



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 304 444**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02741943 .1**

86 Fecha de presentación : **10.06.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1458240**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54 Título: **Construcciones de ácido nucleico útiles para la producción regulada de glucosa de la insulina humana en las estirpes celulares somáticas.**

30 Prioridad: **08.06.2001 US 296936 P**
19.06.2001 US 299334 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

73 Titular/es:
Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368
Ridgefield, Connecticut 06877-0368, US

72 Inventor/es: **Tatake, Revati J.;**
Schneiderman, Richard y
Barton, Randall Wilber

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Construcciones de ácido nucleico útiles para la producción regulada de glucosa de la insulina humana en las estirpes celulares somáticas.

Fundamento de la invención**1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a las construcciones génicas útiles para modificar las estirpes celulares para llevar a cabo la producción regulada de glucosa de la insulina humana, y las estirpes celulares transformadas por dichas construcciones génicas.

2. Fundamento de la técnica afín

La diabetes mellitus es un trastorno crónico del metabolismo de las grasas, carbohidratos y proteínas. Se caracteriza por una infra-utilización de glucosa y una deficiencia absoluta o relativa de insulina. Las personas que padecen esta enfermedad en toda su expresión tienen una tendencia a hiperglucemia en ayunas, glucosuria y en definitiva al desarrollo de aterosclerosis, nefropatía, neuropatía y microangiopatía. La diabetes es la séptima causa destacada de muerte (la sexta causa de muerte por enfermedad) en los Estados Unidos. También es la causa principal de nuevos casos de ceguera en personas de edades comprendidas entre 20 y 74 y la causa principal de la nefropatía renal o insuficiencia renal terminal (lo que representa aproximadamente un 40% de casos nuevos). Las personas afectadas por diabetes tienen unas 15-50 veces mayor riesgo de amputación de pierna, 2-4 veces el riesgo de una enfermedad cardíaca y es 2-4 veces más probable que padezcan un infarto que la población general.

La patología de la diabetes mellitus se puede atribuir a tres efectos principales de la insuficiencia de insulina: (1) un descenso en el uso de glucosa por parte de las células del organismo, que provoca un incremento en glucemia de hasta niveles supranormales; (2) un incremento destacado en la movilización de grasas de las zonas de almacenamiento de grasa, causando un metabolismo anormal de las grasas así como la deposición de lípidos en paredes vasculares para causar aterosclerosis y (3) disminución de proteínas en los tejidos del organismo. La diabetes es una enfermedad crónica que actualmente no tiene curación.

La diabetes mellitus se clasifica generalmente en tres formas principales importantes: diabetes insulino-dependiente tipo 1 (IDDM), que a menudo se conoce como diabetes inmunomediada; diabetes no insulino-dependiente tipo 2 (NIDDM); y diabetes debido a variantes en genes que controlan la función beta celular o el metabolismo. IDDM representa aproximadamente el 10% de todos los casos de diabetes. La IDDM tipo 1 es una enfermedad inmunomediada que se asocia a una pérdida casi completa de las células beta pancreáticas lo que da lugar a una dependencia de la insulina para toda la vida. Puede producirse a cualquier edad, y se estima que aproximadamente el 1% de todos los recién nacidos desarrollarán la enfermedad. La NIDDM tipo 2 representa la mayoría del 90% restante de casos de diabetes. Se cree que la NIDDM tipo 2 se produce como resultado de influencias genéticas externas y complejas que contribuyen a una resistencia periférica de la insulina con tejidos incapaces de utilizar la glucosa de forma apropiada como respuesta a la señal de insulina. Las variantes alélicas en el locus de insulina propiamente se han asociado al NIDDM, mientras las variantes exhiben propiedades alteradas con respecto a la regulación transcripcional. Un porcentaje muy pequeño de diabéticos tienen su afección secundaria a las variantes en los genes que controlan la función beta celular o el metabolismo.

La homeostasis de la glucosa abarca numerosos sistemas neuroendocrinos, no obstante, los islotes pancreáticos de Langerhans se consideran como el "sensor de glucosa" primario en los mamíferos. Los islotes pancreáticos están compuestos de cuatro poblaciones básicamente distintas de células que se pueden caracterizar por su producción de insulina, glucagón, somatostatina o polipéptidos pancreáticos. Las células beta que producen insulina predominan en los islotes. La IDDM tipo 1 y tipo 2 en su fase inicial se caracterizan por una pérdida progresiva de la función beta celular. La secreción de insulina de las células beta del islote es estimulada por los aminoácidos, los azúcares de tres carbonos como el gliceraldehído y preferiblemente la glucosa.

El transporte de glucosa a la célula beta y el metabolismo de la glucosa en ella son requisitos absolutos para la secreción de insulina, es decir, (la glucosa estimula la secreción de insulina de las células beta de los islotes de Langerhans a través de su propio metabolismo). Como en las células beta normales la capacidad de transporte de glucosa se relaciona en exceso con el flujo glucolítico, la descomposición de la glucosa es la verdadera etapa que limita la velocidad.

La glucosa estimula la biosíntesis *de novo* de la insulina ya que aumenta la transcripción, la estabilidad del mRNA, la conversión y transformación de proteínas. También estimula rápidamente la liberación de la insulina previamente almacenada. El gen de insulina humana es codificado en el brazo corto del cromosoma 11 y contiene tres exones y dos intrones. El control transcripcional del gen de insulina se consigue a través de una corta región de ADN flanqueante que interacciona con las moléculas de señalización sensibles a la glucosa y específicas de la célula. La naturaleza precisa de la organización reguladora es escasamente comprendida. Sin embargo, en general se cree que los factores básicos hélice-lazo-hélice y que contienen el homeodominio son componentes críticos de la maquinaria transcripcional que rige la expresión específica de las células beta de la insulina. El ARN mensajero se conoce como transcrito primario y

se manipula eliminando las secuencias intermedias y añadiendo una cola poly-A en su final o extremo 3' para producir un ARN mensajero de insulina madura. La traslación del m-ARN se produce en el retículo endoplásmico rugoso para dar preproinsulina.

5 La preproinsulina difiere de la insulina madura en dos cosas: (1) tiene una "señal" N-terminal o "pre" secuencia que dirige el polipéptido al retículo endoplásmico rugoso donde es tratado proteolíticamente, y (2) contiene un péptido de conexión adicional, conocido como el péptido C, entre las cadenas A y B, de forma que el péptido C permite el plegado correcto de toda la molécula.

10 La secuencia señal de la preproinsulina avanza de forma co-translacional en el retículo endoplásmico para formar proinsulina. La proinsulina es transportada al aparato de Golgi donde es transferida posteriormente a las vesículas secretoras en las que se transforma a insulina madura por la escisión proteolítica del C-péptido.

15 La transformación de la proinsulina tiene lugar principalmente en gránulos secretores inmaduros revestidos de clatrina derivados de la red trans-Golgi (TGN) de la célula beta pancreática. La transformación proteolítica de la proinsulina en insulina se realiza por medio de las convertasas prohormonales de la familia de la subtilisina de las endoproteasas. Estas convertasas escinden o parten los enlaces peptídicos con un grupo carboxilo terminal para dar lugar a residuos dibásicos, y en combinación con la carboxipeptidasa E/H que elimina los residuos básicos de la cadena B, generan la insulina funcional madura que es secretada a la circulación. Es decir, la conversión completa implica la
20 escisión endoproteolítica del COOH-terminal en dos pares de residuos básicos que unen la cadena B de insulina con el C-péptido (Arg³¹-Arg³²) y el C-péptido a la cadena A (Lys⁶⁴-Arg⁶⁵) así como el recorte de los restantes residuos básicos COOH-terminales por la carboxipeptidasa E/H (Davidson y cols., Biochem.J.245:575(1987); Grimmwood y cols., J. Biol. Chem. 264:15662(1989)). Las vesículas secretoras se derivan de las membranas de Golgi por un proceso de gemación y separación eventual. Las vesículas son transportadas a la superficie de la membrana del plasma de una
25 célula en respuesta a los estímulos secretores como la glucosa, donde se funden con la membrana del plasma y liberan sus almacenes de hormona madura.

Se ha planteado como hipótesis que el efecto estimulador específico de la glucosa sea mediado por, y proporcional a, su velocidad de flujo a través de la glucólisis y vías afines. Se acumulan pruebas que implican a un transportador
30 tipo glucosa que facilita la difusión conocido como GLUT-2, y la enzima fosforilante de la glucosa, la glucoquinasa, en el control del metabolismo de la glucosa en las células beta del islote. Ambas proteínas tienen afinidades por la glucosa que permiten grandes cambios en las actividades en toda la gama fisiológica de la glucosa.

La diabetes se trata corrigiendo las concentraciones de insulina en el organismo de forma que el paciente tenga un
35 metabolismo normal o casi normal de grasas, carbohidratos y proteínas. La terapia óptima ha resultado ser eficaz para prevenir los efectos más agudos de la diabetes, y para asimismo retrasar enormemente los efectos crónicos. En general se está de acuerdo en que se ha avanzado muy poco en el tratamiento clínico de los pacientes diabéticos en los últimos veinte años.

40 El tratamiento de la diabetes sigue centrado en la auto inyección de insulina exógena una o dos veces al día, o en el caso de diabetes no grave en la que los islotes mantienen todavía el potencial para segregar insulina, en el uso de fármacos que estimulen la secreción de insulina como las ureas de sulfonilo. La insulina exógena se puede aislar mediante métodos no recombinantes como a partir de la purificación de la insulina del páncreas bovino o porcino recién aislado, o bien mediante el empleo de técnicas de recombinación. Los métodos recombinantes incluyen generalmente
45 la expresión de proinsulina recombinante en bacterias o levaduras, seguida del tratamiento químico de la proinsulina para garantizar los enlaces correctos de disulfuro entre las cadenas A y B de la molécula madura de insulina. El péptido de insulina maduro se purifica de las proteínas procedentes de bacterias o levadura, así como de cualquier material añadido. El procedimiento recombinante bacteriano supone tantos como cuarenta pasos distintos.

50 El tratamiento de la diabetes de forma convencional implica también que el paciente lleve una dieta estándar que contenga cantidades normales y bien controladas de carbohidratos, y realice un programa constante de ejercicios. El mantener el peso suele ser útil ya que menos grasas reducen los requisitos de insulina por parte del individuo. El ejercicio aumenta el transporte de glucosa a las células musculares incluso en ausencia de insulina, y tiene realmente un efecto similar a la insulina.

