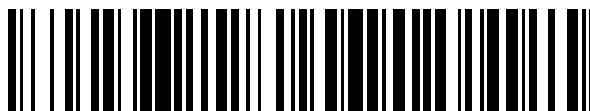


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 491**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 35/407 (2015.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2012 E 17198106 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3293197**

54 Título: **Terapia génica con insulina basada en hepatocitos para la diabetes**

30 Prioridad:

07.06.2011 US 201161494134 P

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

21.07.2020

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)**

**614 Walnut Street
Madison, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

**ALAM, TAUSIF y
SOLLINGER, HANS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 774 491 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

Terapia génica con insulina basada en hepatocitos para la diabetes

5 **Antecedentes**

Esta invención se refiere al tratamiento de la diabetes utilizando terapia basada en hepatocitos y, específicamente, a un método para utilizar células de hepatocitos que comprende una construcción genética que tiene una secuencia codificante para una proinsulina expresable en las células en respuesta a los niveles de glucosa. La proinsulina sintetizada en las células se procesa posteriormente en una insulina activa secretable.

La insulina normalmente se produce en y se secreta por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. La insulina madura es una proteína que tiene dos cadenas polipeptídicas, A y B, unidas mediante enlaces disulfuro. La liberación de insulina sensible a glucosa de las células beta es un evento complejo que incluye expresión génica, modificación postraduccional y secreción. El producto proteico inicial y el precursor de la insulina es preproinsulina, una cadena polipeptídica única que tiene una secuencia señal N-terminal y una secuencia intermedia, el péptido C, entre las cadenas B y A. La secuencia señal se escinde durante el transporte desde el retículo endoplásmico rugoso para formar proinsulina. La proinsulina se empaqueta en gránulos secretores junto con enzimas específicas requeridas para su procesamiento. La proinsulina se pliega en una estructura tridimensional específica, formando enlaces disulfuro. La insulina madura resulta de la eliminación del péptido C. En las células beta, esta función se cataliza mediante endopeptidasas que reconocen las secuencias de aminoácidos específicas en la unión de la cadena B y el péptido C (unión B-C) y en la unión de la cadena C y el péptido A (unión C-A). La insulina madura, almacenada en gránulos secretores, se libera en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. El mecanismo detallado de la liberación de insulina no se comprende completamente, pero el proceso implica la migración a y la fusión de los gránulos secretores con la membrana plasmática antes de la liberación.

En las células beta que funcionan normalmente, la producción y liberación de insulina se ve afectada por el flujo glucolítico. La glucocinasa y el transportador de glucosa 2 (GLUT-2, por sus siglas en inglés) son dos proteínas que se cree que están implicadas en la detección de cambios en la concentración de glucosa en las células beta. Una reducción en GLUT-2, que está implicada en el transporte de glucosa, se correlaciona con una disminución de la expresión de insulina; la pérdida de la actividad glucocinasa provoca una rápida inhibición de la expresión de insulina.

La destrucción autoinmunitaria de las células beta pancreáticas causa diabetes mellitus dependiente de insulina o diabetes tipo I. Como consecuencia de la pérdida parcial o completa de las células beta, el páncreas segrega poca o ninguna insulina. La mayoría de las células, con la excepción de las células cerebrales, requieren insulina para la absorción de glucosa. La producción inadecuada de insulina provoca una absorción reducida de glucosa y niveles elevados de glucosa en sangre. Tanto la absorción reducida de glucosa como los niveles altos de glucosa en sangre están asociados con una serie de problemas de salud muy graves. De hecho, sin tratamiento adecuado, la diabetes puede ser fatal.

Un tratamiento convencional para la diabetes implica la administración periódica de insulina exógena inyectable. Este método ha extendido la esperanza de vida de millones de personas con la enfermedad. Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre deben controlarse cuidadosamente para garantizar que el individuo recibe una cantidad adecuada de insulina. Demasiada insulina puede hacer que los niveles de glucosa en sangre bajen a niveles peligrosamente bajos. Muy poca insulina dará como resultado niveles elevados de glucosa en sangre. Incluso con un cuidadoso control de los niveles de glucosa en sangre, el control de la dieta y las inyecciones de insulina, la salud de la gran mayoría de las personas con diabetes se ve afectada de alguna manera. El reemplazo de la función de las células beta es una modalidad de tratamiento que puede tener determinadas ventajas sobre la administración de insulina, ya que la insulina sería secretada por las células en respuesta a los niveles de glucosa en el microambiente. Una forma de reemplazar la función de las células beta es mediante el trasplante de páncreas, que ha tenido cierto éxito. Sin embargo, el suministro de donantes es bastante limitado, y el trasplante de páncreas es muy costoso y demasiado problemático para que esté ampliamente disponible para aquellos que necesitan la función de células beta.

Ha habido muchas otras alternativas propuestas para el reemplazo de células beta, incluido el reemplazo de la función de las células beta con células beta reales u otras líneas celulares secretoras de insulina procedentes del páncreas (Lacy, et al., Ann. Rev. Med., 37:33, 1986). Debido a que el sistema inmunitario reconoce las células heterólogas como extrañas, las células deben protegerse de las células inmunoactivas (por ejemplo, los linfocitos T y los macrófagos que median los procesos citolíticos).

Un enfoque para proteger las células heterólogas es el inmunoaislamiento físico; sin embargo, el inmunoaislamiento en sí plantea problemas importantes.

La Patente de EE.UU. n.º 5.427.940 emitida en Newgard divulga otro enfoque para el reemplazo de células beta. Esta patente describe una célula beta artificial producida mediante genomanipulación de células endocrinas de las células At-T-20 secretoras de ACTH. Se obtiene una célula transfectada estable, At-T-20, mediante la introducción de ADNc que codifica insulina humana y el gen transportador de glucosa, es decir, el gen GLIIT-2, impulsado por el promotor constitutivo del CMV. La línea celular ya expresa la isoforma correcta de glucocinasa requerida para la expresión

sensible a glucosa del gen de proinsulina. Aunque la línea celular es sensible a la glucosa, está regulada por secretagogos a concentraciones por debajo del intervalo fisiológico normal. Por lo tanto, el uso de estas células en un animal probablemente causaría hipoglucemia crónica; además, estas células proceden de una fuente heteróloga y portan antígenos extraños al hospedador receptor.

5 La Patente de EE.UU. n.º 5.534.404 expedida por Laurance et al. divulga otro enfoque para obtener una línea celular en la que la producción de insulina esté regulada por secretagogos. Las subpoblaciones de células beta-TC-6 que tienen una mayor concentración interna de calcio, una propiedad asociada con la secreción de insulina, se seleccionaron usando un separador celular. Después de pasajes sucesivos, se seleccionó una subpoblación de células
10 que producen insulina en respuesta a la glucosa en el intervalo fisiológico (4-10 mM), y las células se encapsularon para uso terapéutico en alginato unido por una membrana de fibra hueca permeoselectiva PAN/PVC de acuerdo con el método de Dionne (solicitud de Patente internacional n.º PCTIUS92/03327).

15 Valera, et al., FASEB Journal, 8: 440 (1994) describe hepatocitos de ratón transgénicos que expresan insulina bajo el control del promotor de la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCK, por sus siglas en inglés). El promotor de la PEPCK es sensible a la relación glucagón/insulina y se activa a niveles elevados de glucosa. El gen quimérico de PEPCK/insulina se inyectó en óvulos de ratón fecundados y se crió a la descendencia para la integración del transgen. En ratones transgénicos positivos, en condiciones de destrucción grave de islotes mediante estreptozotocina (SZ), la producción y secreción de insulina inalterada por el hígado compensó la pérdida de la función de los islotes.
20 A pesar de estos intentos de la técnica anterior, existe una necesidad continua de métodos alternativos a la terapia de insulina convencional para el tratamiento de la diabetes.

Breve resumen de la invención

25 La presente invención proporciona un vector, donde el vector comprende: i) un elemento regulador inducible por glucosa (GIRE, por sus siglas en inglés); ii) un promotor específico del hígado; iii) un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado; iv) una región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) en 3' de la albúmina; v) un intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH, por sus siglas en inglés); y vi) un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). La presente invención proporciona además
30 un vector adenovírico, comprendiendo el vector adenovírico: i) un elemento regulador inducible por glucosa (GIRE); ii) un promotor específico del hígado; iii) un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado; iv) una región no traducida (UTR) en 3' de la albúmina; y v) un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y vi) un potenciador transcripcional, un intrón de la HGH o ambos.

35 En una realización, el vector puede usarse para tal método que comprende la etapa de trasplantar hepatocitos de nuevo a un mamífero.

En una realización, el vector genético se administra mediante la exposición de las células a un virus infeccioso para las células, en donde el virus comprende la construcción genética y, por la cual, al menos una parte de las células se infectan por el virus en condiciones adecuadas y en multiplicidad suficiente.
40

En una realización, el mamífero es un ser humano y la insulina es insulina humana.

En una realización de la invención, el nivel de colesterol del mamífero disminuye después del tratamiento.
45

En una realización de la invención, el nivel de triglicéridos del mamífero disminuye después del tratamiento.

En una realización, el mamífero es un gato o un perro.

50 Otras realizaciones de la presente invención se describen en la memoria descriptiva, las reivindicaciones y los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que compara la glucosa en sangre en ayunas frente al tiempo en ratas diabéticas tratadas con STZ tratadas con diversos niveles de TA-1M.
55

La Figura 2 es un gráfico que compara los niveles de glucosa en sangre posprandial frente al tiempo para ratas diabéticas tratadas con STZ tratadas con ADN en minicírculos TA-1.

La Figura 3 es un gráfico que compara el peso corporal en ayunas frente al tiempo en ratas diabéticas tratadas con STZ tratadas con ADN en minicírculos TA-1.
60

La Figura 4 es un diagrama del casete de expresión TA1.

65 La Figura 5 es un diagrama del casete de expresión TA4.

La Figura 6 es la secuencia de ADN del casete de expresión TA1.

La Figura 7 es la secuencia de ADN del casete de expresión TA4.

5 La Figura 8 es un diagrama de los niveles de glucosa frente al tiempo frente a los niveles de insulina durante una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal de ratas diabéticas tratadas con TA1.

La Figura 9 es un gráfico de barras que compara la producción de insulina *ex vivo* en hepatocitos tratados con diversas construcciones génicas de insulina.

10 La Figura 10 es un diagrama del casete de expresión TA2.

La Figura 11 es la secuencia de ADN del casete de expresión TA2.

15 La Figura 12 es un diagrama de glucosa en sangre frente a días en ratas, en ayunas durante la noche y tratadas con construcciones TA1 y Ta4.

La Figura 13 es un diagrama del peso corporal frente a los días en ratas tratadas con la construcción génica TA1.

20 La Figura 14 es un gráfico del peso corporal frente a días en ratas tratadas con la construcción génica TA1 y TA4.

La Figura 15 es una tabla de niveles de insulina humana en suero de ratas diabéticas tratadas con ADN plasmídico o en minicírculos.

25 La Figura 16 es un gráfico de los niveles de glucosa en sangre frente al tiempo para ratas que experimentan un segundo tratamiento de ADN en minicírculos TA1.

La Figura 17 es una tabla de producción de insulina dependiente de glucosa a partir de células madre humanas procedentes de hepatocitos.

30 La Figura 18 es un gráfico del peso corporal frente a días para ratas diabéticas tratadas con TA1M, TA2M y TA3M.

Descripción de la invención

35 En general

Debido a la escasez de páncreas donados y al éxito limitado a largo plazo de los trasplantes de islotes, se necesitan alternativas para tratar la diabetes tipo I (DT1). Se ha desarrollado una terapia de producción de insulina hepática regulada por glucosa basada en terapia génica que demuestra una gran promesa en el tratamiento de la DT1 en animales experimentales. El presente enfoque es aplicar la terapia génica con insulina a hepatocitos autólogos naturales o hepatocitos procedentes de células madre en un intento por superar las dos deficiencias críticas en el tratamiento de la DT1, que son la escasez de órganos donados y la necesidad del uso de inmunosupresión durante toda la vida en pacientes trasplantados.

45 Como demuestran los Ejemplos a continuación, se examinan nuevas construcciones de ADN para determinar la capacidad de mejorar la producción de insulina. Por ejemplo, una nueva construcción de insulina (TA1, descrita a continuación) que contiene el intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH), un potenciador traduccional, elementos reguladores inducibles por glucosa, promotor de albúmina, insulina humana con sitios de peptidasa modificados y la UTR en 3' de la albúmina, mejoró la producción de insulina en hepatocitos cultivados y ratas y ratones diabéticos. TA1 dio como resultado un aumento de ~ 25 veces en la producción de insulina de hepatocitos de rata aislados en comparación con la construcción de insulina publicada anteriormente [Alam & Sollinger, Transplantation. 27 de diciembre de 2002;74(12):1781-7],

55 En un aspecto, la presente invención se refiere a una nueva construcción de ADN diseñada para mejorar la producción de insulina en los hepatocitos. Otro aspecto de la presente invención se refiere a la creación de hepatocitos con producción mejorada de insulina. Otro aspecto de la presente invención se refiere a los vectores para su uso en un método para aliviar los síntomas de la diabetes tipo I en un paciente mamífero mediante la modulación de la producción de insulina.

60 Construcciones

Los siguientes Ejemplos demuestran cuatro construcciones de insulina que contienen varios elementos. Los Ejemplos demuestran que tres construcciones (TA1, TA2 y TA4) tuvieron éxito al proporcionar una terapia génica de insulina que proporciona un control estricto de la producción de insulina. Por lo tanto, se describen tres tipos de vectores. El primer tipo de vector comprende un potenciador transcripcional, elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor génico, un potenciador traduccional, un gen que codifica insulina con sitio de peptidasa modificado y una

UTR en 3' de albúmina y carece de un intrón de la HGH. El segundo tipo de vector comprende un intrón de la HGH, elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor génico, un potenciador traduccional, un gen que codifica insulina con sitio de peptidasa modificado y una UTR en 3' de albúmina y carece de un potenciador transcripcional. El tercer tipo de vector comprende todos los elementos enumerados.

5 La divulgación proporciona un vector, donde el vector comprende: i) un elemento regulador inducible por glucosa (GIRE); ii) un promotor específico del hígado; iii) un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado; iv) una región no traducida (UTR) en 3' de la albúmina; v) un intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH); y vi) un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). La divulgación también proporciona un vector adenovírico, comprendiendo el vector adenovírico: i) un elemento regulador inducible por glucosa (GIRE); ii) un promotor específico del hígado; iii) un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado; iv) una región no traducida (UTR) en 3' de la albúmina; y v) un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y vi) un potenciador transcripcional, un intrón de la HGH o ambos.

15 En otra realización de la presente invención, las construcciones utilizadas en la presente invención consisten esencialmente en los elementos enumerados anteriormente. Por "consisten esencialmente en" significa que un vector consistirá en el elemento descrito anteriormente y posiblemente otros elementos reguladores necesarios para la función del vector. Por ejemplo, los plásmidos y los vectores en minicirculo pueden incluir secuencias para facilitar la adición o eliminación de elementos funcionales, como sitios de restricción, o secuencias necesarias para la replicación del propio vector.

Los solicitantes señalan que la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 (Figuras 6, 7 y 11) son la secuencia de nucleótidos completa de las construcciones de expresión TA1, TA2 y TA4, respectivamente. Estos listados no incluyen secuencias que corresponden a sitios de recombinación de minicirculo, etc. Por ejemplo, las SEQ ID NO: 1 y 2 no incluyen secuencias específicas utilizadas para la recombinación que se encuentran dentro del plásmido parental de minicirculo comercial que flanquean los casetes de expresión. Debido a que todas estas secuencias son parte de plásmidos comerciales y están fácilmente disponibles, las secuencias no se incluyen en la información proporcionada.

La SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 incluyen elementos que son necesarios para la presente invención (por ejemplo, los elementos enumerados a continuación) y secuencias de unión y no esenciales que son útiles para la clonación pero que se pueden sustituir por muchas otras secuencias con funciones similares.

