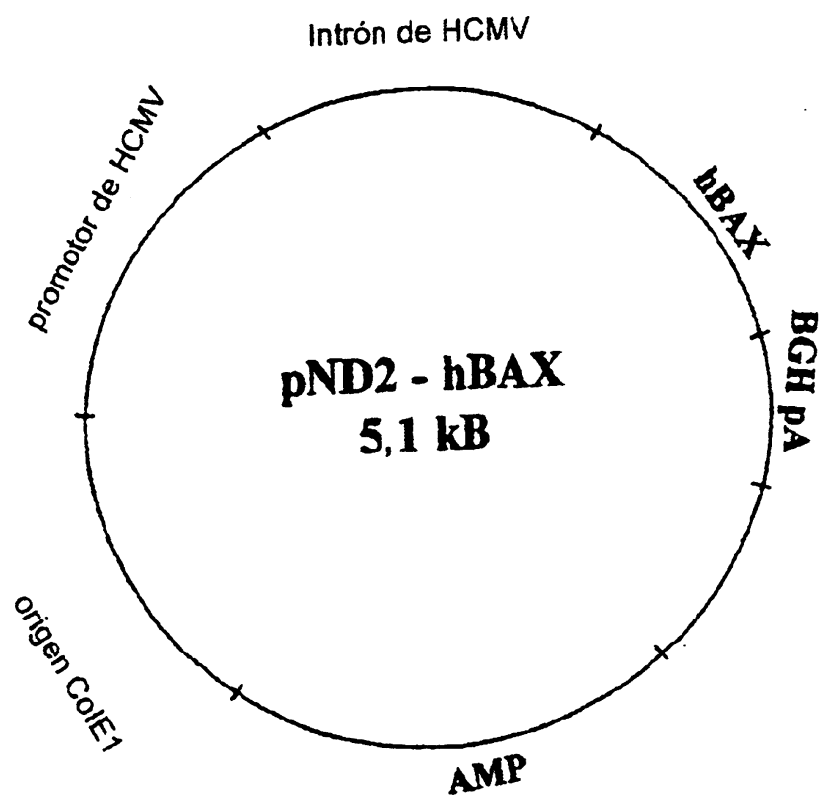


Fig. 5

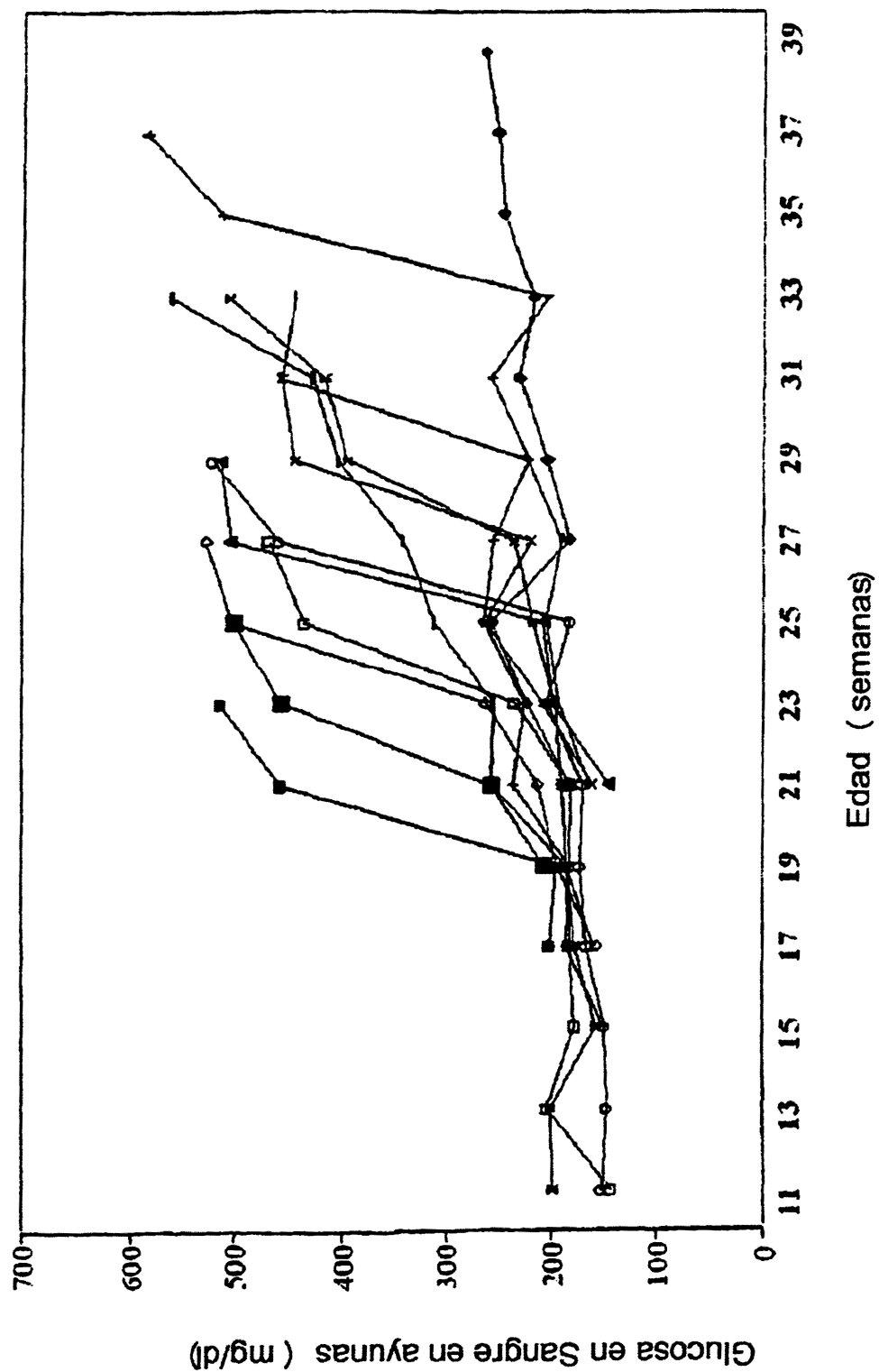


Fig. 6

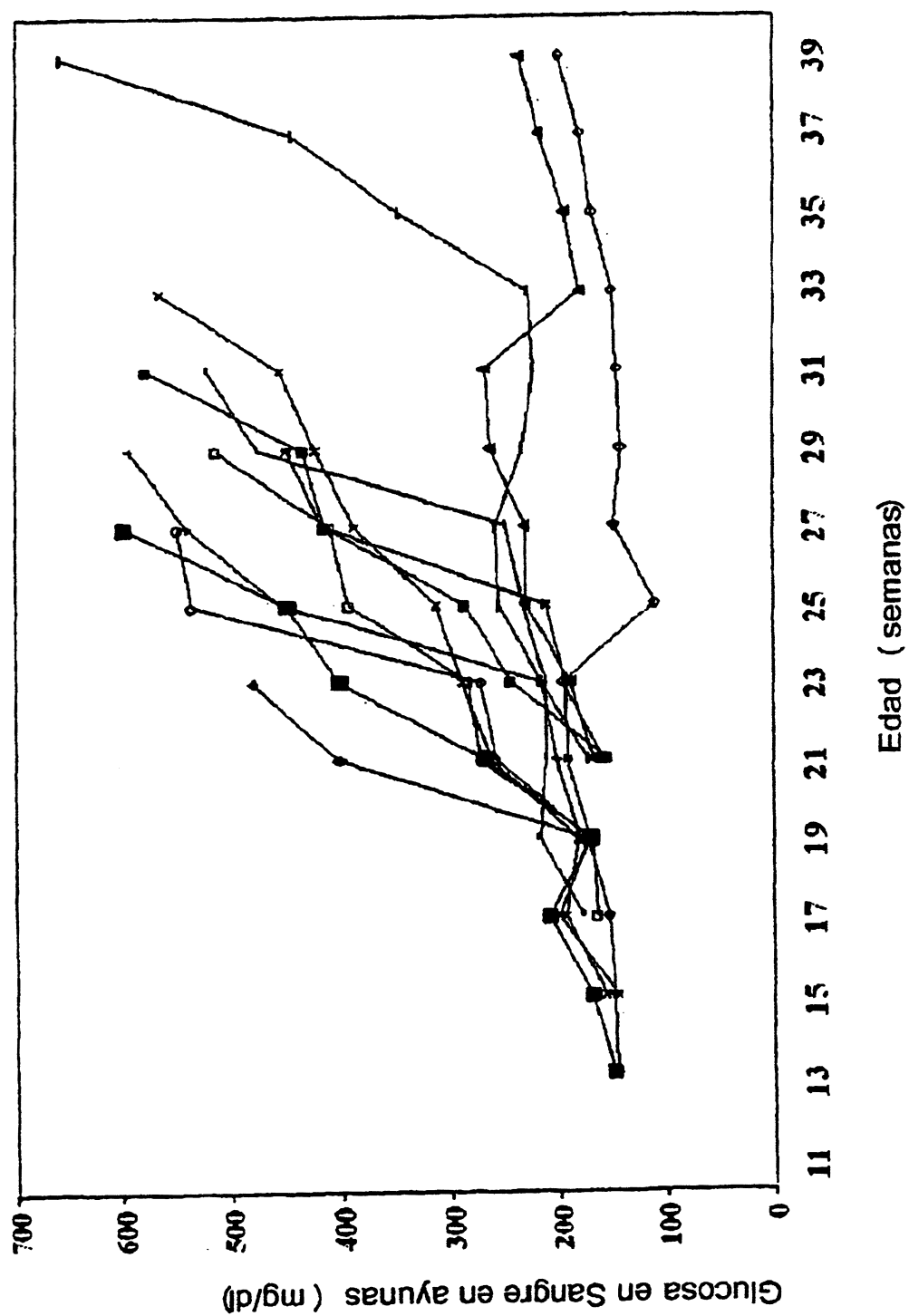