55 Junto a las inyecciones de insulina, la dieta y los programas de ejercicios, el tratamiento de la diabetes requiere un control constante y durante toda la vida de la glucemia. Puesto que muchos pacientes diabéticos tienen dificultades para cumplir estas normas, se encuentran expuestos constantemente a los efectos adversos de la hipoglucemia e hiper-glucemia. Por lo tanto, existe la necesidad de buscar métodos alternativos para controlar los niveles de glucemia en el
60 paciente diabético.

Numerosos investigadores han intentado controlar el aporte de insulina mediante el uso de dispositivos externos como bombas de insulina y bolígrafos de insulina. Desafortunadamente, dicha tecnología no se ha desarrollado hasta un punto que permita unos niveles de glucemia muy controlados. La inexactitud de los sensores de glucemia, así como
65 el mecanismo dispensador son un problema en los actuales dispensadores de insulina automatizados.

Otros han intentado controlar los niveles de glucemia en el paciente diabético mediante el trasplante de tejido pancreático de un donante al paciente diabético. Los problemas más grandes con dichos trasplantes son: la escasez

de tejido donante, el coste y los gastos implicados en el cultivo del tejido donante, la necesidad de inmunosupresión para impedir el rechazo del tejido en los trasplantes entre individuos no genéticamente iguales, y la dificultad para mantener tejido viable durante periodos de tiempo prolongados después del cultivo. Incluso los trasplantes con éxito padecen un mecanismo autoinmunitario inherente sensible a la destrucción de las células beta del islote original del paciente.

Un método alternativo que se ha sugerido propone el uso de un “páncreas artificial” perfundido con un biohíbrido, que comprende tejido de islote en una membrana semipermeable o de permeabilidad selectiva. La membrana semipermeable actúa para proteger los islotes transplantados de ser reconocidos y destruidos por el mismo mecanismo autoinmunitario sensible a la destrucción de las células beta originales del paciente. El tratamiento *in vivo* de la diabetes con implantes peritoneales de islotes encapsulados ha sido documentado por muchos grupos de investigación (Ver, por ejemplo, patente americana nr. 5.262.055 a Bae y cols (1993); patente americana nr. 5.427.940 a Newgard(1992); Lum y cols., Diabetes 40:1511(1991); Maki y cols., Transplantation 51:43(1991); Robertson, Diabetes 40:1085(1991); Colton y cols., J. Biomech. Eng.113:152(1991); Scharp y cols., Diabetes 39:515(1990); Reach, Intern. J. Art. Organs 13:329(1990)). Dichos páncreas artificiales son caros y su fabricación requiere tiempo, y en la práctica tienen un uso muy limitado.

Una cantidad considerable de investigación se ha llevado a cabo con respecto al trasplante de estirpes celulares de células beta. Las estirpes celulares de células beta se han generado a partir de insulinitas e islotes hiperplásticos. Se han utilizado dos métodos importantes para aislar las estirpes celulares beta inmortalizadas: (1) aislando las células de un insulinoma de rata inducido por rayos X; (2) infección y transformación de un cultivo primario de células de islotes por el virus simian 40 (SV40). Varias de estas estirpes celulares muestran unas características respecto a la secreción de insulina, similares a las observadas en los islotes adultos intactos, en particular la respuesta a las concentraciones de glucosa en el margen fisiológico (5-15 mmol/L). Un problema frecuente asociado a dichas estirpes celulares es su inestabilidad fenotípica. Es decir, después de la propagación de las células en el cultivo, las células frecuentemente responden a las concentraciones subfisiológicas de glucosa y/o manifiestan una secreción reducida de insulina.

Como las células de las estirpes celulares inmortalizadas se encuentran sometidas a la misma autoinmunidad que destruyó las células beta del huésped, dichas estirpes celulares beta se encapsulan frecuentemente para su trasplante. Mientras el encapsulado reduce la respuesta inmunológica a las células, porque las propias células se encuentran sometidas a una rápida división celular, la demanda creciente de oxígeno y nutriente en la encapsulación, así como el aumento en los residuos metabólicos, impactan de forma adversa en la supervivencia de las células.

Varios investigadores han propuesto células beta que se alteran genéticamente para controlar la proliferación. Por ejemplo, la patente americana nr. 6.114.599 a Erfat revela células beta inmortalizadas manipuladas genéticamente de forma que la proliferación de las células es regulada por la presencia o ausencia de un antibiótico. Dichas células se fabrican introduciendo en la célula beta un primer gen que comprende un ADN que codifica una proteína de fusión génica TetR-VP16, y un promotor de insulina que controla la expresión de la proteína de fusión, y un segundo gen que comprende un ADN que codifica un antígeno SV40 T, y un promotor mínimo del operador de tetraciclina. Se consigue dicha integración estable de ambos genes y se realiza el cribado o la detección para aquellas células cuya proliferación sea controlada por la tetraciclina o un derivado de la misma. Erfat y sus colaboradores han sugerido que la oncogénesis controlada se podría utilizar para amplificar *in vitro* las células de islotes humanos, con el posterior trasplante de las células de los islotes después de la inactivación de los oncogenes.

La patente americana nr. 5.723.333 a Levine y cols. (Editada: 3 marzo, 1998) muestra estirpes celulares pancreáticas establecidas transformando células con vectores, preferiblemente vectores retrovíricos, que contienen dos o más oncogenes bajo el control de uno o más promotores inducibles y/o elementos genéticos. Una subpoblación de dichos genes expresaba niveles altos de insulina. La publicación WO 01/11031 a Giannoukakis y cols. (Publicada: 15 de febrero, 2001) exhibe células beta manipuladas genéticamente que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican inhibidores de la transducción de la señal de interleucina -1 β (IL-1 β). Se ha demostrado que la IL-1 β es la citoquinina de iniciación directamente sensible a los problemas de la producción de insulina estimulada por la glucosa en los islotes humanos *in vitro* (MacDaniel y cols., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211:24(1996)). Al reducir la actividad de IL-1 β se produce la reducción correspondiente en la disfunción de la célula beta y la apoptosis en el animal diabético. Se dice que las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas activas biológicamente capaces de inhibir IL-1 β incluyen IL-1Ra, inhibidor de NF-K β , inhibidor de AP1, formas solubles de IL-1R, formas mutantes de la proteína FADD o fas, IGF-1, la proteína crmA de la vacuna, y los miembros de la familia bel-2 como el Bcl-2 y el Bcl-XL.

Una serie de investigadores han intentado invertir la diabetes induciendo a que los embriocitoblastos se transformen en células productoras de insulina. Los embriocitoblastos son células primitivas que bajo la dirección apropiada pueden transformarse en cualquier tipo de célula. Mientras que se ha demostrado que el tejido pancreático de cerdo fetal es capaz de normalizar los niveles de glucemia en una rata, es ocurre solamente varios meses después del trasplante y requiere la inmunosupresión de la rata.

La patente americana nr. 5.837.236 a Dinsmore (Editada: 17 de noviembre, 1998) revela que la vida de las células pancreáticas porcinas fetales se puede prolongar en individuos de distinta especie cuando el antígeno de la superficie celular capaz de provocar una respuesta inmunitaria en el individuo de diferente especie se transforma en un antígeno no inmunógeno. Se están realizando estudios para determinar las condiciones artificiales en las cuales dichas células se

transformarán en células productoras de insulina. Dicho método padece del coste asociado a aislar embriocitoblastos, al problema de introducir virus de especies cruzadas con un trasplante de tejido de una especie a otra, y con respecto a los citoblastos humanos, las implicaciones morales que surgen con respecto al uso de dichas células.

- 5 Short y cols., Am. J. Physiology 275:E748 (1998) informan sobre células embrionarias renales que se transforman al introducir un adenovirus de replicación defectuosa que comprende ADN complementario de proinsulina humana en el cual la secuencia de reconocimiento de la convertasa prohormonal básica se modificaba a una zona de escisión de la furina tetra básica. La furina es una proteasa endógena presente en la vía secretora constitutiva de muchas células. Dichas células sintetizaban tanto la proinsulina como la insulina madura. La inyección de la construcción vírica en la
10 vena yugular externa de los ratones daba lugar a la expresión del gen de insulina en el hígado, pero la mejora en el estado glucémico duraba de dos a tres semanas.

- Stewart y cols., J. Mol. Endocrin. 11, 335(1993) informan sobre la transfección de una línea celular murina de la hipófisis con un ADN proinsulina humano en un plásmido que contiene un promotor de metalotioneina y un gen
15 que confiere resistencia al G418 antibiótico. Dichas células al implantarse en ratones atímicos desnudos no diabéticos retrasaban la hiperglucemia inducida por la estreptozotocina (células beta que destruyen la estreptozotocina) en comparación con los ratones de control que reciben un implante de las células no transfectadas. Sin embargo, se observaba que las células implantadas formaban una agregación tipo tumoral.

- 20 Valera y cols., FASEB J. 8:440(1994) demostraron que los hepatocitos podían ser modificados para albergar los genes de insulina humana bajo el control del gen de la fosfoenol piruvato decarboxilasa. Se observaba que a los animales transgénicos que albergan dichos hepatocitos les iba bastante mejor que a los controles no transgénicos a la hora de mantener euglucemia cuando se les retaba con estreptozotocina. La expresión ectópica de la insulina en los hepatocitos de las ratas diabéticas ha sido documentada por Kolodka y cols. (Proc. Natl. Acad. Sci. 92:3293(1995))
25 usando una transferencia de genes retrovírica *in vivo*.

- La publicación WO 97/14441 a Pollock y cols. (publicada el 24 de abril de 1997) muestra células manipuladas que expresan un gen de insulina exógeno o endógeno además de un gen exógeno de calbindina. Pollock y cols. indican que dichas células exhiben la habilidad para secretar insulina de una forma sensible a la glucosa. Ellos revelan que las
30 células pueden ser encerradas en una matriz porosa semipermeable que puede ser implantada en un animal diabético para mejorar las necesidades de un suplemento de insulina.