	Ubicación de los restos en la SEQ ID NO: 1 (TA1)	Ubicación de los restos en la SEQ ID NO: 2 (TA4)	Ubicación de los restos en la SEQ ID NO: 3 (TA2)
Potenciador de alfafetoproteína (AFP)	15-265		15-265
Elementos reguladores inducibles por glucosa	279-369	46-136	279-369
Secuencia del promotor de albúmina	380-706	147-474	380-707
Intrón de la HGH	-	475-754	708-987
Potenciador traduccional del VEGF	707-870	755-918	988-1151
Gen que codifica la insulina humana con uniones peptídicas modificadas de B-C y C-A para la compatibilidad con furina	871-1203	919-1251	1152-1484
UTR en 3' de la albúmina	1204-2077	1252-2125	1485-2358

Más específicamente, los vectores comprenden los siguientes elementos:

Potenciador del promotor

"Potenciador del promotor", se refiere, preferentemente, al potenciador de alfafetoproteína. Los siguientes Ejemplos divulgan el uso del potenciador de alfafetoproteína. Este elemento está diseñado para mejorar la transcripción de la secuencia génica funcionalmente unida que codifica una proteína en las células hepáticas. El potenciador de alfafetoproteína aumenta la eficacia del promotor de albúmina y aumenta la unión del complejo de ARN polimerasa, produciendo así más ARNm, lo que finalmente conduce a un aumento en la producción de proteínas. Los factores endógenos presentes en las células hepáticas interactúan con la región potenciadora de alfafetoproteína que activa los promotores de albúmina y alfafetoproteína durante el desarrollo del hígado y en el hígado completamente desarrollado. Debido a que el efecto del potenciador de AFP se extingue en las células hepáticas completamente desarrolladas a través de la represión de su actividad, la región asociada con la represión no se incluye en la secuencia potenciadora de AFP, lo que permite que la actividad potenciadora persista en las células hepáticas completamente desarrolladas.

Una forma adecuada del potenciador de AFP se divulga en Jin et al., Developmental Biology 336 (2009) 294-300. Se puede encontrar una secuencia específica del potenciador de AFP en los restos 5-265 de la SEQ ID NO: 1 (casete de

expresión TA1).

En otra realización, se usarían otros potenciadores del promotor adecuados para su uso con un promotor específico del hígado. Muchos promotores normales son bastante grandes y contienen múltiples regiones que modulan la actividad transcripcional según se requiera para las necesidades fisiológicas existentes en un momento dado. Por lo tanto, la selección de un potenciador del promotor apropiado depende del contexto. Debe trabajar con el promotor en cuestión. Si las determinaciones empíricas validan la eficacia funcional de los potenciadores de otros promotores, junto con el promotor específico del hígado utilizado, se pueden realizar modificaciones apropiadas en los casetes de expresión de insulina para lograr los resultados deseados. Actualmente, de acuerdo con la base de datos de Cold Spring Harbor Laboratory, existen aproximadamente 400 regiones reguladoras conocidas y elementos que funcionan en las células hepáticas.

Potenciador traduccional

"Potenciador traduccional", se refiere, preferentemente, al potenciador traduccional del VEGF. Los siguientes Ejemplos divulgan el uso del potenciador traduccional del VEGF. Este elemento está diseñado para mejorar la traducción de la secuencia codificante de proteínas unida funcionalmente. El potenciador traduccional del VEGF actúa como un sitio de entrada ribosomal; aumenta la eficacia del proceso de traducción. Por lo tanto, su presencia provoca una mayor cantidad de producción de proteína de insulina a partir de una cantidad dada de ARNm de insulina.

Los vectores comprenden un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se puede encontrar una secuencia específica del potenciador traduccional del VEGF en los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1 (casete de expresión TA1) y en los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2 (casete de expresión TA4).

Elementos reguladores inducibles por glucosa (GIRE)

El vector requiere de 1-5 GIRE, preferentemente de 2-4 GIRE, lo más preferentemente 3 GIRE. Se puede encontrar la secuencia para GIRE adecuados en los restos 279-369 en la SEQ ID NO: 1 y 46-136 en la SEQ ID NO: 2. Los GIRE adecuados también se describen a continuación en los Ejemplos y también se pueden encontrar en las Patentes de EE.UU. 7.425.443 y 6.933.133.

Tal como se usa en el presente documento, un "elemento regulador inducible por glucosa" (GIRE) se refiere a una secuencia polinucleotídica que contiene al menos un par de motivos CACGTG perfectos, estando cada miembro del par separado del otro por una secuencia de cinco pares de bases. Un "módulo regulador sensible a la glucosa" contiene uno o más GIRE. En un ejemplo, los elementos reguladores se insertaron en 5' de la región no traducida en 5' del gen de proinsulina humana y luego se clonaron en un vector adenovírico que se usó para transfectar hepatocitos. Como demuestran los Ejemplos a continuación, los GIRE proporcionan regulación transcripcional del ARNm de insulina en los hepatocitos en respuesta a concentraciones de glucosa fisiológicamente relevantes.

Secuencia promotora

Las construcciones también implican el uso de un promotor génico, preferentemente, un promotor de albúmina. El promotor de albúmina es un promotor específico de hepatocitos (hepático) y se utiliza para garantizar que la producción de insulina se restrinja solo a las células hepáticas. Por lo tanto, si parte de la construcción génica de insulina termina en otros órganos además del hígado, la construcción no se expresará. De manera adicional, diversos componentes y mecanismos necesarios para conferir capacidad de respuesta a la glucosa a la expresión de insulina usando construcciones génicas de la presente invención son endógenos a las células hepáticas. Como se ilustra en los Ejemplos en el presente documento, el promotor de albúmina de rata (184 pb), (Heard et al., Determinant of rat albumin promoter tissue specificity analyzed by an improved transient expression system. Mol Cell Biol 1987; 7: 2425) se generó mediante PCR usando una plantilla de ADN genómico de rata, como se describió anteriormente (Alam et al., Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. Transplantation 2002; 74:1781). El uso de la secuencia promotora de albúmina de rata en el ejemplo se proporciona únicamente con fines ilustrativos. Se espera que las construcciones que contienen un promotor de albúmina de otras especies, tal como de seres humanos, confieran propiedades similares a las construcciones.

Se puede obtener un promotor de albúmina mediante el uso de cebadores y amplificación por PCR después del examen de las SEQ ID NO: 1 y 2. La secuencia promotora se encuentra en los restos 380-706 de la SEQ ID NO: 1 y 147-474 de la SEQ ID NO: 2 y 380-707 de SEQ ID NO: 3.

En principio, cualquier promotor específico de células hepáticas constitutivamente activo capaz de una transcripción sostenida de nivel moderado a alto puede ser sustituido por el promotor de albúmina. Un ejemplo de dicho promotor es el inhibidor de alfa 1-antitripsina (Hafenrichter DG et al. Blood 1994; 84, 3394-404). Actualmente, de acuerdo con la base de datos de Cold Spring Harbor Laboratory, existen aproximadamente 300 promotores específicos del hígado conocidos.

Gen que codifica insulina con el sitio de la peptidasa modificado

Los vectores comprenden un gen que codifica insulina, preferentemente insulina humana o insulina de mamífero no humano, con un sitio de peptidasa modificado. Los genes de insulina de la presente invención también se divulgan en la SEQ ID NO: 1 en los restos 871-1203 y en la SEQ ID NO: 2 en los restos 919-1251.

En un aspecto, se puede desear tratar animales no humanos. Para garantizar que no se produzca una reacción inmunitaria a la insulina cuando los animales diabéticos, tal como gatos o perros, se tratan mediante terapia génica con insulina, se usaría insulina específica de la especie en el ADN del minicírculo para el tratamiento de animales. Por ejemplo, se usarían secuencias publicadas de insulina para gatos y perros (Kwok et al. 1983 J Biol Chem 258 2357-2363) para generar cebadores en 3' y 5' para amplificar la secuencia codificante de insulina a partir de preparaciones de ADNc hechas de ARN pancreático aislado de especies respectivas mediante técnicas estándar de biología molecular. Alternativamente, la secuencia codificante también se puede sintetizar químicamente. De manera similar, se puede desear sustituir secuencias de insulina de otros animales cuando se tratan esos animales. Estas secuencias están fácilmente disponibles.

El ADNc de la insulina humana se modificó en dos uniones de proinsulina donde el procesamiento proteolítico y la maduración de la insulina se produce mediante enzimas específicas que residen en las células beta pero que están ausentes en las células del hígado. La modificación en el péptido B y C de la insulina humana de KTRR a RTRK y en el péptido C y A de LQKR a RQKR hace que las dos uniones de insulina sean compatibles con la especificidad de escisión de la proteasa endógena, furina, de las células hepáticas. Estas modificaciones se describen en las siguientes publicaciones: Simonson GD, Groskreutz CM, Gorman CM, et al. Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. Hum Gene Ther 1996; 7: 71.; Groskreutz DJ, Sliwowski MX, Gorman CM. Genetically engineered pro-insulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. J Biol Chem 1994; 269: 6241.

Con respecto al uso de insulina no humana, todas las modificaciones a la secuencia de preproinsulina serán de naturaleza similar a las descritas para la insulina humana, en donde los sitios de reconocimiento/procesamiento de peptidasas que se encuentran en las células β (y el tejido neuroendocrino) se cambiarán a sitios que pueden ser procesados mediante proteasas comúnmente encontradas en el hígado (tal como furina) y otras células. Hay algunas diferencias de secuencia menores en la insulina de varias especies, pero el punto clave es retener la secuencia auténtica de insulina madura para la especie dada después del procesamiento.

El propósito de la mutación específica es cambiar la secuencia de aminoácidos de tal manera que el procesamiento proteolítico sea posible mediante la furina comúnmente encontrada. Existen múltiples codones para varios de los aminoácidos. Teóricamente, se puede alterar la secuencia de ADN usando un codón alternativo pero aún producir el mismo polipéptido.

Los solicitantes han utilizado con éxito estas modificaciones en un informe publicado (Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. Transplantation 2002; 74:1781). Un gen de insulina no modificado producirá proinsulina no procesada porque las enzimas específicas necesarias para la maduración mediante procesamiento proteolítico están ausentes en las células hepáticas. La proinsulina tiene una actividad biológica mínima de aproximadamente 100 veces menos que la insulina madura.

Se puede obtener un gen de insulina modificado mediante el uso de cebadores y la amplificación por PCR con conocimiento del gen de insulina en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

UTR en 3' de la albúmina

Se sabe que la UTR en 3' de la albúmina contribuye a la longevidad del ARNm de la albúmina en los hepatocitos. Esta secuencia se obtuvo a partir de un plásmido vector de expresión de Mirus (pMIR0375) pero esta secuencia también se puede amplificar mediante PCR usando ARNm de transcripción inversa del hígado. La secuencia UTR en 3' de la albúmina se divulga en la SEQ ID NO: 1 en 1204-2077 y en la SEQ ID NO: 2 en los restos 1252-2125.

Intrón de la HGH

Dos de las construcciones, TA4 y TA2, comprenden el intrón de la HGH. Se sabe que el intrón de la HGH se añade a la eficacia del procesamiento de ARNm y ayuda a producir cuantitativamente más ARNm. Hay varios otros intrones, tal como betaglobina, que cumplen una función similar en un grado variable. Sin embargo, se sabe que el intrón de la HGH funciona bien y se prefiere. El intrón de la HGH puede amplificarse mediante PCR a partir del plásmido pAAV-LacZ disponible comercialmente [Stratagene, La Jolla, CA]. La secuencia también se puede amplificar fácilmente mediante PCR usando ADN genómico como plantilla. La secuencia del intrón de la HGH se divulga en los restos 475-754 de la SEQ ID NO: 2 y 708-987 de la SEQ ID NO: 3.

Realización del minicírculo

Opcionalmente, el vector está en el formato "ADN en minicírculo". Este es un vector que prácticamente carece de

todas las secuencias de ADN que no están relacionadas con la expresión de insulina. El vector original de producción de ADN en minicírculo se obtuvo del laboratorio de Mark Kay, descrito en las siguientes publicaciones: Chen, ZY, He, CY, Ehrhardt, A y Kay, MA (2003). Los vectores de ADN en minicírculo desprovistos de ADN bacteriano dan como resultado una expresión transgénica persistente y de alto nivel *in vivo*. *Mol Ther* 8: 495-500, y Chen ZY, He CY, Kay MA (2005) mejoró la producción y la purificación del vector de ADN en minicírculo libre de la secuencia bacteriana del plásmido y capaz de la expresión transgénica persistente *in vivo*. *Human Gene Ther*, 16:126. Recientemente se publicó un método nuevamente revisado para producir fácilmente ADN en minicírculos (Kay MA, He C, Chen Z. A robust system for production of minicircle DNA vectors. 2010. *Nature Biotech* 28,1287). El vector y la *E. coli* necesarios para producir el minicírculo están disponibles comercialmente en System Biosciences (SBI), Mountain View, CA (systembio.com), y actualmente los utilizamos.

La presente divulgación de construcciones de expresión de insulina se ajusta al esquema de colocación generalmente aceptado y probado de varios elementos en relación entre sí. Por lo tanto, las construcciones de expresión génica se componen de potenciador de la AFP - inductor condicional - promotor - intrón 1 - gen - intrón 2 - terminación/UTR en 5'. En los presentes Ejemplos, los GIRE son los inductores condicionales y hay un potenciador traduccional insertado después del intrón de la HGH y antes del gen de insulina modificado. Después del gen de la insulina, el segundo intrón para el procesamiento eficaz de ARNm proviene de la albúmina seguido por la UTR en 3' de la albúmina.

Las Figuras 4, 5 y 10 divulgan la colocación preferida de elementos en construcciones génicas de la presente invención.

Método de la presente divulgación

En un aspecto, la presente divulgación es un vector, donde el vector comprende:

- i) un elemento regulador inducible por glucosa (GIRE);
- ii) un promotor específico del hígado;
- iii) un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado;
- iv) una región no traducida (UTR) en 3' de la albúmina;
- v) un intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH); y
- vi) un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

También se divulga un método para controlar los niveles de glucosa en sangre en un paciente mamífero (preferentemente un mamífero humano o no humano), que comprende las etapas de tratar a un mamífero con hepatocitos que se han modificado con un primer, segundo o tercer vector, como se ha descrito anteriormente. El primer vector comprende un potenciador del promotor, elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un gen que codifica insulina con sitio de peptidasa modificado y una UTR en 3' de albúmina y carece de un intrón de la HGH. El segundo vector comprende un intrón de la HGH, elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un gen que codifica insulina con sitio de peptidasa modificado y una UTR en 3' de albúmina y carece de un potenciador del promotor. El tercer vector comprende un intrón de la HGH, elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado, la UTR en 3' de la albúmina y el potenciador del promotor.

Se observaría los niveles de glucosa e insulina en sangre del mamífero después del tratamiento con el vector y se notaría que los niveles de glucosa o insulina en sangre del mamífero están controlados y son normales.

Para probar las presentes construcciones de expresión de insulina *ex vivo* en hepatocitos, las construcciones de insulina TA1, TA2 y TA4 se clonaron en un vector adenovírico, como se describió anteriormente (Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation* 2002; 74:1781.) Los hepatocitos de rata normales recién aislados se sembraron en placas de cultivo celular recubiertas con colágeno y se transfectaron con adenovirus que contenía la construcción génica de insulina. Se expusieron estas células a concentraciones de glucosa bajas (3,5 mM), normales (5,6 mM) y altas (27,5 mM). Se extrajeron alícuotas de medio a diversos intervalos de tiempo y se cuantificó mediante ELISA la insulina presente en el medio de cultivo. Los resultados mostraron que los hepatocitos transfectados con cada construcción de insulina producían insulina de manera dependiente de la concentración de glucosa (Figura 9). A la concentración de glucosa alta, la cantidad de producción de insulina fue de 4-10 veces mayor que a la concentración de glucosa baja.