Fig. 7

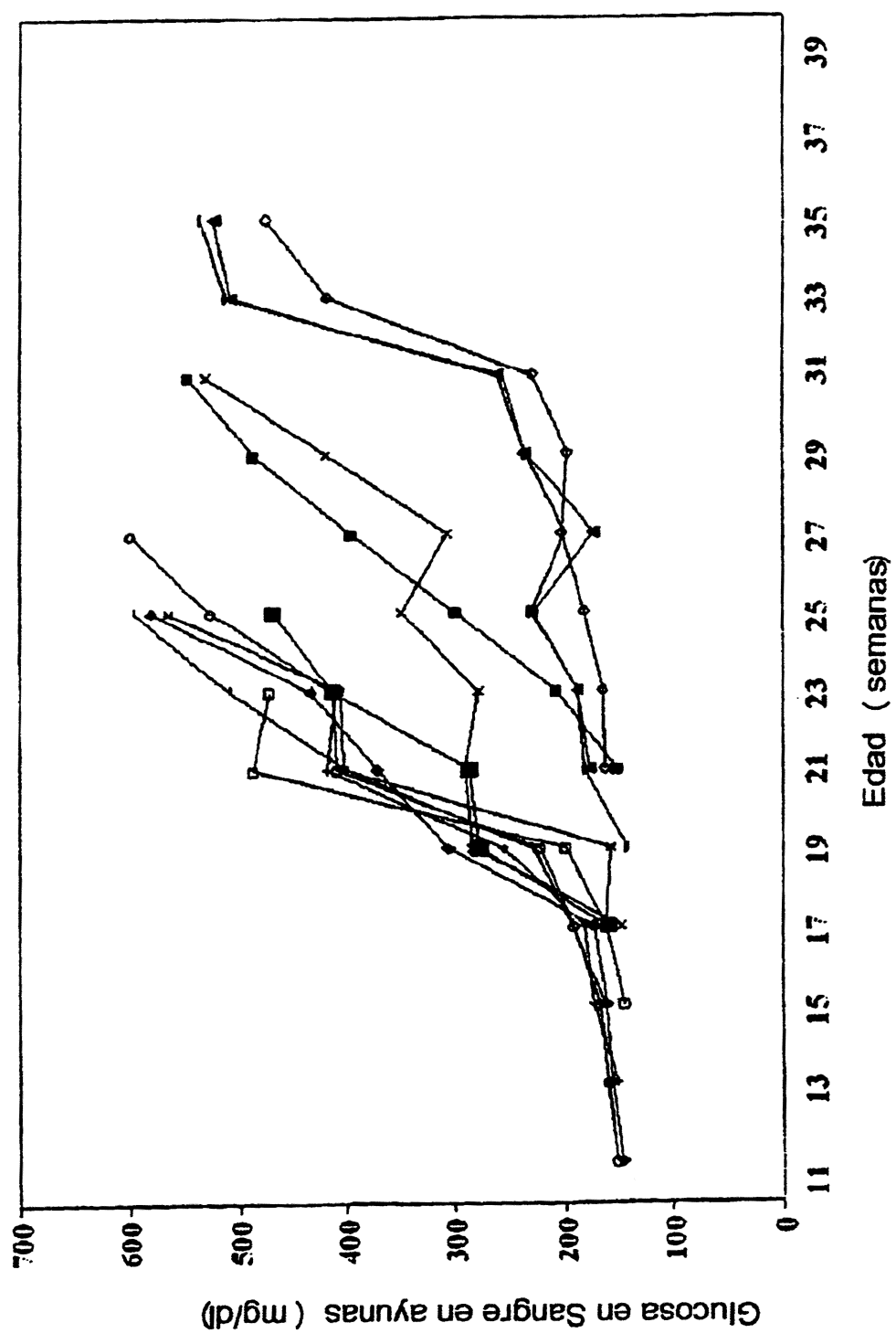


Fig. 8

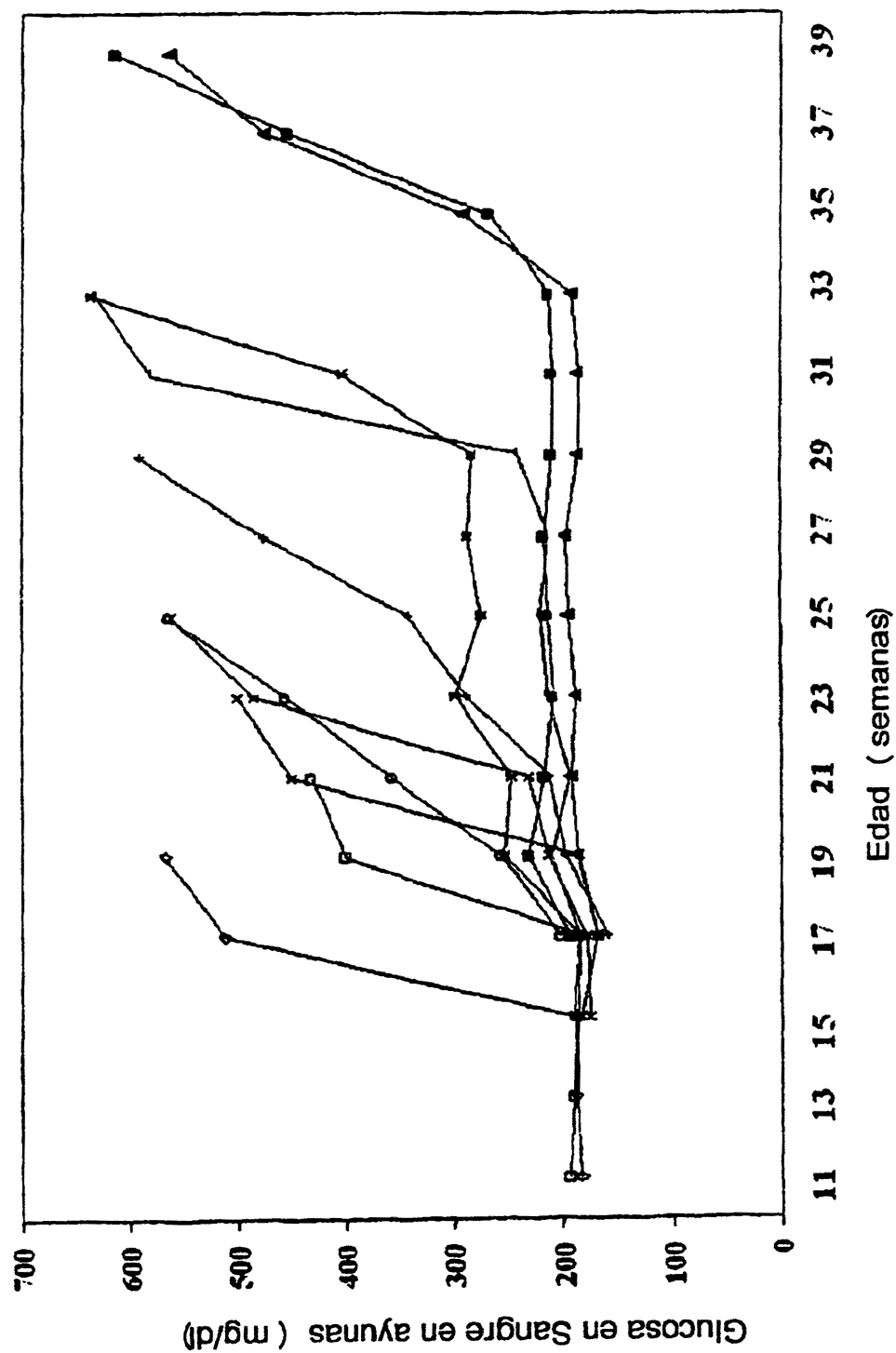


Fig. 9