- Sugiyama y cols., Horm. Metab. Res. 29:599(1997) informan sobre la transfección de hepatocitos con el gen de insulina de rata y lacZ usando un vehículo (AAV) vírico adenoasociado defectuoso. Se dice que dichas células causan
35 una reducción en las concentraciones de glucosa en el medio circundante y una disminución de los niveles de glucemia cuando son transfectadas *in vivo*. Bartlett y cols. (Transplantation Proceedings: 29, 2199, (1997)) informan de un vector de expresión que cuando se inyecta directamente en el tendón de la corva de ratas normales o diabéticas se libera proinsulina durante hasta 12 semanas. El vector comprende el ADN genómico proinsulina insertado en el vector pAAV-CKM inmediatamente después del promotor CKM.
40

- La patente americana nr. 5.811.266 a Newgard (Editada: 22 de septiembre, 1998) informa sobre células beta artificiales conseguidas mediante la introducción de uno o más genes seleccionados del gen de insulina, el gen de glucoquinasa, y el gen transportador de glucosa para lograr una célula creada por ingeniería genética que tenga los tres genes en una configuración funcional y sensible desde el punto de vista biológico. Se piensa que la glucoquinasa
45 y el transportador tipo glucosa que facilita la difusión conocido como GLUT-2, están implicados en el control del metabolismo de la glucosa en las células beta.

- La publicación WO 99/54451 a Powers y cols. (Publicada: 28 de octubre, 1999) muestra las células neuroendocrinas segregando insulina. Las células endocrinas manipuladas genéticamente que segregan insulina como respuesta a la glucosa comprenden un gen que codifica un receptor secretagogo de insulina y un gen de insulina exógeno. Al menos uno de los genes es un gen recombinante introducido en la célula por medio de un vector recombinante. Los inventores tienen la hipótesis de que la habilidad de las células neuroendocrinas para procesar correctamente la insulina refleja la expresión de enzimas que procesan hormonas similares en una variedad de células neuroendocrinas. Se dice que los receptores secretagogos de insulina incluyen receptores para el péptido 1 tipo glucagón, el polipéptido que libera
55 insulina dependiente de glucosa, la colecistoquinina, gastrina, secretina y el péptido inhibidor gástrico. Se dice que las células preferidas para la transformación tienen una capacidad inherente para formar gránulos secretores, como los de las glándulas pituitaria y tiroidea.

- La publicación WO 00/31267 a Bosch y cols. (Publicada: 2 junio, 2000) muestra la transfección de una célula precursora de músculo o de una línea celular de mioblastos con un gen exógeno que codifica la insulina. Las líneas celulares preferidas son las líneas celulares de mioblastos como la C2C12 que se dividen rápidamente y tienen el potencial para diferenciarse en miotubos que no se dividen. Se dice que dichas células sirven para una producción en grandes cantidades en el estado mioblasto, y tras su diferenciación son capaces de producir proteínas recombinantes con el uso de un promotor adecuado mientras no se dividan. La secuencia promotor se elige de manera que el promotor
60 es activado o inducido durante las condiciones diabéticas en el paciente, e incluye promotores de cadena ligera de miosina, creatinasa y myoD.
65

Lee y cols., Nature 408:483(2000) informan de un virus adenoasociado recombinante (rAAV) capaz de transformar una célula para expresar un análogo de insulina de cadena simple ("SIA"), que se forma reemplazando treinta y cinco residuos de C-péptido por un heptapéptido que forma un giro corto, que posee actividad biológicamente activa de insulina sin conversión enzimática, bajo el control del promotor específico de hepatocitos piruvatoquinasa tipo L (LPK) que regula la expresión del SIA como respuesta a los niveles de glucemia. Una secuencia líder de albúmina se añadía a la construcción génica del SIA para facilitar la secreción de SIA de las células, mientras que el potenciador del virus símico 40 (SV40) se añadía corriente abajo del gen de SIA para elevar el nivel basal de la expresión del SIA. Se observaba que el virus adenoasociado recombinante provocaba la remisión de la diabetes en las ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina y en los ratones diabéticos autoinmunitarios durante un tiempo largo.

Barry y cols., Human Gene Therapy 12:131(20 de enero, 2001) han demostrado que los vectores retrovíricos que codifican la expresión de la furina que guía a los promotores responsables de la glucosa puede aportar una secreción de insulina amplificada regulada por la glucosa. El grupo revela la existencia de una construcción del virus Lhl*TFNSN que codifica un promotor del factor de crecimiento transformante α (TGF α) de rata regulador de la glucosa que controla la expresión de la furina en murina con un promotor de repetición terminal largo vírico (LTR) conductor de la expresión constitutiva de la proinsulina humana por escisión de la furina. Cuando la construcción era transducida en células del músculo liso vascular, se observaba que las células respondían a las concentraciones fisiológicas de glucosa. Se obtenía proinsulina humana por escisión de la furina alterando el ADN complementario de la proinsulina humana para codificar los lugares a escindir por la furina (Hosaka y cols., J. Biol. Chem. 225:12127(1991); Groskruetz y cols., J. Biol. Chem. 269:6241(1994); Gros y cols., Gene Ther. 8:2249(1997). Un *neo* gen (fosfotransferasa de neomicina bacteriana) se incorporaba a la construcción de manera que el neo gen se expresaba desde y guiado por el promotor 40 del virus simian (SV40). La liberación de insulina de las células se declaraba contra las células transducidas con vectores retrovíricos que comprenden el promotor LTR, conductor tanto del ADNc de la adenosin deaminasa humana como del ADNc de eritropoyetina de rata, y un promotor de SV40 que conduce el neo gen seleccionable. Las células alteradas genéticamente se colocaban en una matriz de colágeno y se implantaban en una pequeña bolsa fabricada en la cápsula del estómago de las ratas BB *lypllyp* DR que se habían vuelto diabéticas (glucemia que excede 180 mg/dl). En ocho ratas tratadas, los investigadores hallaron una reducción importante en el requisito de insulina de hasta un 25% del nivel de pretratamiento durante hasta tres meses, con una rata libre de insulina sin hipoglucemia. Las pruebas de tolerancia de glucosa intraperitoneal en las ratas diabéticas que reciben implantes celulares controlados no mostraban el descenso característico en el nivel de glucemia de las ratas normales después de la administración de glucosa.

Las "células beta artificiales" del modelo anterior tienen muchos problemas. Son difíciles de cultivar y en la práctica pierden frecuentemente su capacidad funcional de forma rápida en el cultivo. La mayoría de dichas estirpes celulares o bien no secretan suficiente insulina para ser terapéuticas o bien la producción de insulina no está regulada. En dichas estirpes celulares que presentan algún grado de producción de insulina regulada por la glucosa, muy frecuentemente un promotor sensible a la glucosa regula de forma transcripcional el gen de insulina directamente, incapaz de producir el péptido C que se sabe que posee vasculatura y funciones neurológicas. El trasplante de células alteradas genéticamente del modelo anterior requiere típicamente el uso de fármacos inmunosupresores para toda la vida o bien la incorporación a un dispositivo de inmunoaislamiento donde las células frecuentemente son menos eficaces debido al sobrecrecimiento o la senescencia rápida en el dispositivo.

Por lo tanto existe una gran necesidad de líneas celulares mejoradas que sean programadas para producir insulina de forma sensible a la glucosa, que puedan producir insulina madura así como el péptido C, que se informa que posee funciones neurológicas y vasculatura, y que se adaptan para que el crecimiento funcione durante un período de tiempo significativo en un aparato de inmunoaislamiento de manera que no se requiera inmunosupresión con respecto al trasplante receptor.

Resumen de la invención

Para superar muchas de las desventajas asociadas al modelo anterior, se informa en la presente de una construcción de ácido nucleico recombinante que tiene secuencias multifuncionales (a las que aquí se hace referencia como una "casete") útiles para manipular células que segregan insulina como respuesta a la glucosa. Dicha construcción de ácido nucleico es especialmente útil para introducir la capacidad secretora de la insulina en las células no beta. También se revela la existencia de células recombinantes, reguladas por glucosa, que producen insulina, donde la secreción de insulina se regula de forma significativa a nivel del tratamiento pro-insulina. Se informa también de células recombinantes, reguladas por glucosa, productoras de insulina, capaces de segregar insulina madura así como el péptido C de la proinsulina. E incluso en otra configuración de la presente invención se habla de estirpes celulares adaptadas para el crecimiento en un dispositivo de inmunoaislamiento. Las construcciones a las que pertenece la presente invención se indican en las reivindicaciones.

Las construcciones de ácido nucleico de la presente invención utilizan sistemas en combinaciones y orientaciones únicas para causar la producción regulada por glucosa de insulina humana. Se utilizan varios tipos de secuencias y genes de control de la expresión en las construcciones de la presente invención para influir en la expresión de la proinsulina humana y regular su segmentación en el péptido C, y producir insulina por medio del promotor activado por glucosa de una proteasa de proinsulina.

En las configuraciones preferidas de la presente invención, la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de proinsulina humana que se ve alterada para codificar una proinsulina humana que tiene

unos puntos de escisión de la proteasa alterados naturales. Se prefiere además que las construcciones genéticas de la presente invención comprendan además una secuencia de nucleótidos que codifique una proteasa humana que tenga afinidad por los lugares de escisión de la proteasa alterados. Lo preferible es que la secuencia de nucleótidos proinsulina humana que se ve alterada en sus lugares de escisión de la proteasa comprenda además una variante, como una variante H10D (es decir, histidina a ácido aspártico en la posición 10 en la cadena B) (descrita en la patente americana serie nr. 4.992.418), que incrementa la afinidad de la insulina madura para los lugares de enlace receptores de insulina.

En una configuración de la presente invención, se dispone una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos proinsulina humana que se altera para codificar una proinsulina humana que tiene lugares de escisión de la proteasa alterados de forma natural, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteasa humana que tiene afinidad por los lugares de escisión de la proteasa alterados, de forma que la secuencia de la proteasa del nucleótido se ve precedida preferiblemente por una secuencia de inicio de la conversión que permite el inicio apropiado de la conversión, un promotor constitutivo colocado con respecto a la secuencia de proinsulina humana alterada de forma que sea capaz de promover su transcripción activando el promotor, y un promotor sensible a la glucosa colocado con respecto a la secuencia de la proteasa del nucleótido para promover su transcripción mediante su activación por el secretagogo de insulina, la glucosa.