Por "controlado", se quiere decir que el método se caracteriza preferentemente por un control estricto de la regulación de la glucosa. El control estricto se refiere a la observación empírica de la regulación de la glucosa en sí. En individuos no diabéticos, la glucosa en sangre vuelve a la normalidad a las 2 horas después de la comida. Antes de la presente invención, se hubiera anticipado que después de la corrección de la hiperglucemia en un mamífero en respuesta a la elevación en los niveles de glucosa en sangre, el ARNm de insulina preformado permanecería por un tiempo y continuaría produciendo insulina. Dependiendo de cuánto tiempo persista tal condición, se esperaría que el mamífero se volviera hipoglucémico. Sin embargo, los presentes resultados mostraron que los niveles de insulina en suero aumentaron poco después del aumento en los niveles de glucosa en sangre, como se había anticipado, pero los niveles de insulina no se mantuvieron altos por mucho tiempo y siguieron la curva de nivel de glucosa en sangre con

un retraso de aproximadamente 15-30 minutos (véase la Figura 8).

Normalmente, la presente invención proporciona que los niveles de insulina permanecerán dentro de 0,5 uU-100 uU/ml. (Esto es comparable a la cantidad máxima de insulina que se libera de los islotes normales bajo estimulación hiperglucémica de aproximadamente 100 uU/ml).

Normalmente, la concentración de glucosa en sangre se mantendrá dentro de 80-150 mg/dl después del tratamiento. El extremo superior se relaciona con un aumento temporal poco después de comer. Si la concentración de glucosa aumenta por encima de 150, el nivel no se mantiene en ese nivel por más de un corto período (30-60 minutos).

La diabetes mal controlada causa hiperlipidemia y la gravedad de la hiperlipidemia depende del grado de hiperglucemia. Las pruebas de función hepática se realizan por dos razones. La diabetes grave se asocia con un grado de respuestas inflamatorias sistémicas, incluida la elevación de los niveles séricos de algunas enzimas hepáticas. Los presentes datos proporcionan evidencia de que después de la terapia génica con insulina, es evidente una corrección en los niveles séricos de enzimas hepáticas. En segundo lugar, se sabe que el procedimiento de administración hidrodinámica causa un estrés transitorio al hígado, pero este daño es de corta duración. Los presentes datos respaldan estos hallazgos y afirman que no existe un riesgo a largo plazo asociado con la terapia génica en el contexto de la función hepática. De hecho, la terapia normaliza la función hepática, como lo demuestra la producción de albúmina.

En una realización de la presente invención, se corrige el perfil de lípidos y/o enzimas hepáticas del animal tratado. En una realización de la presente invención, el animal tendrá una prueba de lípidos/enzimas en donde la concentración plasmática de lípidos o enzimas hepáticas es equivalente o inferior a un control normal. "Control normal", se refiere a un animal que no es diabético. "Prueba de lípidos/enzimas" se refiere a una medición de triglicéridos en plasma, de una alanina transaminasa (AST), de un aspartato transaminasa (ALT) o una medición de albúmina en plasma. En otra realización de la invención, se esperaría ver una caída en el colesterol (mg/dl) de al menos un 20 % en comparación con un control diabético. Según una estimación conservadora, aproximadamente 1 semana puede ser suficiente para una corrección sustancial o normalización de la hiperlipidemia.

El método implica el tratamiento de un mamífero, preferentemente un paciente humano o un mamífero no humano, con los vectores de la presente divulgación.

La introducción de las presentes construcciones de expresión de insulina en las células hepáticas se puede lograr *in vivo* o *ex vivo*. En el primer método, la construcción génica se introducirá utilizando un ADN en minicírculo mediante el método hidrodinámico descrito en el presente documento, inyectando las nanopartículas de ADN en minicírculo condensadas como tal, o después de recubrir las nanopartículas con compuestos que se sabe que se dirigen a las células hepáticas. Alternativamente, las células hepáticas se recogerán del paciente a través de una biopsia, se expandirán en cultivo celular y se transfectarán con una construcción de la presente divulgación usando minicírculo o vectores víricos seguros tales como virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés) (ya utilizados en muchos ensayos clínicos).

Las células transfectadas se evaluarán para determinar su capacidad de producir insulina y modular la cantidad de producción de insulina en respuesta a los cambios en las concentraciones de glucosa. La cantidad apropiada de células para proporcionar la cantidad necesaria de insulina (asistida con información de mediciones *ex vivo*) se trasplantará al hígado del mamífero mediante guía radiológica y de ultrasonido. El método *ex vivo* permite una menor carga de vectores, así como la administración dirigida de genes.

La incorporación de andamios/regiones de unión a matriz (S/MAR, por sus siglas en inglés) que sirven como anclajes constitutivamente activos para el andamio nuclear (Wong SP et al. Gene Ther. 2011;18(1):82~7; Heng HH et al. J Cell Sci. 2004;117(Pt 7):999-1008; Lufino MM et al., Nucleic Acids Res. 2007;35(15):e98. PMID: 1976449) probablemente aumentará la supervivencia de los S/MAR (TA1m ~ S/MAR) que contienen minicírculos de ADN TA1 (TA1m) u otros minicírculos debido a la asociación de SAR con el andamio nuclear y también puede reducir el silenciamiento génico (Wong SP et al. Gene Ther. 2011; 18(1):82-7).

Los siguientes Ejemplos describen la administración de ADN al hígado de ratas mediante procedimientos hidrodinámicos (Zhang G. y col., Methods Mo/B/o/245:251-264, 2004; Zhang G. et al., Hum Gene Ther 8:1763-1772, 1997). La administración del ADN al hígado de mamíferos normalmente no se realizará por el método hidrodinámico descrito en los Ejemplos. Se emplearán otras alternativas, tales como las nanopartículas de ADN condensado que no requieren un gran volumen y alta presión. En una realización preferida, la regulación de glucosa adecuada durará al menos 2-4 semanas después del tratamiento con las construcciones.

La administración venosa hidrodinámica de ADN plasmídico desnudo ha llevado a la absorción y transducción génica exitosa de las células hepáticas (Sebestyen MG et al. Hum Gene Ther. 2007;18(3):269-85. PMID: 2268901; Wooddell CI et al. J Gene Med. 2008;10(5):551-63; Wooddell CI et al. Hum Gene Ther. 2011;22(7):889-903. PMID: 3135275). Este método se basa en una inyección intravenosa rápida de alto volumen (-10 % del peso corporal). Sin embargo, con la administración venosa hidrodinámica, gran parte del ADN se absorbe en el sistema venoso, particularmente en

los pulmones, antes de su administración al hígado. Como alternativa, uno puede inyectar los vectores en el sistema arterial, tal como la arteria femoral, que tiene una presión arterial sistólica de aproximadamente 120 mm/Hg. El vector restante llegará al hígado a través de la vena porta a 10-12 cm'H₂O. (La presión sanguínea generalmente se presenta en mm de mercurio (mm/Hg). La presión sanguínea venosa es más baja y, a veces, se usa una unidad basada en cm de agua (cm/H₂O). En general, la inyección intraarterial debería mejorar en gran medida la absorción de construcciones TA1m en comparación con la administración venosa hidrodinámica.

La inyección en la arteria femoral debería aumentar drásticamente la absorción hepática del vector y la transducción de los hepatocitos. Se espera que los animales tratados mantengan la normoglucemia durante más de 1 mes, incluso cuando se alimentan a demanda.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de construcciones

Se generaron construcciones génicas basadas en insulina humana que contenían varios elementos para modular la expresión con el objetivo de producir insulina biológicamente activa en respuesta a los cambios en los niveles de glucosa.

Cuatro construcciones de insulina designadas TA1, TA2, TA3 y TA4 contienen varios elementos en el orden que se muestra a continuación:

	Potenciador de AFP	3GIRE	Promotor de Alb	Intrón de HGH	Insulina humana	UTR en 3' de Alb
TA1	S	S	S	N	S	S
TA2	S	S	S	S	S	S
TA3	N	S	S	N	S	S
TA4	N	S	S	S	S	S

Potenciador de la AFP: Se usó potenciador de alfafetoproteína del vector Mirus pMIR0375.

SGIRE: 3 unidades de elementos reguladores inducibles por glucosa están conectados en tándem; las secuencias se basan en S14. S14 es un potenciador transcripcional sensible a la glucosa. Los elementos responsables de la mejora transcripcional dependiente de glucosa se han identificado en trabajos publicados: Shih H, Towie HC. Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene: Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. J Biol Chem 1994; 269: 9380.

Promotor de Alb: Promotor de albúmina (el promotor de albúmina se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico de rata, como se describe en la Patente de EE.UU. 6.352.857, la Patente de EE.UU. 6.933.133, la Patente de EE.UU. 7.425.443 y la siguiente publicación: Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. Transplantation 2002; 74:1781)

Intrón de la HGH: El intrón de la hormona de crecimiento humana se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pAAV-LacZ disponible comercialmente (Stratagene).

Insulina humana: La secuencia de ADNc de insulina humana se modificó en la unión B-C y C-A para la compatibilidad con la escisión de furina de modo que las células hepáticas son capaces de procesar la preproinsulina en insulina funcional.

UTR en 3' de Alb: Se usó la región no traducida en 3' de la albúmina a partir del vector Mirus pMIR0375. También se puede amplificar mediante PCR usando ARNm de transcripción inversa del hígado.

Las construcciones de expresión de insulina descritas anteriormente se incorporaron en adenovirus de replicación defectuosa para expresión transitoria para propósitos de prueba iniciales. La expresión de insulina en hepatocitos de rata, *ex vivo*, fue sensible a la glucosa y cada construcción produjo una cantidad significativamente mayor de insulina (4-12 veces mejor que las construcciones descritas anteriormente), Alam & Bollinger, Transplantation. 27 de diciembre de 2002;74(12):1781-7].

TA2 y TA3 también se probaron en la producción de insulina *ex vivo*. (Véase la Figura 9).

Inicialmente se incorporó TA1 en un vector de adenovirus para probar su capacidad para controlar la hiperglucemia en ratas que se hicieron diabéticas mediante el tratamiento con estreptozotocina (STZ, por sus siglas en inglés). Los resultados mostraron que dicho tratamiento corrigió completamente la hiperglucemia en ayunas, restableció la pérdida de peso causada por la diabetes a una tasa normal de aumento de peso y redujo significativamente la hiperglucemia posprandial.

Los vectores adenovíricos que contienen TA1-TA4 se probaron individualmente para determinar su capacidad para corregir la hiperglucemia diabética en ratas STZ. Los resultados mostraron una corrección completa de la hiperglucemia en ayunas y una corrección parcial de la hiperglucemia posprandial. El beneficio de un solo tratamiento de terapia génica sobre el metabolismo general y la prevención de la pérdida de peso corporal duró mucho más allá del tiempo de corrección completa de la hiperglucemia en ayunas. Durante el período de corrección completa de la hiperglucemia en ayunas, la tasa de aumento de peso en ratas diabéticas tratadas con las presentes construcciones génicas de insulina fue indistinguible de los controles normales.

Para mejorar la eficacia de la terapia génica a través de una mejor expresión génica mediante el aumento de los niveles y la duración de la expresión de insulina, se produjeron minicírculos de ADN que contienen solo las construcciones de expresión génica. Todas las construcciones de expresión génica de insulina anteriores se clonaron en un vector plasmídico p2<]C31 como se describió previamente (Chen et al., 2003, Mol Ther, 8, 495-500; Chen et al., 2005, Human Gene Ther, 16, 126-131). Este método publicado de Chen et al. se modificó sustancialmente para mejorar la pureza del ADN en minicírculos como se describe a continuación.

Alentados por los resultados de la expresión transitoria proporcionada por el vector adenovírico, se generó un vector plasmídico, conocido como "ADN en minicírculo", que está prácticamente desprovisto de todas las secuencias de ADN que no están relacionadas con la expresión de insulina. El minicírculo TA1 se introdujo en los hígados de ratas mediante un procedimiento hidrodinámico establecido (Zhang G. et al., Methods Mol Biol 245:251-264, 2004; Zhang G. et al., Hum Gene Ther 8:1763-1772, 1997). Los resultados obtenidos de ratas diabéticas STZ tratadas con ADN en minicírculo TA1 muestran una corrección completa de la hiperglucemia entre los animales alimentados a demanda (Figura 1) además de la restauración de la tasa de aumento de peso a la normalidad (Figura 2) y la corrección de la hiperglucemia en ayunas.

Las ratas diabéticas tratadas con minicírculo TA1 se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa mediante inyecciones intraperitoneales de 4 g/kg de glucosa. Los resultados de estos experimentos tuvieron una marcada similitud con las observaciones de ratas de control normales. El máximo de niveles elevados de glucosa en sangre apareció a los 15 minutos después de la inyección y la hiperglucemia se disipó en aproximadamente 60 minutos (Figura 8). El tiempo para corregir la hiperglucemia inducida por la inyección IP de glucosa de 4 g/kg es similar a la de los animales normales. Un aumento en la producción de insulina en respuesta a niveles elevados de glucosa sigue de cerca el aumento en los niveles de glucosa y la producción de insulina disminuye a medida que el nivel de glucosa se reduce progresivamente.

Para confirmar que la producción de insulina dependía de la glucosa, se midieron los niveles de insulina humana en plasma a intervalos de tiempo de 30 minutos y se descubrió que los niveles de insulina humana alcanzaron su punto máximo a los 30 minutos y disminuyeron relativamente rápido, esencialmente siguiendo el perfil de glucosa en sangre con un retraso de 15 minutos. Por lo tanto, hubo un retraso de aproximadamente 15 minutos entre los perfiles de glucosa en sangre y los niveles de insulina.

Dada la naturaleza de la transcripción inducida por glucosa del ARNm de insulina que da lugar a la insulina circulante, después de lograr la normoglucemia, la presencia continua de ARNm de insulina podría haber causado una secreción sostenida de altos niveles de insulina hasta que el ARNm se degradara. La reducción de los niveles de insulina en solo ~ 60 minutos a los niveles observados en los animales en ayunas antes de las inyecciones de glucosa es un resultado inesperado, aunque muy deseable.

Las modificaciones al método de producción de ADN en minicírculos publicado fueron útiles y necesarias para obtener ADN en minicírculos puro que estaba libre de ADN en minicírculos no procesado o parcialmente procesado detectable. Estas modificaciones implicaron la eliminación de una etapa de incubación de 2 horas, que se reivindicó necesaria para la digestión *in vivo* del círculo de ADN que consiste en las secuencias innecesarias del plásmido parental que se eliminaron del minicírculo que contiene el gen de interés. En la práctica, esta etapa fue solo parcialmente eficaz.

En el presente procedimiento, la eliminación de esta etapa de incubación de 2 horas no causó ningún cambio perceptible en la calidad o cantidad de ADN recuperado y el producto final estaba compuesto por una mezcla de ADN en minicírculo y el ADN plasmídico no procesado parental, así como el ADN plasmídico parcialmente procesado. La mezcla de ADN así producida se trató, *ex vivo*, con una enzima de restricción que podría cortar el plásmido parental pero no el minicírculo de ADN que contiene las presentes construcciones génicas de insulina. El producto de esta reacción se purificó mediante gradiente de densidad de equilibrio de CsCl para separar el ADN circular del ADN lineal.

El ADN en minicírculo de insulina TA1 se probó por su capacidad para corregir la hiperglucemia diabética en ratas diabéticas tratadas con STZ. Se volvieron diabéticos grupos de ratas mediante inyecciones intravenosas de estreptozotocina (100 mg/kg). El ADN en minicírculo de insulina TA1 se inyectó a través de la vena de la cola en ratas diabéticas de acuerdo con un método publicado previamente (método de administración hidrodinámica descrito por el grupo J. Wolff, Zhang G. et al., Methods Mol Biol 245:251-264, 2004; Zhang G. et al., Hum Gene Ther 8:1763-1772, 1997). Se inyectaron cuatro grupos de ratas diabéticas con las cantidades indicadas de ADN en minicírculo TA1 (1,0 pg, 0,75 pg, 0,5 pg y 0,025 pg por g de peso corporal). Los resultados se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

Esta es la primera vez que se ha podido corregir completamente los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas alimentadas a demanda (Figura 2) mediante terapia génica con insulina. Este tratamiento restableció completamente la tasa de aumento de peso en ratas diabéticas (Figura 3).