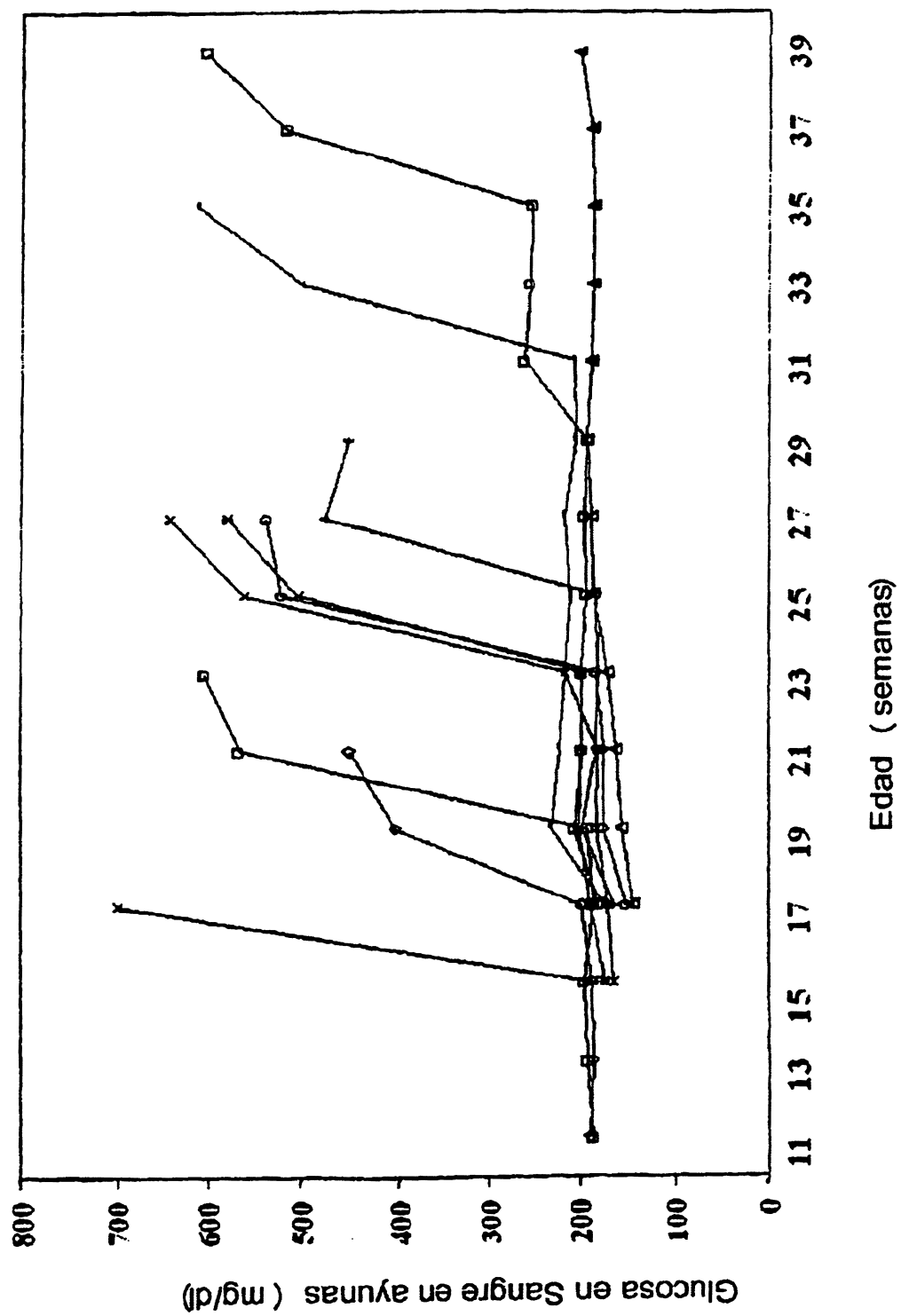


Fig. 10

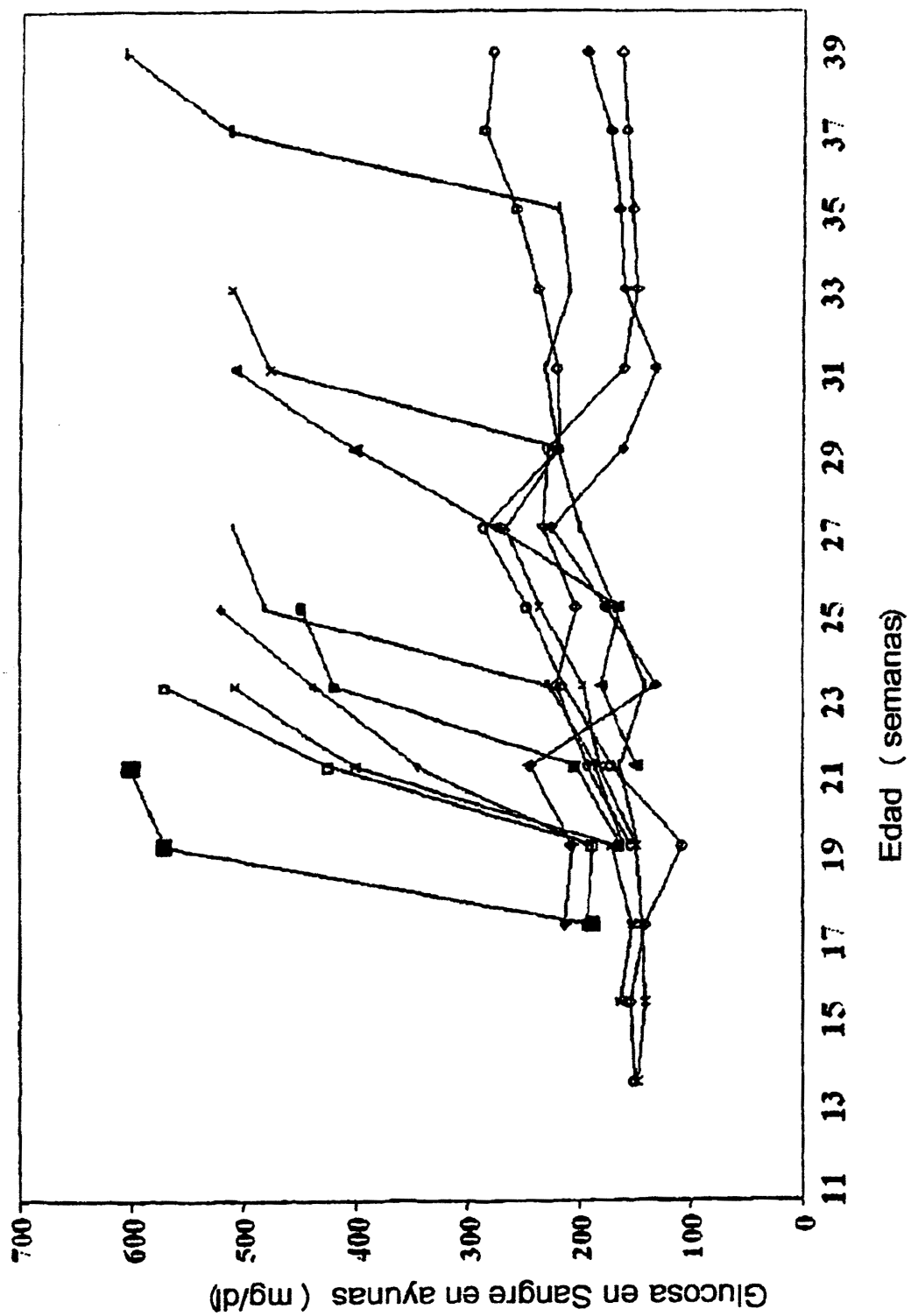


Fig. 11

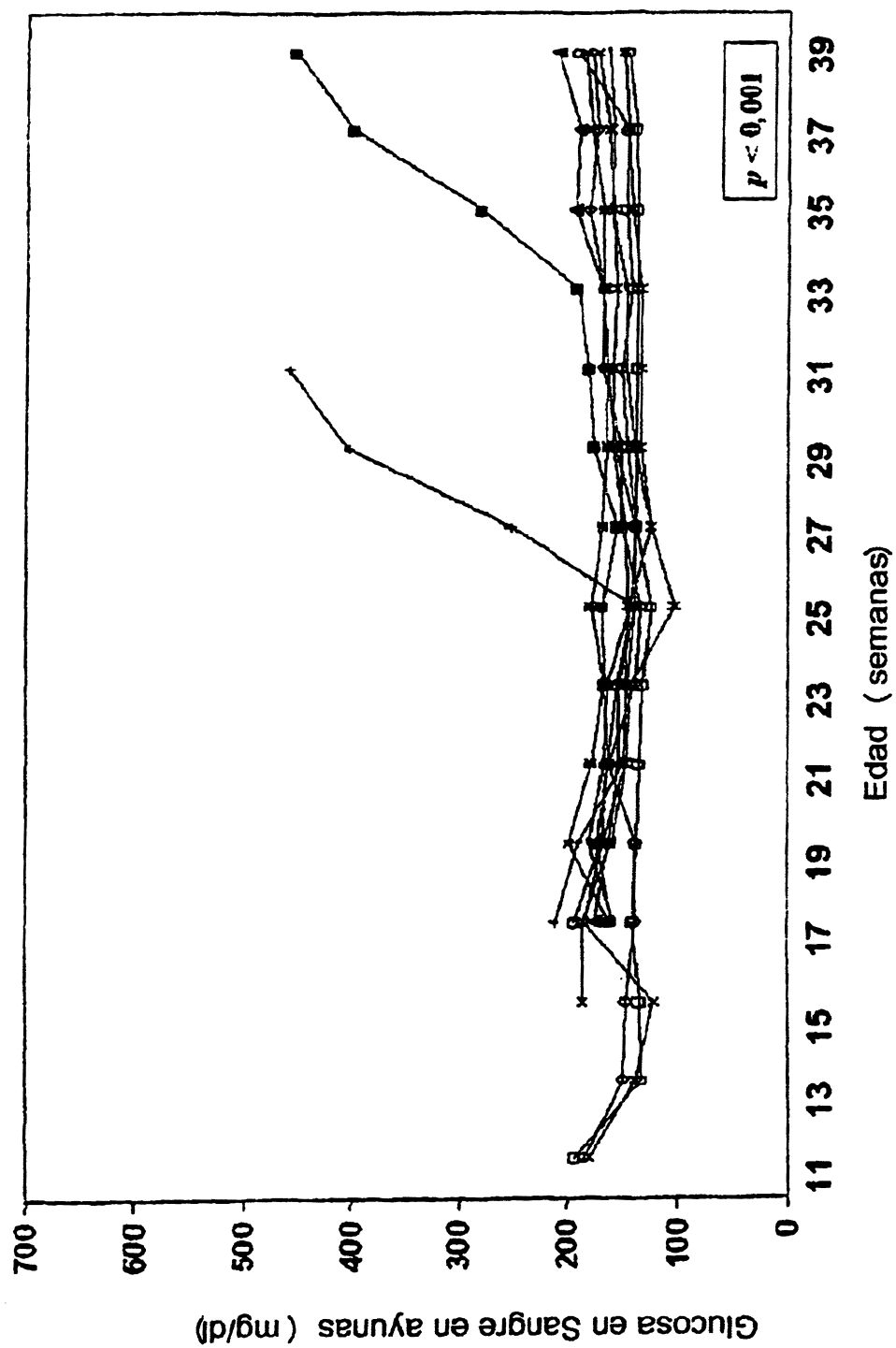