Una construcción especialmente ventajosa de la presente invención emplea una secuencia de nucleótidos, que puede ser el ADNc, que aporta un código para la expresión de la proinsulina humana que se altera para incorporar lugares de escisión escindidos por la proteasa serina como la subtilisina, un promotor de la transcripción de la secuencia alterada de nucleótidos de proinsulina humana, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteasa humana de serina como la subtilisina capaz de escindir en los lugares de escisión alterados, un promotor regulado por la glucosa de la transcripción de la secuencia de nucleótidos de furina, y una secuencia de nucleótidos de inicio de la conversión, como la secuencia de Kozak de consenso, colocada con respecto a la secuencia de nucleótidos de furina humana para permitir la conversión apropiada tras la conversión de la misma. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa de serina como la subtilisina puede codificar de forma ventajosa la furina.

En una configuración de la presente invención, se dispone de una construcción de ácido nucleico que codifica uno o más promotores (LTR) de repetición terminal larga vírica, una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana que se altera de forma artificial en sus lugares de escisión de la proteasa para acomodar la especificidad de una proteasa de serina como la subtilisina, estando dicha secuencia de nucleótido de proinsulina alterada bajo el control de un promotor de LTR; una secuencia de nucleótido que codifica una proteasa de serina como la subtilisina humana, como la furina; una secuencia de nucleótido de inicio de la conversión, como una secuencia de Kozak de consenso, colocada operativamente con respecto a la secuencia de nucleótido de furina humana para permitir la conversión apropiada sobre la transcripción de la misma; y un promotor que es regulado por la glucosa, como un promotor del factor de crecimiento transformador α (TGF- α), colocado con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana de manera que promueva su transcripción. Los amplificadores-promotores LTR pueden ser eliminados opcionalmente si se desea una construcción no vírica.

En otra configuración de la presente invención se dispone de una construcción de ácido nucleico para transformar células que comprende un amplificador-promotor LTR vírico, una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana que se ve alterada artificialmente en sus lugares de escisión de la proteasa para acomodar la especificidad de la furina, estando la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina bajo el control del amplificador-promotor vírico LTR, un promotor del factor de crecimiento transformador α (TGF- α), una secuencia de nucleótido que codifica una furina humana flanqueada 5' por una secuencia de nucleótidos de inicio de la conversión, como una secuencia de Kozak de consenso, la secuencia de nucleótidos flanqueada, codificada por la furina bajo el control del promotor (TGF- α), un promotor (SV40) del virus simian 40, una secuencia de nucleótidos que codifica la fosfotransferasa de neomicina (Neo), la secuencia de nucleótidos de la fosfotransferasa de neomicina que se encuentra bajo el control del promotor SV40, y un promotor-amplificador vírico LTR 3' de la secuencia de nucleótidos Neo.

Y de nuevo en otra configuración de la presente invención, se dispone de construcciones de ácido nucleico tal como se ha descrito antes, que comprenden además un promotor del citomegalovirus (CMV) unido a la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana que es modificado artificialmente en sus lugares de escisión de la proteasa para acomodar la especificidad de la furina para conducir la expresión constitutiva de la proinsulina humana alterada. El promotor CMV se enlaza opcionalmente a un promotor-amplificador LTR de manera que la secuencia cis-reguladora pueda elevar la transcripción debida al promotor CMV. En dicha construcción, el promotor CMV se utilizará para guiar la expresión constitutiva de la proinsulina humana alterada mientras que el promotor-amplificador LTR se utiliza para aumentar la transcripción del promotor CMV. El promotor-amplificador LTR puede ser modificado para mejorar el nivel de expresión de la proinsulina humana alterada (Ver, por ejemplo., Hilberg y cols. PNAS USA 84:5232(1987); Holland y cols., PNAS USA 84: 8662(1987); Valerio y cols., Gene 84:419(1989).

E incluso en otra configuración preferida de la presente invención, se dispone una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica proinsulina humana que se ve alterada artificialmente en sus lugares de escisión de la proteasa para acomodar la especificidad de la furina; un promotor CMV enlazado operativamente para promover la transcripción de la secuencia de nucleótidos de proinsulina humana alterada; un lugar de poliadenilación localizado en 3' respecto a la secuencia de nucleótidos proinsulina humana, una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana; un promotor regulable por glucosa, como el promotor TGF- α , unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana para promocionar su transcripción al aumentar las con-

centraciones de glucosa; una secuencia de poliadenilación localizada en 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana, una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador seleccionable, como la fosfotransferasa de neomicina; un promotor constitutivo como el SV40, unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el marcador seleccionable para promover su transcripción; y una secuencia de poliadenilación situada en 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica el marcador seleccionable.

Como apreciaría un experto en el tema, la presente invención se puede ampliar a animales transgénicos no humanos y a microorganismos que incorporan las construcciones descritas de ácido nucleico y dicha extensión se ha contemplado aquí. Como también un experto apreciaría, la transformación de las células diana por las construcciones de ácido nucleico que aquí se describe se puede realizar usando uno o más vectores. Por ejemplo, en lugar de la incorporación de la construcción de ácido nucleico en un vector y la transformación de la célula, se podrían transformar las células con un vector que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique la proinsulina humana que se altere de forma artificial en sus lugares de escisión de la proteasa para acomodar la especificidad de la furina y un promotor - amplificador unido a la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina, de manera que sea capaz de promover /incrementar la transcripción de dicha secuencia, e incluso otro vector que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique la furina humana flanqueada 5' por una secuencia de consenso Kozak, y un promotor-amplificador sensible a la glucosa unido operativamente a la secuencia de nucleótidos flanqueada y que codifica la furina, para poder promover la transcripción de dicha secuencia. En una transformación dual del vector, se preferiría que cada vector contenga un marcador diferente seleccionable del dominante, que permita la selección de una célula diana que ha sido transfectada por ambos vectores.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un plásmido de expresión que comprende un promotor CMV junto a un promotor-amplificador LTR conductor de la expresión constitutiva de una proinsulina humana alterada, un promotor TGF- α que promueve la transcripción de una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana, y una unidad de marcaje seleccionable que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la fosfotransferasa de neomicina (Neo), cuya transcripción es promovida por un promotor SV40 e incrementada por un LTR.

La figura 2 ilustra un plásmido de expresión de la presente invención similar a la construcción de la figura 1, pero donde el orden de los tres genes se altera de forma que la expresión Neo es conducida por la 5' LTR y la expresión de insulina humana por el promotor CMV.

La figura 3 describe mediante un diagrama la construcción del plásmido de expresión pLhl*TFSN.

La figura 4 ilustra un plásmido de expresión de la presente invención similar a la construcción de la figura 1 pero que incluye las secuencias de poliadenilación 3' respecto a cada gen estructural, y le faltan las repeticiones LTR.

La figura 5 ilustra un plásmido de expresión no vírico que comprende un promotor CMV (1-750) que guía la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos que codifica una proinsulina humana alterada (1109-1441) incrementada por la poly-A en el extremo 3' (1630-1636) seguido de Neo (2809-3603), cuya transcripción es promovida por un promotor SV40 (2394-2744) e incrementada por el poly-A en el extremo 3' (3667-3674) y una segunda unidad, la ampicilina (Amp)(4126-4986) con 1 intron (890-1022)(construcción superior); y un plásmido de expresión no vírico que comprende un promotor TGF- α (1-1072) que guía la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana (1108-3492) incrementada por la poly-A en el extremo 3' (3692-3698), seguida de la higromicina B (Hygro)(4856-5893), cuya transcripción es promovida por un promotor SV40 (4456-4806) e incrementada por el poly-A en el extremo 3' (6082-6088) y un segundo marcador, la ampicilina (Amp)(6708-7568)(construcción inferior).

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

Las definiciones siguientes se aportan para facilitar la comprensión de ciertos términos aquí empleados:

Por "células" se entiende células en cualquier forma, lo que incluye pero no se limita a células retenidas en el tejido, grupos de células y células aisladas.

Por "estirpe o línea celular" se entiende células capaces de un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Por "clon" se entiende una población de células derivada de una única célula o de un ancestro común por mitosis.

Por "promotor CMV" se entiende un promotor aislado del citomegalovirus ("CMV"), un virus icosaédrico recubierto que contiene ADN doblemente ramificado, y variantes del mismo. El citomegalovirus es del grupo del herpesviridae.

ES 2 304 444 T3

Por “secuencia de consenso” se entiende la secuencia de una serie de ADN, ARN o secuencias de proteínas, que refleja la elección más frecuente de aminoácidos o bases en cada posición.

Por “promotor constitutivo” se entiende un promotor cuya acción no es regulada por un sustrato.

Por “secuencia de control de la expresión” se entiende una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la conversión de otra secuencia de ADN. Una secuencia de codificación se encuentra “bajo el control” de las secuencias de control transcripcional y de traslación en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia que codifica en el ARNm, que luego se convierte en la proteína codificada por la secuencia codificadora.

Por “material exógeno” se entiende el material que ha sido introducido en una célula, organismo, etc... Pero se ha originado fuera de la misma.

Por “casete de expresión” se entiende una construcción de ácido nucleico, generada recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos especificados de ácido nucleico que permiten la transcripción de un ácido nucleico específico en una célula diana. Típicamente, un casete de expresión en un vector de expresión comprende un polinucleótido unido a secuencias reguladoras de inicio transcripcional que dirigen la transcripción del polinucleótido en la célula huésped prevista.

Por “vector de expresión” se entiende un vector que ha sido diseñado para expresar genes clonados en una célula en particular.

Por “furina” se entiende la endopeptidasa eucariótica como la subtilisina con una especificidad de sustrato para la secuencia de consenso Arg-X-Lys/Arg-Arg, y variantes del mismo.

Por “gen” se entiende el grupo de secuencias de ADN que se requieren para producir el polipéptido único mencionado. Por ejemplo, por gen “factor 4 de enlace del elemento sensible al ácido abscísico” se entiende la secuencia de ADN que comprende los exones requeridos para producir el factor 4 de enlace al elemento sensible al ácido abscísico. Por “gen” se entiende incluir las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido.

Por “promotor regulable por glucosa” se entiende un promotor cuya acción es regulable por la glucosa.

Por “insulina” se entiende la insulina y variantes de la misma. Del mismo modo los términos “proinsulina” y “preproinsulina” se refieren a variantes de la misma.

Por “aislar” un material se entiende cambiar el entorno del material o sacar un material de su entorno original o ambos. Por ejemplo, cuando un polinucleótido o polipéptido se separa de los materiales coexistentes de su estado natural, se “aisla”.

Por “secuencia del nucleótido del consenso de Kozak” se entiende una secuencia de nucleótidos que codifica el consenso para el lugar de partida trasnacional del ARNm en eucariotes para una conversión eficiente (Kozak, Nuc.Acíd. Res. 12, 3873-3893, 1984).