5 Ejemplo 2: Creación de construcciones adenovíricas

Con referencia a la Figura 12, las construcciones de insulina TA1 y TA4 se crearon en adenovirus y se inyectaron unidades formadoras de placas iguales en hígados de ratas, como se indica. TA1 y TA4 se usaron en condiciones idénticas. Ambos fueron capaces de corregir completamente la hiperglucemia en ayunas, como se muestra en la Figura 12. Sin embargo, los vectores no corrigieron completamente los niveles de glucosa en sangre en ratas alimentadas a demanda.

Con referencia a la Figura 13, se inyectó TA1 en adenovirus en hígados de rata como se indica. Hay que tener en cuenta que las ratas tratadas con TA1 recuperaron el peso inicialmente perdido debido a la diabetes y mantuvieron un peso mayor que las ratas diabéticas STZ.

Con referencia a la Figura 14, se inyectó TA1 o TA4 en adenovirus en hígados de grupos de ratas diabéticas, como se indica. Hay que tener en cuenta que tanto las ratas tratadas con TA1 como las tratadas con TA4 habían mantenido un mayor peso corporal que las ratas diabéticas STZ. La Figura 14 muestra un subconjunto de puntos de datos de la Figura 13, que representa 0-48 días. La información sobre la tasa de aumento de peso en varios grupos de ratas (que se muestra en el recuadro en la esquina superior izquierda) procede de los datos obtenidos 24 días después del tratamiento (d8-d31). La tasa de aumento de peso en ratas diabéticas tratadas con TA1 en adenovirus es igual a la de ratas de control normales, mientras que las ratas diabéticas no tratadas experimentaron una pérdida neta de peso a diario. La Figura 13 tiene muchos más puntos de datos, y los primeros días ocupan solo una pequeña porción del área y, por lo tanto, el grado de corrección en el aumento de peso puede ser algo difícil de apreciar. La Figura 14 muestra este aspecto más claramente.

Ejemplo 3: Evaluación de la insulina humana en suero de ratas diabéticas

Con referencia a la Figura 15, una comparación de la insulina humana en suero de rata muestra que los animales tratados con el ADN en minicírculo TA1 producen mayores cantidades de insulina en comparación con otros vectores plasmídicos (pTED110, TA1/pENTR). El plásmido pENTR contiene un gen de resistencia a la ampicilina que ha sido reemplazado por un gen de resistencia a la kanamicina en pTED110, y también se le ha añadido S/MAR; ambos tienen la construcción de insulina TA1. El minicírculo TA1 que contiene S/MAR produjo la mayor cantidad de insulina *in vivo*. El ELISA de insulina humana ultrasensible (Mercodia, Inc) tiene un límite de detección de 0,15-20 mU/l, como se anuncia. La tabla de la Figura 15 muestra la eficacia relativa *in vivo* de varios vectores utilizados para la terapia génica con insulina. Todos los vectores de insulina contenían el casete de expresión TA1. pENTR es un plásmido comercial que contiene un gen de resistencia a la ampicilina. El pTED es el plásmido modificado donde se ha reemplazado el gen de resistencia a la ampicilina con el gen de resistencia a la kanamicina para aumentar la supervivencia *in vivo* del vector en las células que no se dividen.

También se añadió S/MAR a pTED110 para aumentar la supervivencia del vector en las células en división y, en cierto grado, aumentar la expresión general. Los datos están de acuerdo con las presentes expectativas de diseño vectorial.

Finalmente, cuando se eliminaron secuencias extrañas y se utilizaron construcciones génicas de insulina como moléculas de ADN en minicírculos, los niveles de expresión de insulina aumentaron significativamente, más aún cuando se incluyó S/MAR en el minicírculo. En los cuatro conjuntos de experimentos, la equivalencia molar de TA1 se mantuvo a un nivel constante.

La tabla (Figura 15) junto con los datos obtenidos de la transducción mediada por adenovirus *ex vivo* (Figura 9) e *in vivo* (Figura 12 y Figura 13, Figura 14 y Figura 17) proporciona la prueba de que los casetes de expresión de insulina son capaces de producir insulina dependiente de glucosa, según lo previsto. Sin embargo, la magnitud y la longevidad de la expresión de insulina depende del vector empleado para administrar los casetes de expresión de insulina. Se espera que estos casetes de expresión de insulina sean fácilmente adaptables para aprovechar los nuevos vectores desarrollados para tener mejores características para la terapia génica, tal como la facilidad de administración, el nivel de expresión y la longevidad de la expresión.

Ejemplo 4: Segundo tratamiento con TA1M

Con referencia a la Figura 16, un segundo tratamiento con ADN en minicírculo TA1 corrige la elevación gradual de la glucosa en sangre en ayunas a un nivel normal.

La Figura 1 divulga datos que son relevantes para la información presentada en la Figura 16. Como la información en dos figuras proviene de diferentes estudios, los puntos de datos individuales no son idénticos, pero la tendencia es la misma. Se debe referirse a la curva correspondiente al uso de 1,0 pg/g de ADN en minicírculo TA1 en la Figura 1 para comparación. La Figura 16 muestra que parece posible corregir la hiperglucemia mediante un segundo tratamiento a

medida que disminuye el efecto del primer tratamiento.

Ejemplo 5: Hepatocitos procedentes de las células madre de Fluman

- 5 Con referencia a la Figura 17, los hepatocitos procedían de células madre embrionarias humanas (hES, por sus siglas en inglés) y células pluripotentes inducidas por adultos humanos (iPS, por sus siglas en inglés) como se describe en Si-Tayeb et al 2010. Hepatology 51(1):297-305. PMID: 2946078 y fueron transducidos con TA1 en adenovirus, ex vivo. Se mantuvieron tres placas de cultivo celular en medio con bajo contenido de glucosa (3,5 mM), y tres placas se mantuvieron en alto contenido de glucosa (27,5 mM). Los hepatocitos de rata normales recién preparados se trataron de manera similar. Los matraces que contenían hepatocitos procedentes de células madre eran confluentes con las células, mientras que las placas primarias de hepatocitos de rata eran -60 % confluentes.

Los resultados (Figura 17) muestran una producción consistente de insulina dependiente de glucosa en hepatocitos embrionarios y procedentes de células pluripotentes inducidos.

Ejemplo 6: Examen del peso de las ratas después del tratamiento con vectores en minicirculo

- Con referencia a la Figura 18, a los grupos de ratas diabéticas (número mínimo de ratas en un grupo = 5) se les inyectó el ADN en minicirculo de insulina indicado, TA1, TA2 o TA3, a través de las venas de la cola. Se muestran los pesos corporales en ayunas (media $\pm$ D.E.) de las ratas. La normalización en la tasa de aumento de peso es similar cuando se utilizó Ta1m o Ta2m, mientras que TA3m fue menos eficaz.

Ejemplo 7: Evaluación de perfiles lipídicos

- 25 Dos grupos de ratas se volvieron diabéticos mediante tratamiento intravenoso con estreptozotocina. Un grupo de ratas diabéticas (n = 5) se trató con 1 pg de ADN en minicirculo TA1/g de peso corporal del animal. El segundo grupo de ratas diabéticas se utilizó como control no tratado. Se incluyó un tercer grupo de ratas normales como controles sanos de la misma edad. Se extrajo sangre de cada animal experimental después de 10 días, y se analizó el contenido de lípidos y varios marcadores de daño hepático y función hepática en el plasma, como se muestra en la tabla siguiente:

Grupos de animales	Triglicéridos (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	Aspartato Transaminasa	Alanina Transaminasa	Fosfatasa Alcalina	Albúmina en plasma
Tratadas con TA1m	53 $\pm$ 34	141 $\pm$ 15	302 $\pm$ 33	77 $\pm$ 40	210 $\pm$ 95	3,4 $\pm$ 0,2
Diabéticas	704 $\pm$ 313	191 $\pm$ 36	617 $\pm$ 349	152 $\pm$ 75	423 $\pm$ 73	2,5 $\pm$ 0,2
Normal	100 $\pm$ 14	129 $\pm$ 6	504 $\pm$ 100	106 $\pm$ 16	172 $\pm$ 55	3,4 $\pm$ 0,1

El tratamiento con TA1m corrigió todas las deficiencias causadas por la diabetes no controlada. Por lo tanto, los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma de ratas tratadas se invirtieron a niveles normales. Asimismo, los marcadores de función hepática mostraron una mejora y los niveles reducidos de albúmina en ratas diabéticas volvieron a la normalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION

<120> TERAPIA GÉNICA CON INSULINA BASADA EN HEPATOCITOS PARA LA DIABETES

<130> 960296.01414

<140> PCT/US12/41099

<141> 06/06/2012

<150> US 61/494.134

<151> 07/06/2011

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2077

<212> ADN

<213> Artificial

	<220> <223> Construcción de expresión TA1	
5	<220> <221> Potenciador de alfafetoproteína <222> (15)..(265)	
10	<220> <221> Elementos reguladores inducibles por glucosa <222> (279)..(369)	
15	<220> <221> Secuencia promotora de la albúmina <222> (380)..(706)	
20	<220> <221> Potenciador traduccional del VEGF <222> (707)..(870)	
25	<220> <221> Gen que codifica la insulina humana con uniones peptídicas modificadas de B-C y C-A para la compatibilidad con furina <222> (871)..(1203)	
30	<220> <221> UTR en 3' de la albúmina <222> (1204)..(2077)	
	<400> 1	
	ccgccccctt caccaagatc tttttgatgg cagagttcag tttaccgggt cacattgtac	60
	ctgggaagat tcaaggattt atggaaaaag tcaacaacag gagtcagagc agccggaaaa	120
	gcatggactc tgtacttagg actgcgcttt gagcaatggc acagcaagct ttaaccctgt	180
	ttgcagtcag cacacaaact gtggttcaaa gctccacttt atctcttctt gtggaattca	240
	gatatcagat cagttttaaac cttgcggccg ccagttctca cgtggtggcc acgtgcttgg	300

ES 2 774 491 T3

gcacgccagt tctcacgtgg tggccacgtg cttgggcacg aattccagtt ctcacgtggt 360
ggccacgtgc ttggggcactc tagtgctcaa atgggagaca aagagattaa gctcttatgt 420
aaaatttgct gttttacata actttaatga atggacaaag tcttgtgcat gggggtgggg 480
gtgggggttag aggggaacag ctccagatgg caaacatacg caagggattt agtcaaacaa 540
ctttttggca aagatggtat gattttgtaa tggggtagga accaatgaaa tgcgaggtaa 600
gtatggttaa taatctacag ttattggtta aagaagtata ttagagcgag tctttctgca 660
cacagatcac cttcctatca accccactag cctctggcaa aggtaccagc gcagaggctt 720
ggggcagccg agcggcagcc agggccccggc ccgggcctcg gttccagaag ggagaggagc 780
ccgccaaggc gcgcaagaga gcgggctgcc tcgcagtccg agccggagag ggagcgcgag 840
ccgcgccggc cccggacggc ctccgaaacc atggccctgt ggatgcgcct cctgcccctg 900
ctggcgctgc tggccctctg gggacctgac ccagccgcag cctttgtgaa ccaacacctg 960
tgcggctcac acctggtgga agctctctac ctagtgtgcg gggaacgagg cttcttctac 1020
acaccagga ccaagcggga ggcagaggac ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggcggg 1080
ggcctggtg caggcagcct gcagcccttg gccctggagg ggtcccggca gaagcgtggc 1140
attgtggaac aatgctgtac cagcatctgc tccctctacc agctggagaa ctactgcaac 1200
tagacgcagc ctgcaggcag cgtcgagtaa catcacattt aaaagcatct caggtaacta 1260
tattttgaat tttttaaaaa agtaactata atagttatta ttaaaatagc aaagattgac 1320
catttccaag agccatatag accagcaccg accactattc taaactatth atgtatgtaa 1380
atattagctt ttaaaattct caaaatagtt gctgagttgg gaaccactat tatttctatc 1440
gattcagcag ccgtaagtct aggacaggct taaattgttt tcaactggtg aaattgcaga 1500
aagatgatct aagtaatttg gcatttatth taataggtht gaaaaacaca tgccatttht 1560
caaataagac ttatattht cctthttht ttcagcctac catgagaata agagaaagaa 1620
aatgaagatc aaaagcttat tcatctgtht ttctthtctg ttggtgtaaa gccaacaccc 1680
tgtctaaaaa acataaattt cthtaatcat thtgcctctt ttctctgtgc thcaattht 1740
aaaaaatgga aagaatctaa tagagtggta cagcactgth atththtcaa gatgtgtgth 1800
tattctgaaa attctgtagg thctgtggaa gthccagtht tctctcttat tccacttctg 1860
tagaggattt ctagthtctt gtgggctaat taaataaatc attaatctc thctaagtht 1920
tggtattata acattcaaaa taatatttht acattatgat aattctgaat aaaagaacaa 1980
aaacatggt ataggtaagg aatataaaac atggcttht ccttagaaaa acaattctt 2040
aaattcatat ggaatcaaaa aagagcctgc aagggtg 2077

<210> 2
<211> 2125

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220> <223> Construcción de expresión TA2	
10	<220> <221> Elementos reguladores inducibles por glucosa <222> (46)..(136)	
15	<220> <221> Secuencia promotora de la albúmina <222> (147)..(474)	
20	<220> <221> Intrón del HGH <222> (475)..(754)	
25	<220> <221> Potenciador traduccional del VEGF <222> (755)..(918)	
30	<220> <221> Gen que codifica la insulina humana con uniones peptídicas modificadas de B-C y C-A para la compatibilidad con furina <222> (919)..(1251)	
	<220> <221> UTR en 3' de la albúmina <222> (1252)..(2125)	
	<400> 2	
	ccgccccctt caccatggc tcgacagatc ggggcccga gttctcacgt ggtggccacg	60
	tgcttgggca cgccagttct cacgtggtgg ccacgtgctt gggcacgaat tccagttctc	120
	acgtggtggc cacgtgcttg ggcactctag tgctcaaagt ggagacaaag agattaagct	180
	cttatgtaaa atttgctgtt ttacataact ttaatgaatg gacaaagtct tgtgcatggg	240
	ggtgggggtg gggtagagg ggaacagctc cagatggcaa acatacgcaa gggatttagt	300
	caaacaactt tttggcaaag atggtatgat tttgtaatgg ggtaggaacc aatgaaatgc	360
	gaggtaagta tggtaataa tctacagtta ttggttaaag aagtatatta gagcgagtct	420
	ttctgcacac agatcacctt cctatcaacc ccactagcct ctggcaaagg taccttcgaa	480
	caggtaagcg cccctaaaat ccctttggca caatgtgtcc tgaggggaga ggcagcgacc	540
	tgtagatggg acggggggcac taaccctcag ggtttggggt tctgaatgtg agtatcgcca	600
	tctaagccca gtatttggcc aatctcagaa agctcctggc tccctggagg atggagagag	660
	aaaaacaaac agctcctgga gcaggagag tggttggcctc ttgctctccg gctccctctg	720
	ttgccctctg gtttctcccc aggttcgaag gtaccagcgc agaggcttg ggcagccgag	780
	cggcagccag gccccggccc gggcctcggg tccagaaggg agaggagccc gccaaggcgc	840
35	gcaagagagc gggctgcctc gcagtcagag ccggagaggg agcgcgagcc gcgcccggccc	900

cggacggcct ccgaaacccat ggccctgtgg atgcgcctcc tgccctgtct ggcgtgtctg 960
 gccctctggg gacctgaccc agccgcagcc tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac 1020
 ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg gaacgaggct tcttctacac acccaggacc 1080
 aagcgggagg cagaggacct gcaggtgggg caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca 1140
 ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg tcccggcaga agcgtggcat tgtggaacaa 1200
 tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag ctggagaact actgcaacta gacgcagcct 1260
 gcaggcagcg tcgagtaaca tcacatttaa aagcatctca ggtaactata ttttgaattt 1320
 tttaaaaaag taactataat agttattatt aaaatagcaa agattgacca tttccaagag 1380
 ccatatagac cagcaccgac cactattcta aactatttat gtatgtaaat attagctttt 1440
 aaaattctca aaatagttgc tgagttggga accactatta tttctatcga ttcagcagcc 1500
 gtaagtctag gacaggctta aattgttttc actggtgtaa attgcagaaa gatgatctaa 1560
 gtaatttggc atttatttta ataggtttga aaaacacatg ccattttaca aataagactt 1620
 atatttgtcc ttttgttttt cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 1680
 aagcttattc atctgttttt ctttttcggt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 1740
 ataaatttct ttaatcattt tgccctcttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 1800
 gaatctaata gagtgggtaca gcactgttat ttttcaaaga tgtgttgcta tcctgaaaat 1860
 tctgtagggt ctgtggaagt tccagtgttc tctcttattc cacttcggta gaggatttct 1920
 agtttcttgt gggctaatta aataaatcat taatactctt ctaagttatg gattataaac 1980
 attcaaaata atattttgac attatgataa ttctgaataa aagaacaaaa accatggtat 2040
 aggtaaggaa tataaaacat ggcttttacc ttagaaaaaa caattctaaa attcatatgg 2100
 aatcaaaaaa gagcctgcaa ggggtg 2125