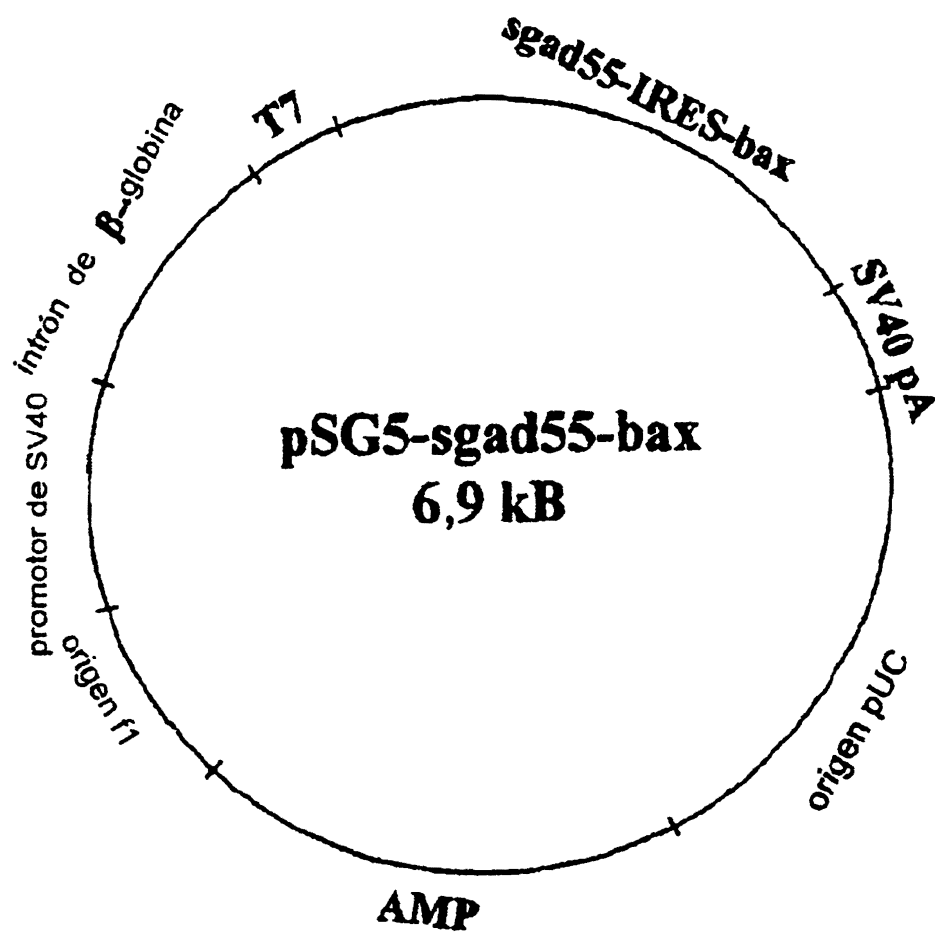


Fig. 12



ES 2 348 701 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Loma Linda university
 ESCHER, Alan P.
 LI, Fengchun

<120> Sustancias, composiciones y métodos para prevenir y tratar trastornos inflamatorios de mediación inmune

<130> 14102-3US

<150> US 60/680.249
 <151> 11-05-2005

<150> PCT/US2006/17763
 <151> 05-05-2005

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 <211> 1638
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> forma secretada de GAD humana