Por “repetición larga-terminal” se entiende secuencias idénticas de ADN, varios cientos de nucleótidos hallados en cualquier extremo de los transposones y el ADN provírico formado por la transcripción invertida del ARN retrovírico. Las repeticiones terminales largas tienen repeticiones invertidas, es decir, secuencias próximas a ambos extremos que son idénticas cuando se leen en direcciones opuestas. En los provirus, la repetición terminal larga corriente arriba actúa como un promotor y amplificador y la repetición terminal larga corriente abajo como un lugar de poliadenilación.

Por secuencias de nucleótidos “operativamente unidas” se entiende una yuxtaposición de tal forma que se mantenga la funcionalidad de las secuencias. Así, por ejemplo, una secuencia que codifica “enlazada operativamente” a un promotor se colocará de manera que el promotor sea capaz de realizar la expresión de la secuencia codificadora.

Por “polinucleótido” se entiende cualquier poliribonucleótido o polideoxiribonucleótido, que pueda ser un ARN ó un ADN no modificado, o bien un ADN modificado. Tal como se utiliza aquí, “polinucleótido” incluye, sin limitación, ADN o ARN de una o dos ramificaciones, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN de una o dos ramas, o más típicamente de dos ramas, o una mezcla de regiones de doble y simple ramificación. El término “polinucleótido” se puede referir además a regiones de tres ramas que comprenderán ARN o ADN o también ADN y ARN. “Polinucleótido” abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de polinucleótidos hallados en la naturaleza, como las formas químicas del ADN y del ARN características de virus y células. El término se entiende como que incluye tanto nucleótidos largos como cortos a menudo conocidas como oligonucleótidos y oligómeros.

Por “secuencia promotora” se entiende una región reguladora de ADN capaz de enlazar la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora corriente abajo (dirección 3’). En la secuencia promotora se hallará un lugar de inicio de la transcripción así como un dominio de enlace proteínico responsable del enlace del ARN polimerasa. La región del nucleótido en la cual se inicia la transcripción se conoce como +1, y los nucleótidos son numerados desde esta posición con números negativos que indican los nucleótidos corriente arriba y positivos que indican los nucleótidos corriente abajo.

Por célula “recombinante” o “genéticamente modificada”

se entiende una célula en la que se ha introducido un gen recombinante por la acción del hombre. Los genes introducidos de forma recombinante pueden estar en la forma de un gen de ADNc (es decir, le faltan intrones), una copia de un gen genómico (es decir, incluye intrones con los exones), genes producidos por medios sintéticos, y/o puede incluir genes colocados de forma adyacente a un promotor, o bien unidos operativamente a él, no asociados de forma natural con el gen introducido.

Por “replicón” se entiende cualquier elemento genético (es decir, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación del ADN *in vivo*, es decir, capaz de replicarse bajo su propio control.

Por “secretagogo” se entiende una sustancia que induce a la secreción de las células.

Por “gen estructural” se entiende un gen que codifica un producto (es decir, un enzima, proteína estructural, ARN t) en oposición a un gen que presta un papel regulador.

Por promotor “SV40” se entiende el promotor del virus simian 40, un pequeño virus tumoral que contiene ADN del grupo del papovavirus y variantes del mismo.

Por “cantidad terapéuticamente activa” se entiende una cantidad suficiente para reducir una situación de forma positiva desde el punto de vista clínico.

Por “célula transformada” se entiende una célula en la que se ha introducido ADN exógeno o heterógeno. El ADN transformador puede estar integrado o no (formando enlace covalente) en el ADN cromosómico formando el genoma de la célula. El ADN transformante se puede mantener en un elemento episomal como un plásmido.

Por “TGF- α ” se entiende el factor de crecimiento del polipéptido de 50 aminoácidos originalmente aislado de las células de roedor transformadas viralmente que contiene un dominio tipo EGF y se une al receptor EGF, y a los variantes del mismo, de manera que el polipéptido estimula el crecimiento de las células endoteliales microvasculares y de variantes de las mismas.

Por “transfección” se entiende la introducción de una secuencia de ácido nucleico en una célula diana.

Por “factor de crecimiento transformador” se entiende una proteína secretada por células transformadas que puede estimular el crecimiento de células normales.

Por “secuencia de nucleótidos de inicio de la conversión” se entiende una secuencia de nucleótidos que codifica el lugar de inicio para la conversión del ARNm.

Por “variante” se entiende una secuencia, como un polinucleótido o polipéptido, que difiere de otra secuencia, pero mantiene las propiedades esenciales de la misma, es decir, propiedades por las cuales se utiliza la secuencia en su aplicación (por ejemplo, promueve la expresión, escinde un enlace, etc.). Por ejemplo, una variante de un polinucleótido puede diferir en la secuencia de nucleótidos en una o más sustituciones, adiciones y anulaciones, del polinucleótido de referencia. Por “variante” también se entiende que incluya un fragmento de una secuencia de longitud completa que retenga las propiedades esenciales.

Por “vector” se entiende un replicón, como un plásmido, fago, fagómido o cósmido, utilizado para la transformación de la célula en la manipulación genética. Los vectores pueden incluir moléculas de nucleótidos de fuentes distintas que se habrán cortado y enlazado artificialmente.

2. Construcción

La presente invención supera muchos de los problemas asociados a métodos del modelo anterior para mejorar el estado del diabético. Utilizando combinaciones únicas de secuencias de ADN diferentes, la presente invención permite que una construcción de ácido nucleico se pueda utilizar para transformar las células, en particular las células somáticas, para segregar insulina de forma regulada por la glucosa.

La presente invención describe una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se ve alterada para obtener la expresión de una proinsulina humana que tiene lugares de escisión de la proteasa alterados de su estado natural, con el fin de tener una mayor afinidad por una proteasa humana que tenga actividad en el lugar de escisión de la proteasa alterada, una secuencia de nucleótidos que codifique la proteasa humana, de forma que la secuencia de nucleótidos que codifique la proteasa humana sea precedida por una secuencia de nucleótidos de inicio de la conversión para un inicio apropiado de la conversión, un promotor constitutivo colocado con respecto al promotor alterado sensible a la glucosa de forma que sea capaz de promover su transcripción activando el promotor, y un promotor sensible a la glucosa colocado con respecto a la secuencia de nucleótidos para codificar la proteasa humana con el fin de promover su transcripción que se activará por la glucosa.

En una configuración, la presente invención comprende un promotor para guiar la expresión constitutiva de la secuencia de nucleótidos alterada de la proinsulina humana del lugar de escisión. El promotor constitutivo puede ser cualquier promotor útil en las construcciones de la presente invención para guiar la expresión de una insulina escindible por la furina que incluya pero no se limite a: citoma-galovirus (CMV), fosfoglicerato cinasa (PGK) y factor de elongación 1 (EF1). Otros promotores útiles en las construcciones de la invención se determinarán mediante métodos conocidos, como el radioinmunoanálisis de insulina. El promotor constitutivo se une operativamente a un amplificador, como el promotor "LTR" que eleva los niveles de su transcripción. Sin embargo, dicho promotor-amplificador se puede evitar cuando se desea una construcción no vírica. La expresión de la proinsulina humana alterada se puede mejorar además por poliadenilación del extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana alterada.

La proteasa humana que comprende los lugares de escisión de la proteasa de proinsulina humana alterada es preferiblemente una proteasa de serina tipo la subtilisina, preferiblemente la furina. La expresión de la proteasa humana se puede mejorar de forma significativa incorporando una secuencia de nucleótidos de inicio de la conversión colocada en 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa de serina tipo subtilisina de manera que mejora la conversión. Una secuencia de nucleótidos de inicio de la conversión preferida es un nucleótido que codifica la secuencia de consenso de Kozak o una variante de la misma. La adición de poly-A al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica la serina tipo subtilisina humana se ha considerado también para mejorar la expresión.

Un promotor regulado por la glucosa preferido es un promotor del factor de crecimiento transformador. El promotor TGF- α ha resultado ser especialmente útil en la expresión regulada de la glucosa de las proteasas de serina humanas tipo la subtilisina, en particular la furina.

La construcción comprende preferiblemente una secuencia de nucleótidos que codifica un producto que permite la selección fácil de células transformadas. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica la neomycin fosfotransferasa ("Neo") se puede incorporar a la construcción permitiendo la selección de células transformadas por el crecimiento en un medio que contiene neomicina. La conversión Neo se puede promover mediante un promotor, como el promotor del virus simian 40 (SV40). La actividad del promotor se puede incrementar de un modo favorable por la unión operativa del promotor a un promotor/amplificador como el LTR (secuencias de LTR se evitarán cuando se desee una construcción no vírica). La poliadenilación en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el Neo se puede emplear para incrementar la expresión del Neo.

Según entendería el experto en la materia, el orden de las secuencias de nucleótidos y promotor en las construcciones de la presente invención se puede modificar, por ejemplo, la expresión del marcador puede ser guiada por el 5'LTR o el SV40, es decir, pLChl*ThFSN ó pLNChl*ThF.

3. Expresión de insulina en estirpes celulares transformadas

Las construcciones de ácido nucleico anteriormente descritas se pueden usar para transformar células con el fin de crear insulina que exprese las estirpes celulares. En general, se puede emplear cualquier sistema o vector capaz de expresar los polipéptidos de la construcción de ácido nucleico. La introducción de la construcción se puede efectuar mediante cualquiera de los métodos conocidos por los expertos, tal como se ha descrito por ejemplo en Sambrook y cols., Molecular Cloning: Un Manual de laboratorio, 2d Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor N.Y.(1989). Como entendería el experto, dichos métodos incluyen sin limitación alguna, la transfección de fosfato de calcio, la transfección mediada por el dextrano DEAN, la microinyección, transfección catiónica mediada por lípidos, Electroporación, transducción, carga del raspado, introducción balística o infección.