<210> 3
 <211> 2358
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción de expresión TA4

<220>
 <221> Potenciador de alfafetoproteína (AFP)
 <222> (15)..(265)

<220>
 <221> Elementos reguladores inducibles por glucosa
 <222> (279)..(369)

<220>
 <221> Secuencia promotora de la albúmina
 <222> (380)..(707)

<220>

<221> Intrón del HGH
<222> (708)..(987)

5 <220>
<221> Potenciador traduccional del VEGF
<222> (988)..(1151)

10 <220>
<221> Gen que codifica la insulina humana con uniones peptídicas modificadas de B-C y C-A para la compatibilidad con furina
<222> (1152)..(1484)

15 <220>
<221> UTR en 3' de la albúmina
<222> (1485)..(2358)

<400> 3

ccgccccctt	caccaagatc	tttttgatgg	cagagttcag	tttaccgggt	cacattgtac	60
ctgggaagat	tcaaggattt	atggaaaaag	tcaacaacag	gagtcagagc	agccggaaaa	120
gcatggactc	tgtacttagg	actgcgcttt	gagcaatggc	acagcaagct	ttaaccctgt	180
ttgcagtcag	cacacaaact	gtggttcaaa	gctccacttt	atctcttctt	gtggaattca	240
gatatcagat	cagttttaa	cttgcgggccg	ccagttctca	cgtgggtggcc	acgtgcttgg	300
gcacgccagt	tctcacgtgg	tggccacgtg	cttgggcacg	aattccagtt	ctcacgtggg	360
ggccacgtgc	ttgggcactc	tagtgctcaa	atgggagaca	aagagattaa	gctcttatgt	420
aaaatttgct	gttttacata	actttaatga	atggacaaag	tcttgtgcat	gggggtgggg	480
gtgggggttag	aggggaacag	ctccagatgg	caaacatacg	caagggattt	agtcaaacaa	540
ctttttggca	aagatggtat	gattttgtaa	tggggtagga	accaatgaaa	tgcgaggtaa	600
gtatggttaa	taatctacag	ttattgggtta	aagaagtata	ttagagcgag	tctttctgca	660
cacagatcac	cttcctatca	acccacttag	cctctggcaa	aggtaccttc	gaacaggtaa	720
gcgcccctaa	aatccctttg	gcacaatgtg	tcctgagggg	agaggcagcg	acctgtagat	780
gggacggggg	cactaaccct	cagggttttg	ggttctgaat	gtgagtatcg	ccatctaagc	840
ccagtatttg	gccaatctca	gaaagctcct	ggctccctgg	aggatggaga	gagaaaaaca	900
aacagctcct	ggagcaggga	gagtggttgg	ctcttgctct	ccggctccct	ctgttgccct	960
ctggtttctc	cccaggttcg	aaggtaccag	cgcagaggct	tggggcagcc	gagcggcagc	1020
caggccccgg	cccgggcctc	ggttccagaa	gggagaggag	cccgccaaag	cgcgcaagag	1080
agcgggctgc	ctcgcagtcc	gagccggaga	gggagcgcga	gccgcgccgg	ccccggacgg	1140
cctccgaaac	catggccctg	tggatgcgcc	tcctgcccct	gctggcgctg	ctggccctct	1200
ggggacctga	cccagccgca	gcctttgtga	accaacacct	gtgcggctca	cacctggtgg	1260
aagctctcta	cctagtgtgc	ggggaacgag	gcttcttcta	cacaccagc	accaagcggg	1320

ES 2 774 491 T3

aggcagagga cctgcaggtg gggcaggtgg agctgggcgg gggccctggt gcaggcagcc	1380
tgcagccctt gggcctggag ggggtcccggc agaagcgtgg cattgtggaa caatgctgta	1440
ccagcatctg ctccctctac cagctggaga actactgcaa ctagacgcag cctgcaggca	1500
gcgtcgagta acatcacatt taaaagcatc tcaggtaact atattttgaa ttttttaaaa	1560
aagtaactat aatagttatt attaaaatag caaagattga ccattttcaa gagccatata	1620
gaccagcacc gaccactatt ctaaaactatt tatgtatgta aatattagct tttaaaattc	1680
tcaaaatagt tgctgagttg ggaaccacta ttattttctat cgattcagca gccgtaagtc	1740
taggacaggc ttaaattggt ttactggtg taaattgcag aaagatgatc taagtaattt	1800
ggcattttatt ttaatagggt tgaaaaacac atgccatttt acaaataaga cttatatattg	1860
tccttttggt tttcagccta ccatgagaat aagagaaaga aaatgaagat caaaagctta	1920
ttcatctggt tttctttttc gttggtgtaa agccaacacc ctgtctaaaa aacataaatt	1980
tctttaatca ttttgctct tttctctgtg cttcaattaa taaaaaatgg aaagaatcta	2040
atagagtggg acagcactgt tatttttcaa agatgtggtg ctatcctgaa aattctgtag	2100
gttctgtgga agttccagtg ttctctctta ttccacttcg gtagaggatt tctagtttct	2160
tgtgggctaa ttaaataaat cattaatact cttctaagtt atggattata aacattcaaa	2220
ataatatttt gacattatga taattctgaa taaaagaaca aaaaccatgg tataggtaag	2280
gaatataaaa catggctttt accttagaaa aaacaattct aaaattcata tggaatcaaa	2340
aaagagcctg caagggtg	2358

REIVINDICACIONES

1. Un vector para su uso en un método para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, donde el método comprende tratar a un mamífero con el vector, donde el vector comprende:
5 i) un elemento regulador inducible por glucosa (GIRE);
 ii) un promotor específico del hígado;
 iii) un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado;
 iv) una región no traducida (UTR) en 3' de la albúmina;
10 v) un intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH); y
 vi) un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
2. Un vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además observar los niveles de insulina del mamífero.
- 15 3. Un vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde:
 (a) el vector comprende un potenciador del promotor; y/o
 (b) el vector requiere de 1-5 GIRE.
- 20 4. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el promotor específico hepático es un promotor de albúmina.
- 25 5. Un vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el promotor de albúmina se selecciona del grupo que consiste en los restos 147-474 de la SEQ ID NO: 2.
- 30 6. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
 (a) el gen que codifica la insulina con un sitio de peptidasa modificado es los restos 919-1251 de la SEQ ID NO: 2;
 (b) el gen que codifica la insulina con un sitio de peptidasa modificado es ADNc de insulina humana modificado; o
 (c) el ADNc de insulina humana modificado se modifica en el péptido B y C de la insulina humana de KRR a RTKR y en el péptido C y A de LQKR a RQKR.
- 35 7. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la UTR en 3' de la albúmina es los restos 1252-2125 de la SEQ ID NO: 2.
- 40 8. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH) es los restos 708-987 de la SEQ ID NO: 3.
- 45 9. Un vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde:
 (a) el potenciador del promotor es el potenciador de la alfafetoproteína; o
 (b) el potenciador del promotor es los restos 15-265 de la SEQ ID NO: 1.
- 50 10. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en donde el potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se selecciona del grupo que consiste en los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1 y los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2.
- 55 11. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa de tratamiento comprende exponer al mamífero a un virus infeccioso para el mamífero, en donde el virus comprende el vector y por lo cual el virus infecta al mamífero.
- 60 12. Un vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el virus es adenovirus.
- 65 13. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la exposición comprende:
 (a) exponer un hepatocito del mamífero al virus;
 (b) inyección; o
 (c) inyección vascular.
14. Un vector adenovírico para su uso en un método para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, donde el método comprende tratar a un mamífero con un vector adenovírico, comprendiendo el vector adenovírico:
 i) un elemento regulador inducible por glucosa (GIRE);
 ii) un promotor específico del hígado;

- iii) un gen que codifica insulina con un sitio de peptidasa modificado;
- iv) una región no traducida (UTR) en 3' de la albúmina; y
- v) un potenciador traduccional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y
- vi) un potenciador transcripcional, un intrón de la HGH o ambos.

5

Efecto del tratamiento con minicirculo TA1 sobre la glucosa en sangre en ayunas

Dosis de minicirculo TA1: 1,0 µg/g, 0,75 µg/g, 0,5 µg/g y 0,25 µg/g

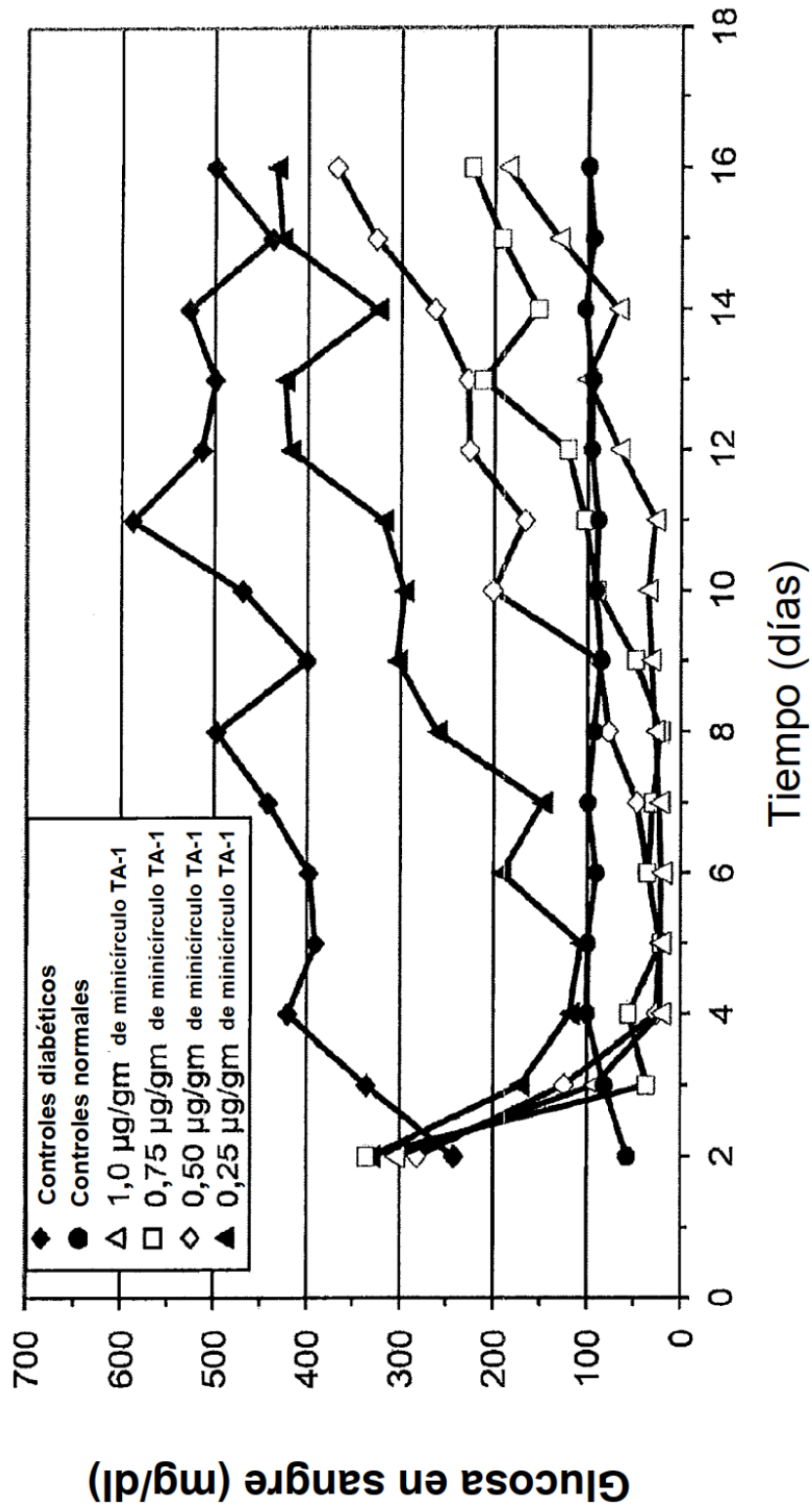


Figura 1

Efecto del tratamiento con minicirculo TA1 sobre la glucosa en sangre alimentada a demanda
Dosis de minicirculo TA1: 1,0 µg/g, 0,75 µg/g, 0,5 µg/g, 0,25 µg/g