<400> 1

atgtacagga	tgcaactcct	gtcttgcatt	gcactaagtc	ttgcacttgt	cacaaacagt	60
gcacctactt	acgcgtttct	ccatgcaaca	gacctgtctg	cggcgtgtga	tggagaaaag	120
cccacttttg	cgtttctgca	agatgttatg	aacattttac	ttcagtatgt	ggtgaaaagt	180
ttcgatagat	caaccaaaag	gattgatttc	cattatccta	atgagcttct	ccaagaatat	240
aatttggaat	tggcagacca	accacaaaat	ttggaggaaa	ttttgatgca	ttgccaaaca	300
actctaaaat	atgcaattaa	aacagggcat	cctagatact	tcaatcaact	ttctactggt	360
ttggatatgg	ttggattagc	agcagactgg	ctgacatcaa	cagcaaatac	taacatgttc	420
acctatgaaa	ttgctccagt	atttgtgctt	ttggaatatg	tcacactaaa	gaaaatgaga	480
gaaatcattg	gctggccagg	gggctctggc	gatgggatat	tttctcccg	tggcgcata	540
tctaacatgt	atgccatgat	gatcgcacgc	tttaagatgt	tcccagaagt	caaggagaaa	600
ggaatggctg	ctcttcccag	gctcattgcc	ttcacgtctg	aacatagtca	tttttctctc	660
aagaagggag	ctgcagcctt	agggattgga	agagacagcg	tgattctgat	taaatgtgat	720
gagagagggg	aaatgattcc	atctgatctt	gaaagaagga	ttcttgaagc	caaacagaaa	780
gggtttgtrc	ctttcctcgt	gagtgccaca	gctggaacca	ccgtgtacgg	agcatttgac	840
ccccctctag	ctgtcgtgca	catttgcaaa	aagtataaga	tctggatgca	tgtggatgca	900
gcttgggggtg	ggggattact	gatgtcccga	aaacacaagt	ggaaactgag	tggcgtggag	960
agggccaact	ctgtgacgtg	gaatccacac	aagatgatgg	gagtcctttt	gcagtgggtc	1020
gctctcctgg	ttagagaaga	gggattgatg	cagaattgca	accaaagtca	tgccctctac	1080
ctctttcagc	aagataaaca	ttatgacctg	tcctatgaca	ctggagacaa	ggccttacag	1140
tgcggacgcc	acgttgatgt	ttttaaacta	tggctgatgt	ggagggcata	ggggactacc	1200

ES 2 348 701 T3

5 ggggtttgaag cgcattgttga taaatgtttg gagttggcag agtatttata caacatcata 1260
 aaaaaccgag aaggatatga gatggtgttt gatgggaagc ctgaggacac aaatgtctgc 1320
 10 ttctgggtaca ttctccaag cttgcgtact ctggaagaca atgaagagag aatgagtcgc 1380
 ctctcgaagg tggctccagt gattaaagcc agaatgatgg agtatggaac cacaatggtc 1440
 agctaccaac ccttgggaga caaggtcaat ttcttccgca tggtcatttc aaaccacgcg 1500
 15 gcaactcacc aagacattga cttcctgatt gaagaaatag aacgccttgg acaagattta 1560
 taataacctt gctcaccaag ctgttccact tctctaggtg gcgacctcga gcggccgctc 1620
 gagggggggc ccggtacc 1638

20 <210> 2
 <211> 579
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 2

30 atggacgggt ccggggagca gcccagaggc ggggggcca ccagctctga gcagatcatg 60
 aagacagggg ccccttttgc ttagggtttc atccaggatc gagcagggcg aatggggggg 120
 gaggcaccgg agctggccct ggacccgggtg cctcaggatg cgtccaccaa gaagctgagc 180
 gagtgtctca agcgcattcg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240
 35 gccgccgtgg acacagactc cccccgagag gtctttttcc gagtggcagc tgacatgttt 300
 tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtcgcccttt tctactttgc cagcaaactg 360
 gtgctcaagg ccttgtgcac caaggtgccg gaactgatca gaaccatcat gggttgaca 420
 40 ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accaggggtg ttgggacggc 480
 ctcctctcct actttgggac gccacgtgg cagaccgtga ccatctttgt ggcgggagtg 540
 45 ctcaccgcct cgctcaccat ctggaagaag atgggctga 579

50 <210> 3
 <211> 619
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalomiocarditis

55

60

65

ES 2 348 701 T3

<400> 3

	tctagataat acgactcact atagggcgaa ttccccctct ccctccccc cccctaacgt	60
5	tactggccga agccgcttgg aataaggccg gtgtgcgttt gtctatatgt tattttccac	120
	catattgccg tcttttggca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct tcttgacgag	180
10	cattcctagg ggtctttccc ctctcgccaa aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa	240
	ggaagcagtt cctctggaag ctctctgaag acaaacaacg tctgtagcga ccctttgcag	300
	gcagcggaa cccccacctg gcgacaggtg cctctgcggc caaaagccag gtgtataaga	360
15	tacacctgca aaggcggcac aaccccagtg ccacgttgtg agttggaata gttgtggaaa	420
	gagtc aaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtag	480
	cccattglat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacctgt gtttagtcga	540
20		
	ggttaaaaaa cgtctaggcc cccaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga	600
25	ttattatatt gcctctaga	619
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		