La proinsulina humana puede verse alterada en sus lugares de escisión de la proteasa usando técnicas conocidas por los expertos en el tema, como una mutagénesis dirigida al lugar (usando, por ejemplo, Unique Site Elimination Mutagenesis Kit, Pharmacia). Una secuencia de ADNc humana que codifica la proinsulina se puede obtener, por ejemplo, del plásmido pCHI-I (Bell y cols., Nature 282:525(1979)) por la reacción en cadena de la polimerasa ("RCP"). Los lugares de escisión de la furina (Arg-X-(Lys/Arg)-Arg) se pueden introducir en ambas uniones B-C y C-A tal como se ha descrito en Gros y cols., Human Gene Therapy 8:2249(1997). Un cambio de His-10 a Asp en el péptido B también se realiza preferiblemente para incrementar la estabilidad del producto de insulina madura (See, Groskreutz y cols., J. Biol. Chem. 269:6241(1994)).

En una configuración preferida, la construcción es clonada en un plásmido. Los vectores de expresión víricos también se pueden usar.

Groskreutz y cols., J. Biol. Chem. 269:6241 (1994) han informado previamente que cuando una estirpe celular renal humana 293 ("HEK-293") transformada por un adenovirus, es transformada con un plásmido que codifica la proinsulina humana alterada que tiene lugares de escisión de furina, se podría obtener insulina madura, debido presumiblemente a la furina presente en la vía secretora constitutiva. Sin embargo, los autores no pudieron certificar si esta escisión era debida a la furina o a otra proteasa producida por la HEK-293, por ejemplo, la PACE4 (PACE4 es furina).

Vollenweider y cols., Diabetes 44:1075(1995), han descrito la co-transfección, usando el método de precipitación del fosfato de calcio. (Gram. y cols., Virology 52:456(1973)) Células de riñón de mono (COS-7) con un primer plásmido que codifica la proinsulina humana alterada para incorporar lugares de escisión de la furina, y un segundo plásmido

que codifica la furina de ratón. Cuando se utilizaba el primer plásmido sólo para transformar las células COS-7, la proinsulina era la forma inmunoreactiva principal detectada. Sin embargo, cuando ambos plásmidos se co-transfectaban, la insulina madura era la forma inmunoreactiva principal detectada. Cuando la co-transfección conduce a células co-transformadas que expresan la furina de proteasa exógena, la mayoría (>60%) de forma inmunoreactiva observada era insulina totalmente procesada ("madura").

Recientemente, Barry y cols., Human Gene Therapy 12:131(20 de enero, 2001) han informado de la construcción de un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana alterada en sus lugares de escisión de la proteasa para permitir la expresión de una proinsulina humana escindible por la furina, un promotor vírico LTR que conduce a la expresión constitutiva de la proinsulina humana escindida por la furina, una secuencia de nucleótidos que codifica el ADNc de furina de ratón, un promotor del factor de crecimiento transformador humano α de la transcripción del ADNc de furina de ratón, y una secuencia de nucleótidos seleccionable que codifica el fosfato de neomicina bacteriano, siendo la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos promovida de forma constitutiva por un promotor SV40 y amplificada por un promotor-amplificador LTR. Cuando dicha construcción se usaba para transformar el músculo liso vascular, las células transformadas segregaban tanto proinsulina como insulina madura. Las ratas diabéticas que reciben células que secretan insulina, transformadas con dicha construcción requieren significativamente menos insulina para obtener unos niveles normales de insulina. Se observaba un aumento de casi 3 veces en la secreción de insulina madura en un medio con un nivel bajo de glucosa en comparación con las células que crecen en un medio con nivel alto de glucosa.

La presente invención mejora enormemente los niveles de expresión de insulina madura y el grado de sensibilidad de la glucosa de las células transformadas frente a las construcciones y sistemas de Groskreutz y cols., J. Biol. Chem. 269:6241(1994), Vollenweider y cols., Diabetes 44:1075(1995) y Barry y cols., Human Gene Therapy 12:131(20 de enero, 2001).

En un aspecto de la presente invención, los inventores han descubierto de forma inesperada unos niveles de insulina: proinsulina significativamente incrementados, producidos por células transformadas con construcciones de proinsulina: furina que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina bajo el control de un promotor constitutivo, y una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana bajo el control de un promotor regulable por la glucosa.

Con respecto a la secuencia de nucleótidos de furina de murina de pLHI*TFSN (Barry y cols., Human Gene Therapy 12:131(2001)) derivada de pSVLFur (American Type Culture Collection ("ATCC")), los actuales inventores han descubierto de forma inesperada una secuencia de aproximadamente 300bp en el extremo 3' de la presunta secuencia de genes que no equivale al código para la furina de murina. Dicha secuencia de par de bases objeto de análisis se distinguía por incluir partes de la región que codifica el gen de luciferasa que comprendían un lugar de inicio ATG adicional. Se cree que la incorporación del lugar ATG extra ha disminuido la eficacia en la transcripción. La eliminación de la secuencia de aproximadamente 300bp mejoraba sustancialmente la conversión de proinsulina en insulina madura. Tras la retirada de la secuencia el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la furina de ratón producía insulina madura en las células HEK-293T a aproximadamente el mismo nivel que la misma construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana.

Otra mejora en la producción de insulina madura se podía observar al enlazar operativamente un fuerte promotor a la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina alterada, en particular el promotor CMV. La unión operativa del promotor CMV al promotor-amplificador LTR daba lugar a grandes aumentos en la producción de insulina madura con respecto a las células transformadas. El grado de este cambio era totalmente inesperado (superior a 100 veces).

Volviendo a la figura 1 se observa un vector de expresión de la presente invención (conocido como pLChl*ThFSN) útil para transformar células donde:

- L es un promotor-amplificador de 5'LTR;
- C es un promotor de CMV
- hl* es un ADNc que codifica la proinsulina humana alterada de manera que tiene lugares de escisión de la furina en sus uniones B-C y C-A y lleva una variante H10D;
- T es un promotor de TGF- α humano o de murina;
- hF es una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana;
- S es un promotor de SV40; y
- N es una secuencia de nucleótidos que codifica la neomicin fosfotransferasa, un gen marcador seleccionable.

Como se puede ver en la tabla I, el vector de expresión de la figura 1 cuando se transfectaba en células HEK-293T que crecían en DMEM con un suplemento de un 10% de un medio de FBS daba lugar a una concentración de insulina madura en el medio que aumentaba en dos órdenes de magnitud si se compara con el vector de Barry y cols. (Human Gene Therapy 12:131(2001)) siempre que dicha construcción se diseñaba para expresar la furina humana o de murina. Una representación en forma de diagrama del pLhl*TFSN se fija cuarta en la fig. 3, donde la INS es una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana alterada para tener los lugares escindibles por la furina en sus uniones B-C y C-A y tener una variante H10D. Lafurina es la secuencia de nucleótidos para la furina humana y el Peor es la secuencia de nucleótidos que codifica la neomicin fosfotransferasa.

TABLA 1

VECTOR	CONCENTRACIÓN DE INSULINA EN EL MEDIO
pLhl*TmFSN	17 μ lU/ml
pLhl*ThFSN	12 μ lU/ml
pLChl*ThFSN	1360 μ lU/ml
pLChl*ThFSN	1653 μ lU/ml
pLNChl*6 (madre , no furina)	14 μ lU/ml
pLNChl*6,1	299 μ lU/ml
pLNChl*6,2	316 μ lU/ml
pLNChl*6,4	305 μ lU/ml
pLNChl*6,6	589 μ lU/ml

La figura 2 ilustra un plásmido de expresión de la presente invención (conocido como pLNChl*ThF) similar a la construcción de la figura 1, pero donde se altera el orden de los tres genes de manera que la expresión Neo es conducida por el 5'LTR y la expresión de insulina humana es guiada por el promotor CMV. Como se puede ver en la tabla I, los vectores de expresión de la figura 2 cuando se transfectan en células HEK-293T que crecen en un medio DMEM complementado con un 10% de medio de FBS, tienen una concentración de insulina madura en el medio que ha aumentado de 21 a 42 veces si se compara con el pLNChl* 6 (madre, no furina) y de al menos 17 veces si se compara con el vector de Barry y cols.

Los presentes inventores han diseñado además una construcción no vírica a la que le faltan las secuencias LTR, que produce cantidades significativamente superiores de insulina madura que los vectores retrovíricos de Barry y cols., Human Gene Therapy 12:131(2001). En dicha construcción, existe: (a) un casete de expresión de la proinsulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana alterada para incorporar lugares escindidos por la furina en sus uniones B-C y C-A, un lugar de poliadenilación 3' respecto a la secuencia de nucleótidos de proinsulina humana alterada y un promotor enlazado operativamente a la secuencia alterada de nucleótidos de proinsulina humana; (b) una casete de expresión de la furina humana que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana, capaz de escindir los lugares alterados de la proinsulina codificada por la casete de expresión de la proinsulina, un lugar de poliadenilación 3' respecto a la secuencia de nucleótidos de proinsulina humana alterada y un promotor; y (c) un casete de expresión del marcador seleccionable que comprende una secuencia de nucleótidos que consta de un marcador seleccionable, y un promotor de dicho marcador seleccionable. En una configuración el promotor que dirige la expresión de la proinsulina humana alterada es el CMV. En otra configuración, el promotor que dirige la expresión de la furina humana es TGF- α . En una configuración preferida, el marcador seleccionable es la neomicin fosfotransferasa, que permitirá que las células crezcan en un medio de cultivo que comprenda G418. En otra configuración preferida el promotor del marcador seleccionable es el SV40. Se prefiere además que la secuencia marcador seleccionable vaya seguida 3' por un lugar de poliadenilación.

Volviendo a la fig. 4, se muestra un vector de expresión de la presente invención (conocido como pcDNA-Chl*ThFSN) útil para transformar las células donde:

- C es un promotor de CMV
- hl* es el ADNc que codifica la proinsulina humana alterada de manera que presenta lugares que escinde la furina en sus uniones B-C y C-A y lleva una variante H10D;
- T es un promotor de TGF- α humano o de murina;
- hF es una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana;
- S es un promotor de SV40;
- N es una secuencia de nucleótidos que codifica la neomicin fosfotransferasa, un gen marcador seleccionable; y
- SV40 polyA son secuencias de poliadenilación.

Como se puede ver en la tabla II, mientras no existían lugares LTR en la construcción que sirvieran como promotores/amplificadores víricos y lugares de inicio de la transcripción, la producción de insulina en las células HEK-293T en el medio de cultivo tisular era del orden de tres veces la observada con la construcción de Barry y cols. (Human Gene Therapy 12:131(2001)) siempre que la construcción se preparara para expresar la furina humana o de murina.