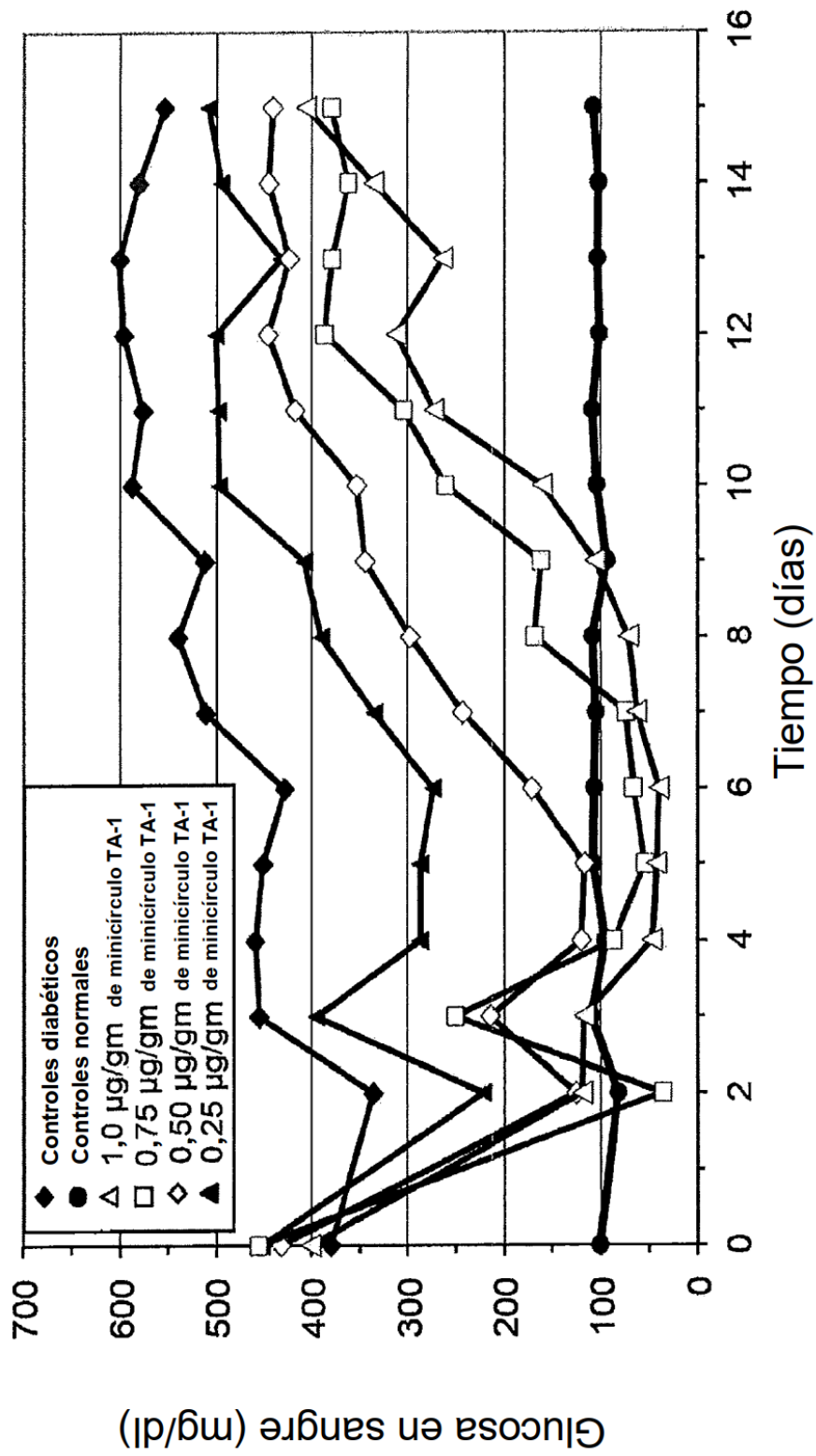


Figura 2

Efecto del tratamiento con minicírculo TA1 sobre el peso corporal en ayunas

Dosis de minicírculo TA1: 1,0 µg/g, 0,75 µg/g, 0,5 µg/g y 0,25 µg/g

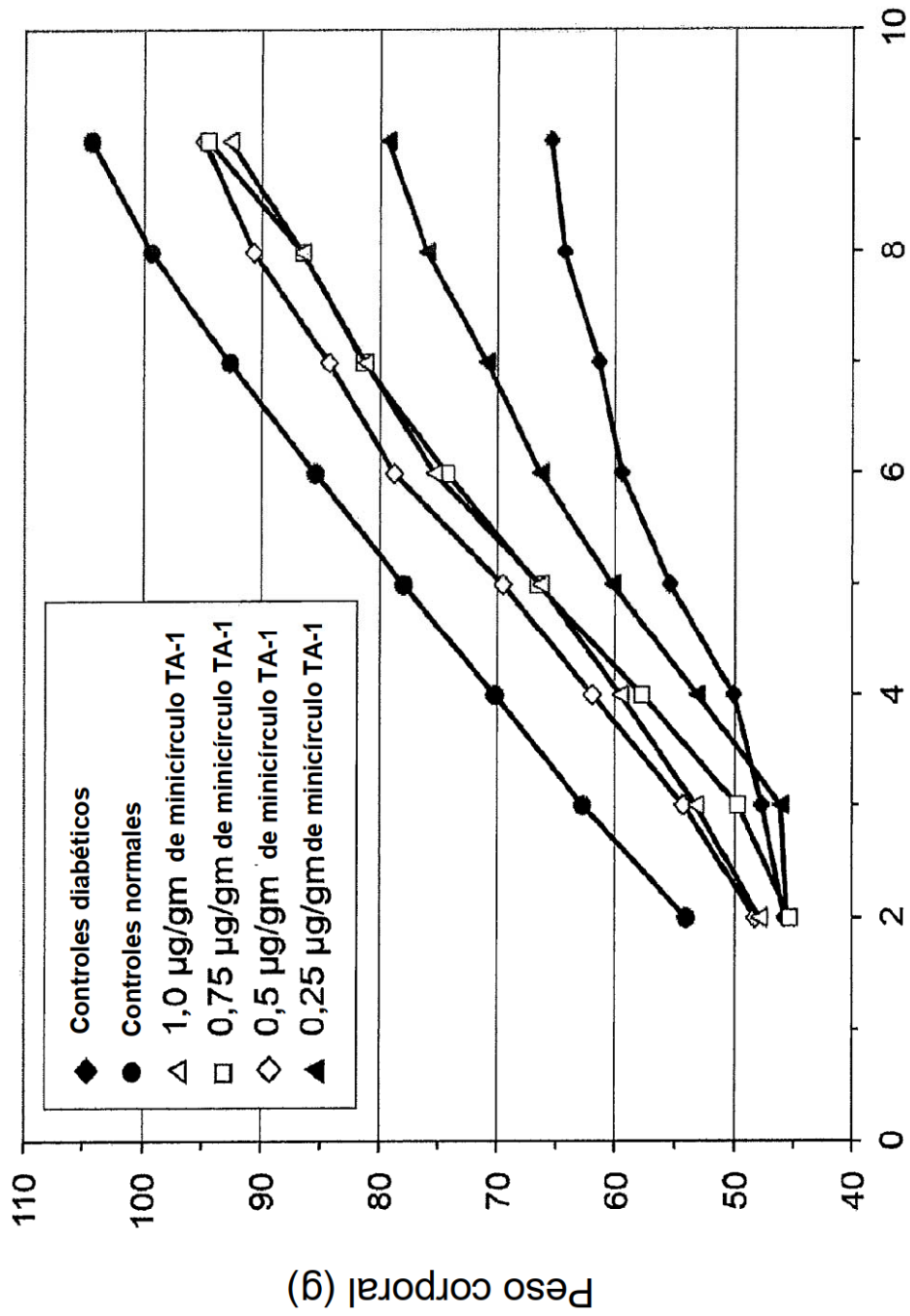


Figura 3

Casete de expresión TA1 (1 - 2067)

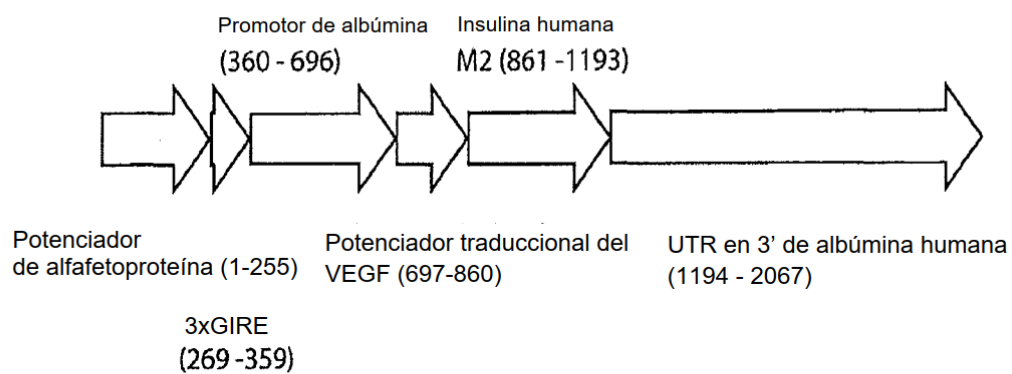


Figura 4

Casete de expresión TA4 (1 - 2115)

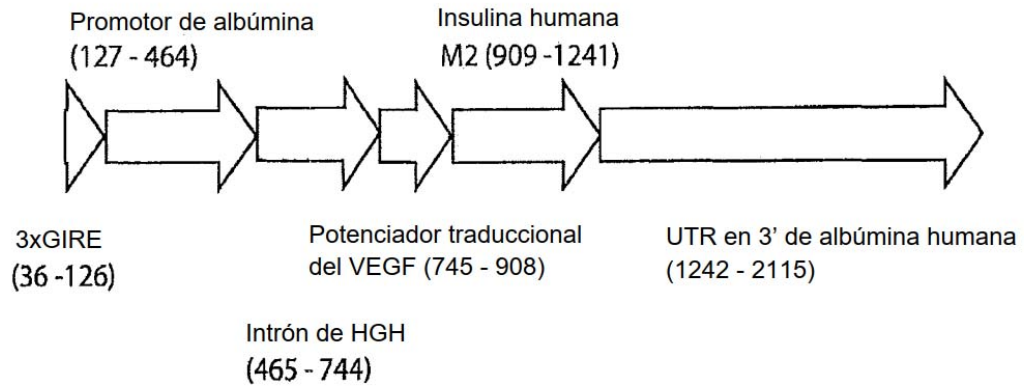


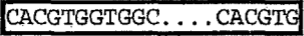
Figura 5

Casete de expresión TA1 (SEQ ID NO: 1)

CCGCCCCCTTACCAAGATCTTTTGTATGGCAGAGTTTACGTTTACCGGGTCACATTGTACCTGGGAAGATT
 CAAGGATTTATGGAAAAAGTCAACAACAGGAGTCAGAGCAGCCGGAAGCATGGACTCTGTACTTAGGAC
 TCGCGCTTTGAGCAATGGCACAGCAAGCTTTAACCTGTTTGCAGTCAGCACACAACTGTGGTTCAAAGCT
 CCACTTTATCTCTTCTGTGGAATTGagatatcagatcagtttaaAccttgcGGCCGCCAGTTCTCACGTG
 GTGGCCACGTGCTTGGGCACGCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACGAATTCAGTTCTCAC
 GTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACCTtagtgctcaaatgggagacaaagagattaagctctTatgtaaaatt
 tgctgttttacataaactttaatgaatggacaaagtcttgTgcatgggggtgggggtgggggttagaggggaa
 cagctccagatggcaaacatacgcaagggaatttagtcaaacacttttggcaagatggatgattTgt
 aatggggttaggaaccaatgaaatgcgaggttaagtatggttaataatcTcacagttattgggttaagaagtat
 attagagcgagtcttctgcacacagAtcaccttctatcaacccactagcctctggcaaggtacCagc
 gcagaGgcttggggcagccgagcggcagccaggccccggcccgggcctcggttccAgaagggagaggagcc
 cgcaagggcgcaagagagcgggtgcctcgcaGtccgagcggagagggagcgcgagccgcgcggcccc
 cggacggcctccgaaaccATGGCCCTGTGGATGGCCCTCTGCGCTGCTGGCCCTGCTGGCCCTGTGGG
 ACCTGACCCAGCCCGAGCTTTGTGAACCAAGACCTGTGCGCTCACACCTGCTGGAAGCTCTGTACCTAG
 TGTGGGGGAACCAAGCTTCTCTACACACCCAGGACCaagGGGAGGCAGAGCACTGCAGCTGGGCGAG
 CTGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGTCAGGAGCTGTGAGCCCTTGGCCCTGGAAGGGTCCCGGAGAGCCG
 TGGCATTTGCGAACAATGCTGTAGCAGCATCTGCTCCCTCTACAGCTGGAGAACTACTGCACCTAGACGC
 AGCCTGCAGGCAGCGTCGAGTAACATCACATTTAAAAGCATCTCAGGTAACATATATTTTGAATTTTTTAAA
 AAAGTAAC'TATAATAGTTATTATTTAAATAGCAAAGATTGACCATTTCCAAGAGCCATATAGACCAGCACC
 GACCACTATTCTAACTATTTATGTATGTAAATATTAGCTTTTAAAATTCTCAAAATAGTTGCTGAGTTGG
 GAACCACTATTATTTCTATCGATTGAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTGTTTTCTACTGGTGTA
 AATTGCAGAAAGATGATCTAAGTAATTTGGCATTATTTTAAATAGGTTTGAAGAAACACATGCCATTTTACA
 AATAAGACTTATATTTGTCTCTTTTGTCTTTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAA
 AGCTTATTCTATCTGTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTT
 AATCATTTTGCCCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAAATCTAATAGAGTGGTACAGCA
 CTGTTATTTTCAAAGATGTGTTGCTATCCTGAAAATTCTGTAGGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTCTCTCT
 TTATTCACCTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTGTGGGCTAATTAAATAAATCATTAACTCTTCTAAG
 TTATGGATTATAACATTCAAAATAATATTTTGACATTATGATAATTCTGAATAAAAGAACAAAAACCATG
 GTATAGGTAAGGAATATAAAACATGGCTTTTACCTTAGAAAAACAATTCTAAATTCATATGGAATCAAA
 AAAGAGCCTGCAAGGGTG

Potenciador de alfafetoproteína: AAGAT...ttgc

Figura 6

GIRE: 

Promotor de albúmina: 

Potenciador traduccional de VEGF: Cag...aaacc

Secuencia codificante del gen de la insulina humana con mutaciones para compatibilidad con furina:



Región no traducida en 3' de albúmina humana: secuencia más allá del codón de terminación



Figura 6 (continuación)

Casete de expresión TA4 (SEQ ID NO: 2)

CCGCCCCCTTcaccCATGGCTCGACAGATCgcGGCCGCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCAC

GCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACGAATTCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGG

CACTctagtgcctcaaagggagacaaagagattaagctctTatgtaaaatttgctgttttacataacttta

atgaatggacaaagtcttgTgcatgggggtgggggtggggtagaggggaacagctccagatggcaaacat

acgcaagggtatttagtcaaacaactttttggcaaagatggtagattTgtaatggggtaggaaccaatga

aatgagggtaagtatggtaataatcTcacgttattgggttaagaagtatattagagcgagtcctttctgc

acacagAtcaccttcctatcaacccactagcctctggcaaaggtagcTTCGAACAGGTAAAGCGCCCTAA

AATCCCTTGGCACAATGTGTCTGAGGGGAGAGGCAGCGACCTGTAGATGGGACGGGGGCACTAACCCCTC

AGGGTTTGGGGTTCTGAATGTGAGTATCGCCATCTAAGCCCAGTATTTGGCCAATCTCAGAAAGCTCCTGG

CTCCCTGGAGGATGGAGAGAGAAAAACAAACAGCTCCTGGAGCAGGGAGAGTGTGGCCTCTTGCTCTCCG

GCTCCCTCTGTTGGCCCTCTGGTTTCTCCCCAGTTTCGAaggtagcagcgagagGgcttggggcagcgagc

ggcagccaggcccccgccccgggctcggttccAgaaggagaggagcccgccaaggcgcgcaagagagcgg

gctgcctcgcaGtccgagccggagagggagcgcgagccgcgccccggacggcctccgaaaccATGGC

CCTGTGATGGCGCTCCTGCCCCCTGCTGGGGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAAGCTTG

TGAACCAAGACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAGCTCTCTACCTAGTGTGGGGCAAGCAGGCTTCTTC

TACACACCCAGGACCAAGCGGAGCGAGAGCACTGCAAGTGGGGCAAGTGGAGCTGGCCGGGGCCCTGG

TGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGCTCCCGGCAGAGCTGSCATTGTGGAACAATGCTGTA

CCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAAGTAGACGCAGCCTGCAGGCAGCGTCGAGTAA

CATCACATTTAAAAGCATCTCAGGTAACCTATATTTTGAATTTTTTAAAAAAGTAACCTATAATAGTTATTAT

TAAAAATAGCAAAGATTGACCATTTCCAAGAGCCATATAGACCAGCACCGACCACTATTCTAAACTATTTAT

GTATGTAAATATTAGCTTTTAAATTTCTCAAATAGTTGCTGAGTTGGGAACCACTATTATTTCTATCGAT

TCAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTGTTTCACTGGTGTAAATTGCAGAAAGATGATCTAAGT

AATTTGGCATTATTTTAATAGTTTGAACCAACATGCCATTTTACAAATAAGACTTATATTTGTCCTTTT

TGTTTTTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAAAGCTTATTCATCTGTTTTCTTTT

TTCGTGGTGTAAAGCCAACACCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTG

TGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGTGGTACAGCACTGTTATTTTTCAAAGATGTGTT

GCTATCCTGAAAAATTCTGTAGGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTTCTCTTATTCCACTTCGGTAGAGGATT

TCTAGTTTCTTGTGGGCTAATTAAATAAATCATTAACTCTTCTAAGTTATGGATTATAAACATTCAAAA

TAATATTTTGACATTATGATAATTCTGAATAAAAGAACAAAAACCATGGTATAGGTAAGGAATATAAACA

TGGCTTTTACCTTAGAAAAACAATTCTAAATTCATATGGAATCAAAAAAGAGCCTGCaAGGGTG

Figura 7

GIRE: CACGTGGTGGC...CACGTG

Promotor de albúmina: ctcaaa...ggtacc

Intrón de la hormona de crecimiento TCG...ggtac
humana:

Potenciador traduccional de VEGF: Cag...aaacc

Secuencia codificante del gen de la insulina humana con mutaciones para compatibilidad con furina:

ATG...TAC

Región no traducida en 3' de albúmina humana: secuencia más allá del codón de terminación TAC

Figura 7 (continuación)

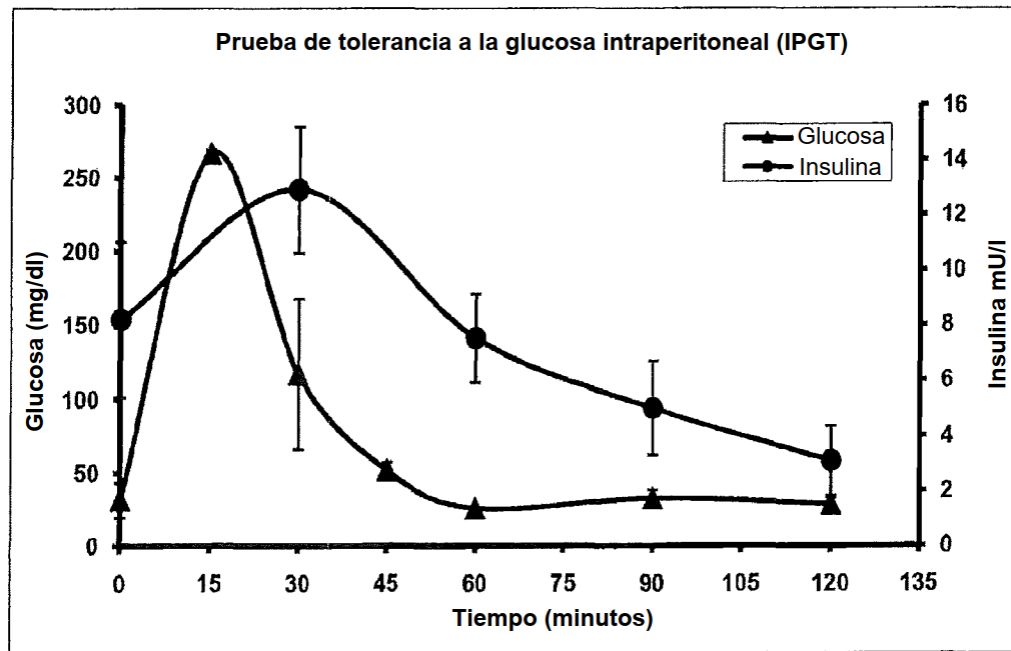


Figura 8

Producción de insulina *ex vivo* en hepatocitos mediante diversas construcciones génicas de insulina

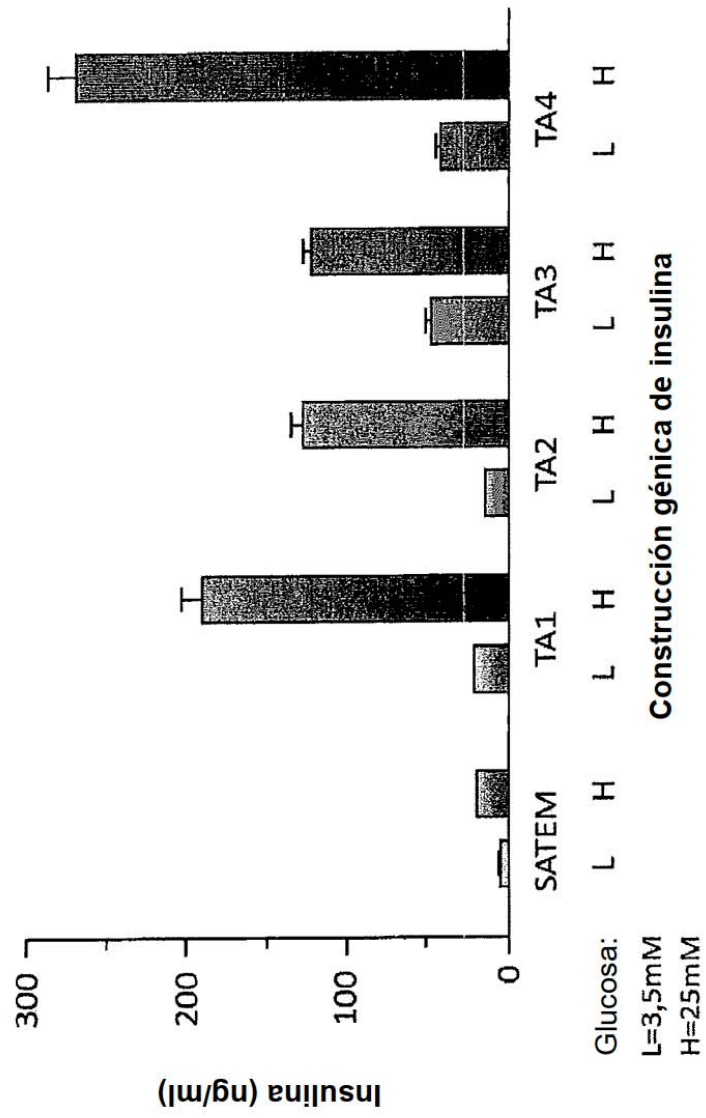


Figura 9

Casete de expresión TA2 (1 - 2347)

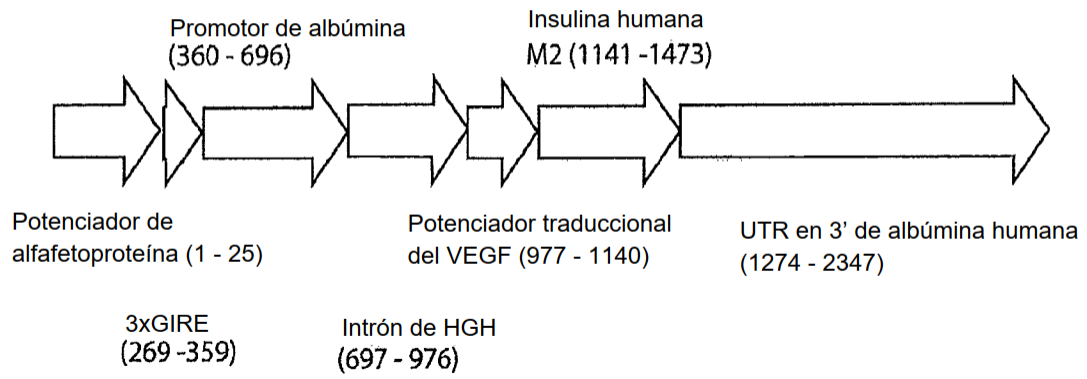


Figura 10

Casete de expresión TA2 (SEQ ID NO: 3)

CCGCCCCCTTcaccAAGATCTTTTGTATGGCAGAGTTTCAGTTTACCGGGTCACATTGTACCTGGGAAGATT
 CAAGGATTTATGGAAAAAGTCAACAAACAGGAGTCAGAGCAGCCGAAAAAGCATGGACTCTGTACTTAGGAC
 TCGCTTTGAGCAATGGCACAGCAAGCTTTAACCTGTTTGCAGTCAGCACACAACTGTGGTTCAAAGCT
 CCACCTTATCTCTCTCTGTGGAAATTCagatatcagatcagtttaaAccttgcGGCCGCCAGTTCTCACGTG
 GTGGCCACGTGCTTGGGCACGCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACGAATTCAGTTCTCAC
 GTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACCTtagtgctcaaatgggagacaaagagattaagctctTatgtaaaatt
 tgctgttttacataaactttaatgaatggacaaagtcttgTgcatgggggtgggggtgggggttagaggggaa
 cagctccagatggcaaacatacgcaagggaatttagtcaacaacttttggcaaagatggatgattTgt
 aatggggtaggaaccaatgaaatgagaggaatggttaataatcTacagttattgggttaagaagta
 attagagcgagctcttctgcacacagAtcaccttcctatcaacccactagcctctggcaaaaggtaccTTC
 GAACAGGTAAGCGCCCCCTAAATCCCTTTGGCACAAATGTGTCTGAGGGGAGAGGCAGCGACCTGTAGATG
 GGACGGGGGGCACTAACCTCAGGGTTTGGGGTTCTGAATGTGAGTATCGCCATCTAAGCCCAGTATTTGGC
 CAATCTCAGAAAGCTCCTGGCTCCCTGGAGGATGGAGAGAGAAAAACAAACAGCTCCTGGAGCAGGGAGAG
 TGTGGCCTCTGTCTCTCCGGCTCCCTCTGTGGCTCTGGTTTCTCCCCAGGTTTCGAAGgtaccagcgca
 gaGgcttggggcagcgagcggcagccaggcccgccgggctcggttccAgaaggagaggagcccg
 caaggcgcgcaagagagcgggctgcctcgcaGtccgagccggagagggagcgcgagcccgcgccggcccg
 acggcctccgaaccATGGCCGTGGGATGCGCCCTCTGCCCCCTGCTGGCGTCTCTGGCCCTCTGGGGACG
 TGACCCAGCCGAGCCCTTTGTGAACCAACACTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAAGCTCTCTACCTAGTGT
 GCGGGGAACGAGGCTTCTCTACACCCAGCACCaaacCGGAGGCAGAGGCTTGCAGCTGGGGCAGGTG
 GAGCTGGGGGGGGCCCTGGTGAGGAGGCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCGGAGAAAGCTGG
 CATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGTCTCCCTCTACCACTGGAGAACTACTGCAACTAGACGCAGC
 CTGCAGGCAGCGTCGAGTAACATCACATTTAAAGCATCTCAGGTAACATATTTTGAATTTTAAAAAA
 GTAACATAATAGTTATTATTAATAATAGCAAAGATTGACCATTTCAGAGCCATATAGACCAGCACCGAC
 CACTATTCTAAACTATTTATGTATGTAAATATTAGCTTTTAAATTTCTCAAAATAGTTGCTGAGTTGGGAA
 CCACTATTATTTCTATCGATTGAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTGTTTTCACTGGTGTAAAT
 TGCAGAAAGATGATCTAAGTAATTTGGCATTATTTTAAATAGGTTTGAAGAAACATGCCATTTTACAAAT
 AAGACTTATATTTGTCCTTTTGTCTTTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAAAGC
 TTATTCATCTGTTTTTCTTTTTCTGTGGTGTAAAGCCAACACCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAAT
 CATTTTGCCTCTTTTTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGTGGTACAGCACTG
 TTATTTTCAAGATGTGTGCTATCCTGAAAAATCTGTAGGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTCTCTCTTA
 TTCCACTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTGTGGGCTAATTAATAAATCATTAACTCTCTTAAGTTA
 TGGATTATAAACATTCAAAATAATATTTTGACATTATGATAATTCTGAATAAAAGAACAAAAACCATGGTA
 TAGGTAAGGAATATAAAACATGGCTTTTACCTTAGAAAAACAATTCTAAAATTCATATGGAATCAAAAAA
 GAGCCTGCaAGGGTG

Figura 11

Potenciador de alfafetoproteína: AAGAT...ttgc

GIRE: CACGTGGTGGC...CACGTG

Promotor de albúmina: ctcaaa...ggtacc

Intrón de la hormona de crecimiento TTCG...ggtac
humana:

Potenciador traduccional de VEGF: Cag...aaacc

Secuencia codificante del gen de la insulina humana con mutaciones para compatibilidad con furina:
ATC...TAG

Región no traducida en 3' de albúmina humana: secuencia más allá del codón
de terminación TAG

Figura 11 (continuación)

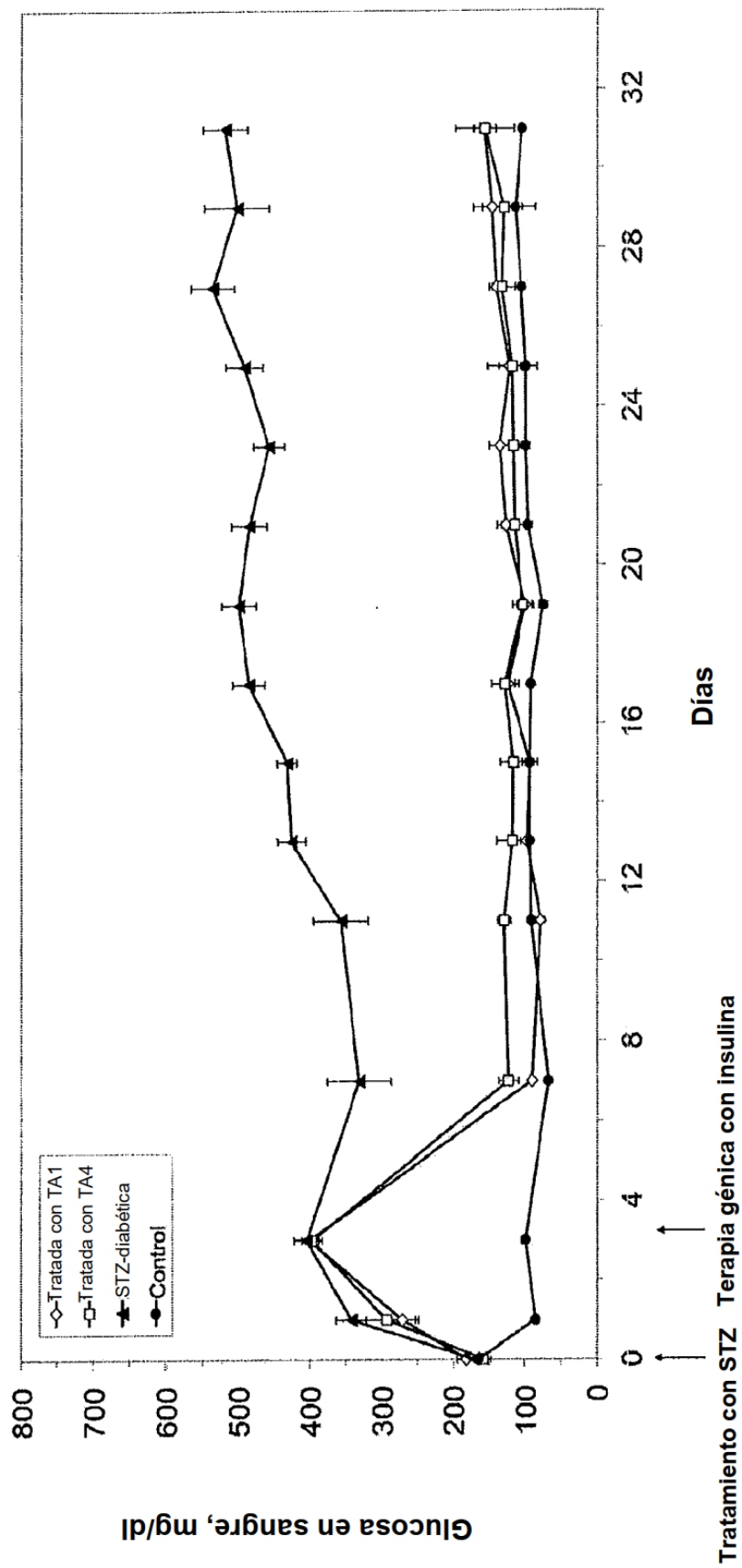


Figura 12

Efecto del tratamiento mediado por adenovirus con TA1 y TA4 sobre el peso corporal en ayunas