TABLA II

VECTOR	CONCENTRACIÓN DE INSULINA EN EL MEDIO
pLhl*TmFSN	17 μ lU/ml
pLhl*ThFSN	12 μ lU/ml
pcDNACHl*ThFSN	40 μ lU/ml
pcDNACHl*ThFSN	59 μ lU/ml
pcDNACHl*ThFSN	60 μ lU/ml

Los actuales inventores han diseñado además construcciones no víricas que comprenden un casete de expresión de la proinsulina y construcciones no víricas que comprenden un casete de expresión de la furina humana (fig. 5). En una construcción de proinsulina, la casete de expresión de la proinsulina comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana alterada para incorporar los lugares escindidos por la furina en sus uniones B-C y C-A, un lugar de poliadenilación 3' respecto a la secuencia de nucleótidos de proinsulina humana alterada, un promotor enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos de proinsulina humana alterada; y una o más casetes de expresión del marcador que comprenden una secuencia de nucleótidos que consta de un marcador seleccionable, y un promotor de dicho marcador seleccionable. En una construcción de furina, el casete de expresión de la furina humana comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana capaz de escindir los lugares alterados de la proinsulina codificada por el casete de expresión de la proinsulina, un lugar de poliadenilación 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana y un promotor; y uno o más casetes de expresión del marcador seleccionable que comprenden una secuencia de nucleótidos que comprende un marcador seleccionable, y un promotor de dicho marcador. Preferiblemente, las construcciones comprenden uno o más lugares de poliadenilación.

Las construcciones que comprenden la casete de proinsulina alterada pueden ser útiles para determinar la capacidad de un promotor en particular para guiar la expresión del gen de insulina. Además, la construcción que comprende el casete de proinsulina alterado o la furina puede ser usada para añadir copias de uno u otro gen a las células seleccionadas. Por ejemplo, se pueden seleccionar células por su resistencia a un marcador, por ejemplo, denticina (G418), conferida por la transfección del plásmido hl* y un marcador diferente, por ejemplo, la higromicina B, conferida por la transfección del plásmido de furina. Los plásmidos se pueden crear de manera que el o los marcadores seleccionables en cada construcción puedan ser reemplazados por un marcador alternativo. Los marcadores seleccionables incluirán pero no se limitarán a: denticina, higromicina B, puromicina, zeocina y ampicilina. Los plásmidos que comprenden la casete de proinsulina alterada o la furina pueden ser transfectados en células ya resistentes a un marcador diferente para generar células que multipliquen copias del hl* o de genes de furina.

ES 2 304 444 T3

Como se puede ver en la tabla III, la expresión de insulina se guiaba por los promotores siguientes: CMV, fosfoglicerato quinasa (PGK) y factor de elongación 1 (EF1), mientras que el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el promotor de insulina humana (HIP) y la fosfoenolpiruvato cinasa (PEP) tenían poco efecto.

TABLA III

VECTOR	Conc.insulina en un medio μ IU/ml U2OS, 24h	Conc.insulina en un medio μ IU/ml U2OS, 48h	Conc.insulina en un medio μ IU/ml HEK- 293T, 24h	Conc.insulina en un medio μ IU/ml HEK- 293T, 48h
pEGFP (N)	<4	<4	<4	<4
pCMVhl* (N)	110	199	35	436
pPGKhl* (N)	111	198	28	366
pEF1hl* (N)	77	139	324	3653
pHIPhl* (N)	<4	<4	<4	<4
pPEPhl* (N)	<4	<4	<4	<4

Ejemplo 1

Generación de pLhl*ThFSN

Un vector que comprende el gen de furina de murina, pLhl*TFSN (fig. 3) se obtenía de William R. A. Osborne, The University of Washington, Seattle, W.A. El ADNc de furina humana se compraba en ATCC.

En pLhl*TFSN, la insulina humana escindible por furina (hl*) es conducida por el 5'LTR (L) vírico. La secuencia de codificación natural de la insulina humana se altera para insertar los lugares que serán escindidos por furina y obtener la insulina que se enlaza con mayor afinidad a los receptores de insulina (variante H10D). La insulina alterada, conocida como hl*, es producida de forma constitutiva como pro-insulina biológicamente inactiva, que es procesada para ser insulina activa mediante el tratamiento proteolítico por furina de murina (mF). La expresión de mF depende de la concentración de glucosa puesto que es conducida por el promotor TGF-alfa sensible a la glucosa. Este vector también contiene el gen de neomicin fosfotransferasa dirigido por el promotor SV40 para seleccionar las células transducidas.

Con la secuencia de pLhl*TFSN se observaba que existía una secuencia no definida antes del primer lugar de inicio (ATG) de mF. Posteriormente se descubría que en esta secuencia no definida existen al menos dos codones ATG antes de iniciar el ATG para la conversión de furina. Esto añade más marcos de lectura abiertos (ORFs) que están bajo el control del promotor TGF-alfa. Esto podría conducir potencialmente a la expresión subóptima de mF. Se ha llevado a cabo una estrategia para eliminar esta secuencia no definida y sustituir mF por hF.

El pLhl*TFSN se digería con BamHI y Sall. Se obtenían cinco (5) fragmentos: **6226:pLhl*TFSN:BamHI(6021)-Sall(2013)**; 2406:pLhl*TFSN:BamHI(2814)-BamHI(5220); 801:pLhl*TFSN:BamHI(5220)-BamHI(6021); 778:pLhl*TFSN: Sall(2036)-BamHI(2814);23:pLhl*TFSN:Sall(2013) -Sall(2036). El fragmento 6226bp que contiene SN, 3' LTR, la columna retroviral y 5'LTR y se aislaba la insulina humana escindible por furina. Luego el fragmento se desfosforilaba para su uso como un vector.

La furina humana se amplificaba en PCR usando ADNc de furina humana del ATCC como un patrón:

• hfurina (cebador delantero)(un cebador que contiene Sall(GTC GAC) y SnaBI (lugares de restricción (TAC GTA)) así como secuencia Kozak, CCACCATGG:

5' AAA GTC GAC TAC GTA CCA CCA TGG AGC TGA GGC CCT T 3' (SEQ ID NO: 1)

ES 2 304 444 T3

• hfurina (cebador invertido)(un cebador que contiene BclI(TGA TCA y BsiWI (lugares de restricción (CGT ACG)):

5' AAA TGA TCA CGT ACG TCA GAG GGC GCT CTG GTC TT 3' (SEQ ID NO: 2)

El producto se amplificaba en PCR y se purificaba y luego se digería con BclI y SalI, y se subclonaba en el fragmento 6226 digerido- BamHI/SalI de pLhl*TFSN generado antes, para generar un plásmido pLhl*hFSN, sin el promotor TGF-alfa. Este se digería con ClaI/SalI o ClaI/SnaBI, se purificaba en gel y la fosfatasa se utilizaba como fragmento receptor en la etapa siguiente.

El promotor TGF-alfa se amplificaba en PCR usando pLhl*TFSN como un patrón o molde.

• TGFp1 (cebador delantero) (un cebador que contiene los lugares de restricción ClaI (ATC GAT) y HpaI(GTT ACC):

5' AAA ATC GAT GTT AAC AGC TCC GGG TCA CTG GAG AA 3' (SEQ ID NO: 3)

• TGFp2 (cebador invertido) (un cebador que contiene los lugares de restricción SalI (GTC GAC) y SnaBI(TAC GTA):

5' AAA GTC GAC TAC GTA GGC GGA GCG CCG CGG TG 3' (SEQ ID NO: 4)

El producto se amplificaba en PCR y se purificaba y luego se digería con ClaI y SalI o ClaI y SnaBI. Luego se subclonaba en el ClaI/SalI ó ClaI/SnaBI- pLhl*hFSN, para generar un plásmido pLhl*ThFSN (fig.3). La construcción se generaba usando esta estrategia, se revisaba la secuencia y se verificaba la producción de insulina en las células HEK-293T en las transfecciones efímeras. Los resultados de las transfecciones efímeras se han descrito en la tabla I.

Ejemplo 2

*Generación de pLChl*ThFSN*

La insulina mutante humana se subclonaba en el vector pcDNA 3.1 (InVitrogen), en el cual la insulina humana se expresaba bajo el promotor (pcDNACHl*pA) del citomegalovirus (CMV), conteniendo el vector un lugar polyA en el extremo 3'. Esta construcción, cuando se expresaba de forma efímera en las células HEK-293T, producía niveles muy superiores de la producción de insulina. El vector pLhl*ThFSN se modificaba luego para guiar la expresión de la insulina humana bajo el control del promotor CMV tal como sigue:

pcDNA-Chl* se digería con MfeI y EcoRV. Este digesto resultaba en dos fragmentos: 4642:pcDNA-Chl*:EcoRV (1312)-MfeI(162); y **1150:pcDNA-Chl*:MieI(162)-EcoRV(1312)**. El fragmento 1150 bp se aislaba, dicho fragmento contenía el promotor CMV e insulina humana.

pLhl*ThFSN se digería con EcoRI, que daba lugar a dos fragmentos tal como sigue: **9360:pLhl*ThFSN(BI6.1.1):HpaI(2012)-EcoRI(1645)**; y 367:pLhl*ThFSN(BI6.1.1):EcoRI(1645)-HpaI(2012). El fragmento 9360 bp se aislaba, dicho fragmento contenía todo el vector que excluye la insulina humana. Este fragmento se desfosforilaba y se usaba como fragmento receptor para clonar en el fragmento 1150 bp de pcDNACHl*. La construcción generada usando esta estrategia se designaba pLChl*ThFSN. La secuencia se revisaba y se comprobaba la producción de insulina en las células HEK-293T en las transfecciones efímeras. Los resultados de las transfecciones efímeras se describen en la tabla I.

Ejemplo 3

Generación de un vector no vírico

Para expresar los tres genes en un vector no vírico cada secuencia de codificación se flanqueaba por una señal polyA en el extremo 3' de la secuencia codificadora.

La furina humana amplificada en PCR se subclonaba en pcDNA3.1 para producir pcDNAhF. La furina humana se amplificaba en PCR usando ADNc de furina humana del ATCC como patrón.