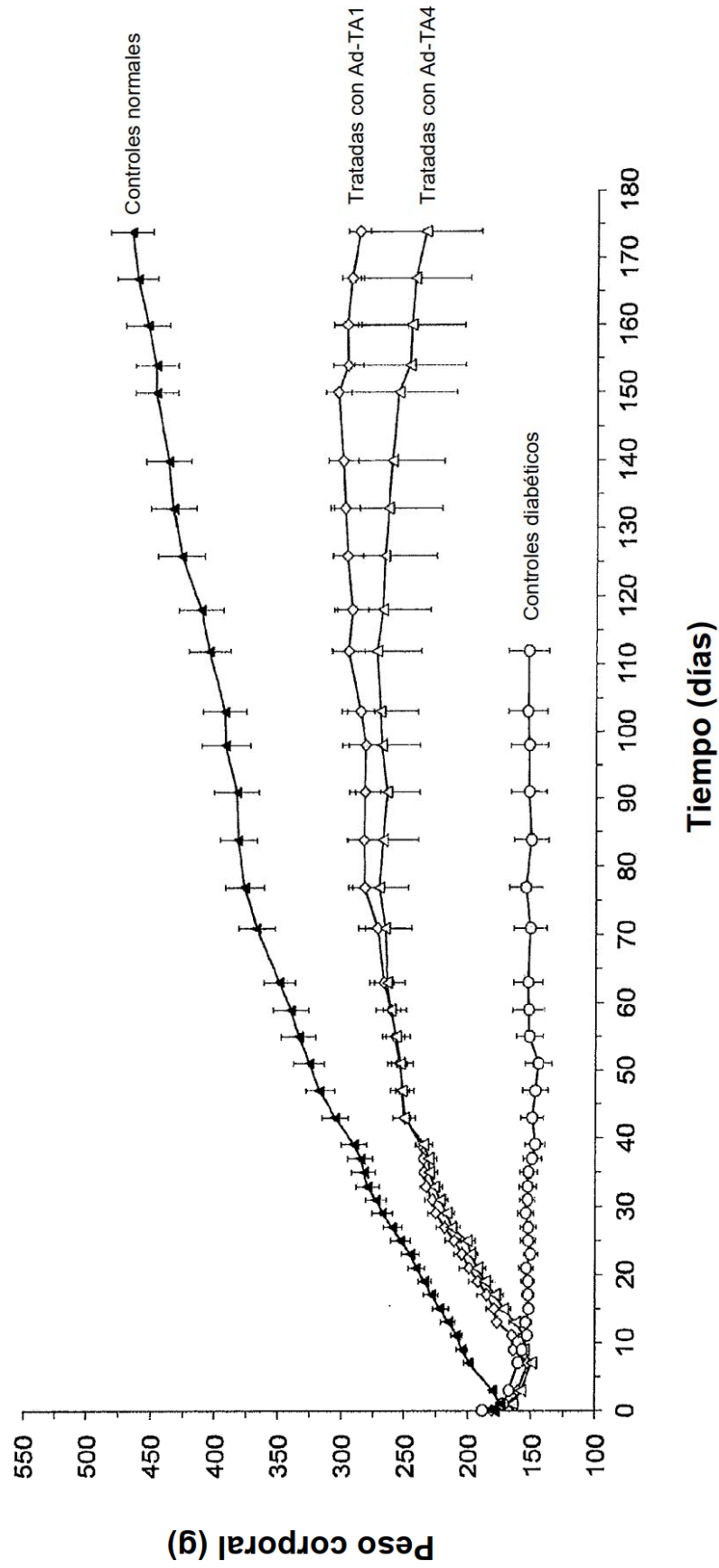


Figura 13

Efecto del tratamiento mediado por adenovirus con TA1 y TA4 sobre el peso corporal en ayunas

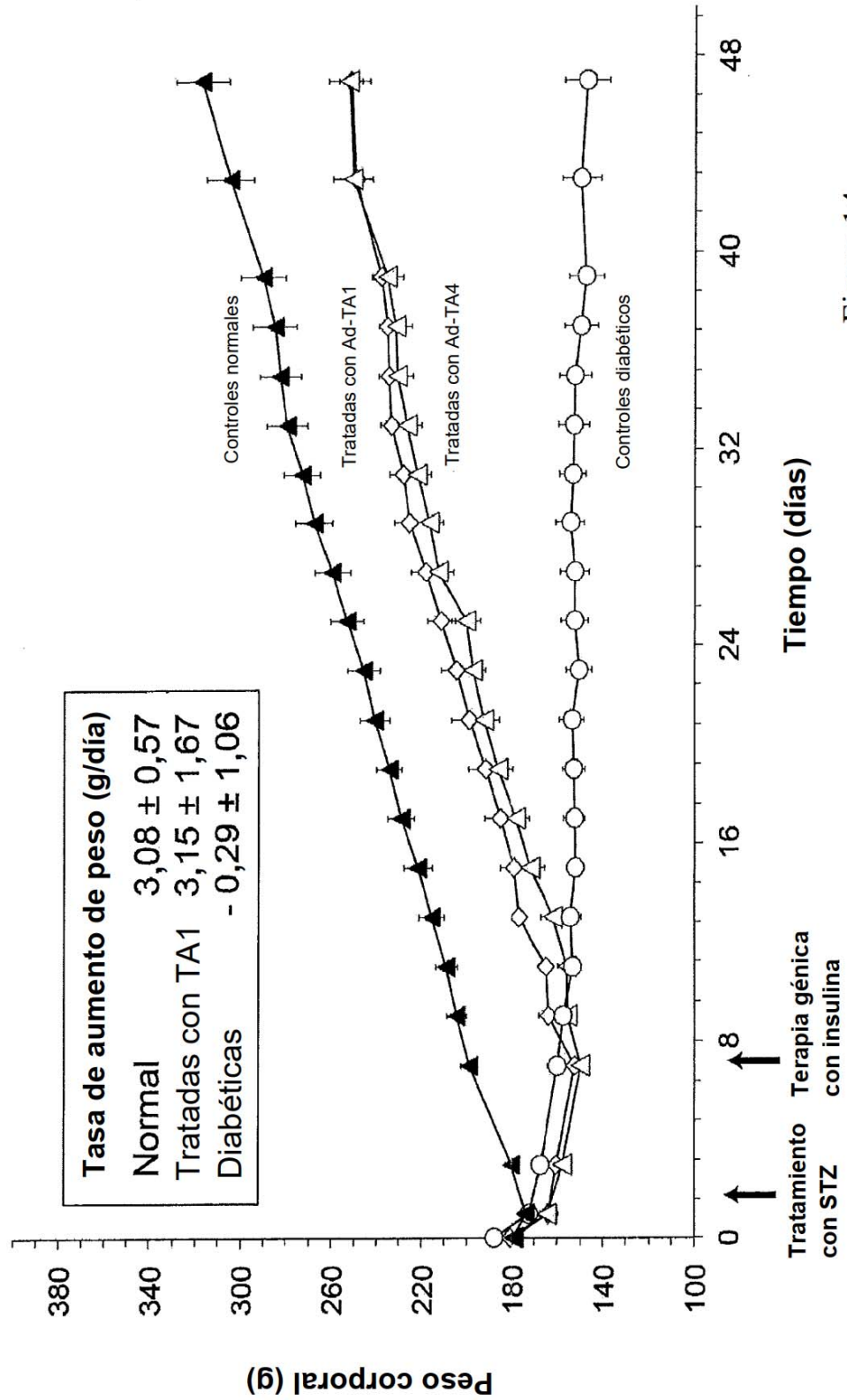


Figura 14

Insulina humana en suero de ratas diabéticas tratadas con ADN plasmídico o en minicírculo

Construcción de insulina	Insulina, mU/l (media $\pm$ D.E.)
Minicírculo TA1	22,1
Minicírculo TA1/SMAR	36,5 $\pm$ 21,1
PTED110	12,4 $\pm$ 10,8
TA1/pENTR	1,3 $\pm$ 0,2
STZ diabética	0,4 $\pm$ 0,2
Control normal	0,6 $\pm$ 0,6

Figura 15

Efectos del tratamiento con minicírculos TA1 y TA3 sobre glucosa en sangre en ayunas

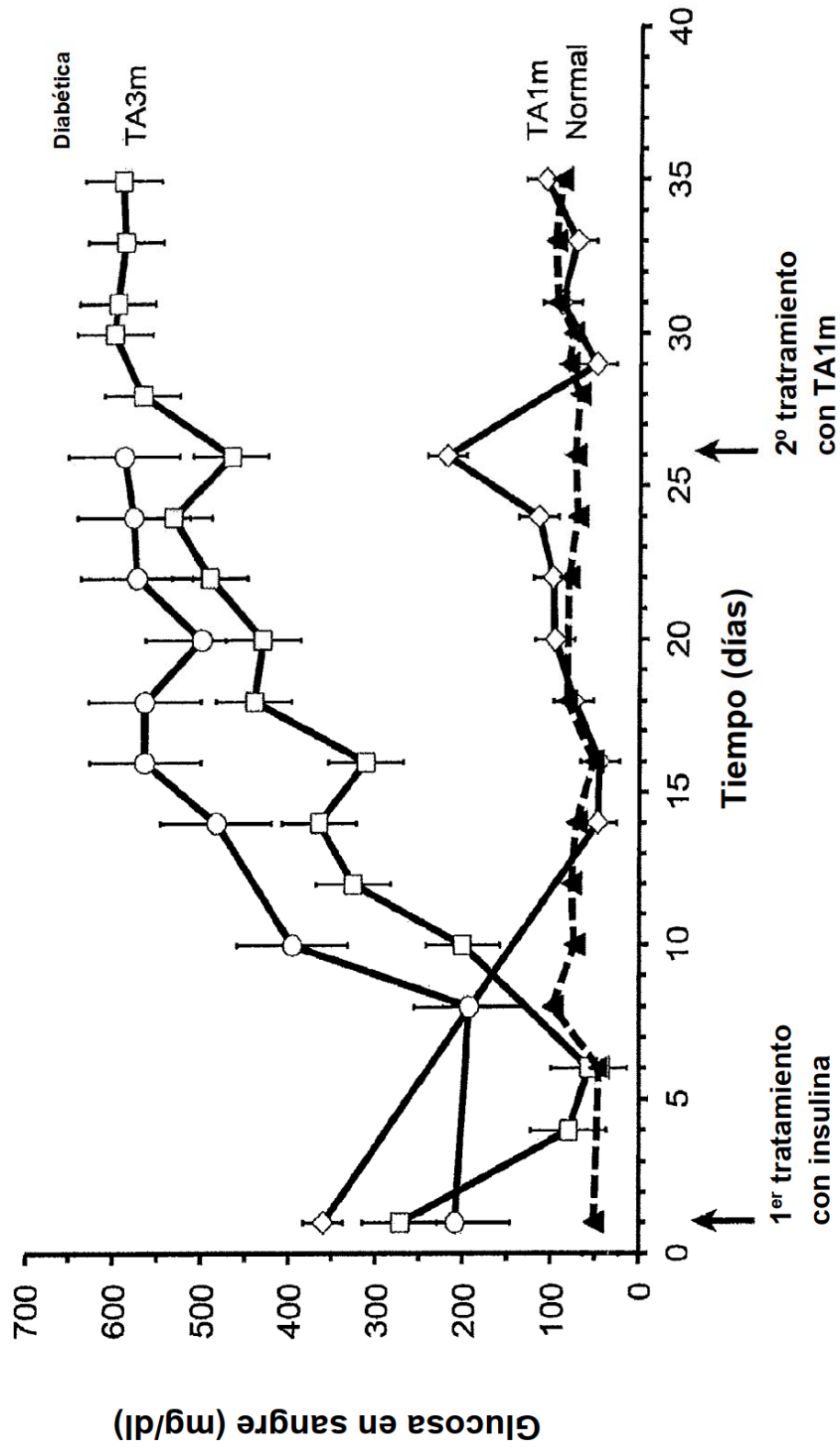


Figura 16

Producción de insulina dependiente de glucosa a partir de hepatocitos procedentes de células madre humanas

Procedencia del hepatocito	Insulina humana ng/día/cm ² (media ± D.E.)		Aumento de insulina en glucosa alta (Alta/baja)
	Glucosa alta	Glucosa baja	
Células hES	266 ± 48	61 ± 34	4,4
Células iPS	121 ± 8	12 ± 5	10,1
Ratas normales	88 ± 15	11 ± 1	8,0

Figura 17

Efecto del tratamiento con minicírculos de ADN en pesos corporales en ayunas (Ratas diabéticas tratadas con TA1m, TA2m y TA3m)

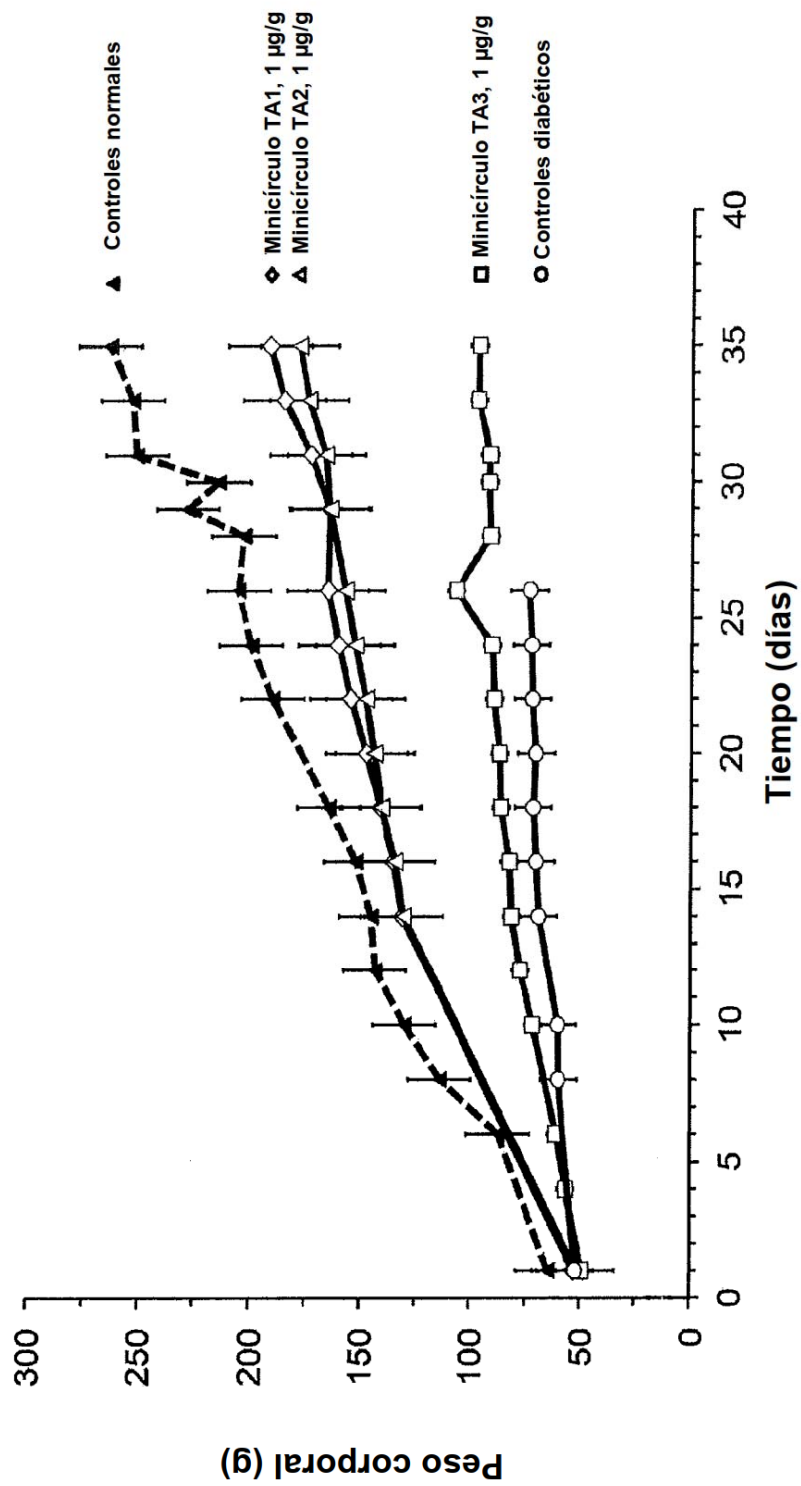


Figura 18