ES 2 304 444 T3

Los cebadores eran los siguientes:

• hfurina (cebador delantero)(el cebador contiene Sall(GTC GAC) y SnaB1 (lugares de restricción (TAC GTA) así como secuencia Kozak, CCACCATGG:

5' AAA GTC GAC TAC GTA CCA CCA TGG AGC TGA GGC CCT T 3' (SEQ ID NO: 1)

• hfurina (cebador invertido)(este cebador contiene BclI(TGA TCA) y BsiWI (lugares de restricción (CGT ACG):

5' AAA TGA TCA CGT ACG TCA GAG GGC GCT CTG GTC TT 3' (SEQ ID NO: 2)

El producto amplificado en PCR se purificaba y luego se digería con BclI y SnaB1 que se subclonaba en el BamHI/EcoRV- pcDNA3.1 digerido, para generar una construcción pcDNAhF.

El promotor "poly-A-TGF-alfa" se subclonaba en pcDNACHl*. El pCMVhl*ThFSN3.1 se digería con Sall, lo que daba lugar a los siguientes fragmentos:

7000:pCMVM*ThF SN 3.1:Sall(2670)-Sall(1074)

1596:pCMVhl*ThF SN 3.1:Sall(1074)-Sall(2670)

El fragmento 1569 bp, que incluía el lugar SV40 polyA y el promotor TGF-alfa, se aislaba. El fragmento 1596bp se subclonaba luego en pcDNA Chl* en una clonación no direccional (es decir, el añadido puede ir en cualquier dirección, que pueda ser identificada por los digestos de restricción)para dar lugar a pcDNACHl*T, con un lugar polyA entre hl* y T.

El pcDNAhF de antes se digería con NotI y Afill, lo que daba fragmentos del modo siguiente:

5356:pcDNAhF2:Afill(3368)-NotI(928)

2440:pcDNAhF2:NotI(928)-Afill(3368)

Se aislaba el fragmento 2440bp que contiene la región codificadora de furina.

El pcDNACHl*T se digería con NotI y Afill para abrir el vector, la fosfatasa, y el fragmento de furina 2440 bp se subclonaba en el vector para producir pcDNACHl*ThF(fig. 4), con lugares polyA en el extremo 3' y de cada hl* y hF. El SN-poly presente en el original vector, el pcDNA3.1 está en el extremo 3' de hF. El vector se analizaba mediante digestos de restricción y luego se verificaba en transfecciones efímeras en células HEK-293T.

Ejemplo

Transfección efímera de la estirpe celular HEK-293T

Los reactivos Effectene (Qiagen Inc., Valencia, CA) se utilizaban para transfeccionar la célula.

Las células se contaban y ajustaban en $2,5 \times 10^5$ células/ml. Las células se colocaban en placas para células de 1,0 ml para $2,5 \times 10^5$ células/60 mm de crisol y el volumen del medio se enrasaba a 4,0 ml. Se dejaba que las células se adhirieran durante la noche hasta una confluencia del 40-60%. El medio se retiraba de las células para reducir el volumen a 1,5 ml en la placa. Un μg de ADN se añadía a un total de 150 μl de tampón de condensación de ADN (tampón EC, Qiagen Inc.) en un microtubo estéril. Ocho microlitros de amplificador (Qiagen Inc.)se añadían al tampón ADN/EC, se inclinaba durante 1 segundo y se incubaba de 2-5 minutos a temperatura ambiente (RT).

Veinticinco microlitros de Effectene™ se añadían a cada tubo y se agitaba durante 10 segundos. y los tubos se colocaban a temperatura ambiente durante 5-10 min. Luego se añadía un mililitro de medio y la mezcla resultante se pipeteaba arriba y abajo 2 veces; la mezcla de ADN se añadía gota a gota sobre las células. El crisol se agitaba y las células volvían a 37°C/5% CO₂. Los complejos se retiraban a las 4 horas, y se añadían 2 ml de medio nuevo. Las células se cultivaban durante 24 y 48 horas y se evaluaba la insulina en los sobrenadantes.

Tal como lo entienden los expertos en la materia, muchas estirpes celulares manipuladas genéticamente no segregan suficiente insulina para ser terapéuticas o bien las producciones de insulina no se regulan de forma apropiada. La mayoría de líneas celulares que han mostrado algún grado de producción de insulina regulada por la glucosa han empleado un promotor sensible a la glucosa para regular de forma transcripcional el gen de insulina directamente. El método de los actuales inventores ha sido el de manipular las células usando los vectores descritos antes para regular la producción de insulina al nivel del tratamiento de la pro-insulina antes que al nivel de la transcripción de insulina. Las células transformadas con dichas construcciones no solamente segregan insulina madura, sino que además producen el péptido C que se sabe posee vasculatura y funciones neurológicas.

Debido a las desventajas de la inmunosupresión que se lleva a cabo en el modelo anterior para prevenir la acción de defensa del huésped contra las células exógenas que producen insulina, los actuales inventores han decidido percibir las estirpes celulares humanas que se adaptan al crecimiento en unos dispositivos de inmunoaislamiento.

Los dispositivos de inmunoaislamiento son aparatos diseñados para ser implantados en un organismo que tienen una estructura para alojar células de manera que permiten la difusión de nutrientes y el contacto de los factores terapéuticos segregados por el huésped con las células pero eso protege las células del ataque inmunitario del huésped. Se han propuesto numerosos aparatos de inmunoaislamiento. La patente americana nr. 5.869.077 a Dionea y cols. (Fecha de edición: 9 de febrero de 1999) describe un vehículo biocompatible inmunoaislante adecuado para el implante a largo plazo en individuos que consta de un núcleo que contiene una mitad biológica, como una célula, suspendida en un medio líquido o inmovilizada en un hidrogel o matriz extracelular y una región periférica de matriz o membrana preselectiva que no contiene la mitad biológica aislada, y que protege la mitad biológica del ataque inmunológico pero tiene un peso molecular medio (preferiblemente 50 kD a 2000 kD) que permite el paso de moléculas entre el paciente y el núcleo. La cubierta de dicho aparato se puede fabricar a base de materiales como el cloruro de polivinilo, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato, polivinildifluoruro, poliolefinas, polisulfonas y celulosas. Del mismo modo, la PCT/US99/08628 a Powers y cols. muestra dispositivos de inmunoaislamiento que comprenden revestimientos de alginato y células sembradas en fibras semipermeables. Un dispositivo disponible en el comercio para el inmunoaislamiento implantable es TheraCyte® (TheraCyte Inc., Irving, California). El dispositivo se ha diseñado para el implante subcutáneo o intraperitoneal y se dice que facilita los trasplantes de células xenogénicas sin inmunosupresión y protege los trasplantes xenogénicos con la inmunosupresión convencional. El dispositivo consta de una membrana vascularizante externa de politetrafluoretileno (PTFE) de 15 μm de grosor y que tiene un tamaño de poro de 5 μm , y de una membrana interna de PTFE, impermeable a la célula, de 30 μm de grosor y que tiene un tamaño de poro de 0,4 μm . La membrana externa se dice que es vascularizante, y por ello previene el problema frecuente de la encapsulación fibrótica que habitualmente hallamos en los dispositivos bioimplantables.

Los actuales inventores han identificado numerosas estirpes celulares humanas que se adaptan bien al cultivo *in vitro* y a la modificación genética, y que se adaptan también al crecimiento en dispositivos de inmunoaislamiento. Estas células comprenden pero no se limitan a:

TABLA IV

NOMBRE DE LA CELULA	TIPO DE TEJIDO	NOMBRE DE LA CELULA	TIPO DE TEJIDO
HEPM	Mesénquima paratatal	CRL-1486	Fibroblasto
U-20S	Hueso	HTB-96	Epitelial
A-498	Riñón	HTB-44	Epitelial
NCl-H441	Pulmón	HTB-174	Epitelial
SHP-77	Pulmón	CRL-2195	Epitelial

Se prefiere que estas líneas celulares se cultiven durante la modificación genética conforme a sus requisitos individuales tal como se indica en ATCC.

REIVINDICACIONES

1. Un vector recombinante para transformar células que produzcan insulina humana madura, de forma que dicho vector comprenda:

a. un promotor/amplificador LTR;

b. un segundo promotor enlazado operativamente a dicho primer promotor LTR;

c. una secuencia de nucleótidos que codifique la proinsulina humana que tenga lugares a escindir por la furina en sus uniones B-C y C-A.

d. una secuencia de nucleótidos que codifique la furina humana, estando dicha secuencia guiada por dicho promotor regulable por glucosa.

2. El vector recombinante de la reivindicación 1 en el que dicho segundo promotor se selecciona del grupo formado por: citomegalovirus (CMV), fosfoglicerato cinasa (PGK) y el factor de elongación 1 (EF1).

3. El vector recombinante de la reivindicación 1 en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana codifica una proinsulina humana seleccionada del grupo formado por proinsulina humana natural y proinsulina humana que tiene una variante H10D en comparación con la proinsulina humana de origen natural.

4. El vector recombinante de la reivindicación 1 en el que el promotor regulable por glucosa es un promotor de TGF-alfa.

5. El vector recombinante de la reivindicación 1 que además comprende:

un promotor constitutivo

un gen marcador seleccionable unido operativamente a dicho promotor constitutivo; y

un segundo promotor/amplificador LTR enlazado operativamente a dicho gen marcador seleccionable;

en el que dicho promotor constitutivo y el promotor/amplificador LTR guían la expresión constitutiva de dicho gen marcador seleccionable.

6. El vector recombinante de la reivindicación 1 en el que dicho gen marcador seleccionable es la neomicin fosfo-transferasa.

7. El vector recombinante de la reivindicación 5 en el que dicho promotor constitutivo es el promotor SV40.

8. Un sistema de expresión para inducir la producción de insulina en una célula, de forma que dicho sistema comprende:

(a) una primera casete de expresión que comprende:

1. un promotor/amplificador LTR

2. un promotor CMV unido operativamente a dicho primer promotor LTR; y

3. una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana que tiene lugares escindidos por la furina en sus uniones B-C y C-A, de forma que la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de proinsulina humana es conducida por dicho primer promotor LTR y dicho promotor CMV.

(b) una segunda casete de expresión que comprende:

1. un promotor regulable por glucosa, y

2. una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana, de forma que dicha secuencia de nucleótidos de furina humana es conducida por dicho promotor regulable por glucosa.

(c) una tercera casete de expresión que comprende:

1. una secuencia de nucleótidos que codifica un gen marcador seleccionable; y

2. un promotor constitutivo de dicho gen marcador seleccionable enlazado operativamente a dicho gen marcador seleccionable.

9. El sistema de expresión de la reivindicación 8 donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana de dicha primera casete de expresión codifica una proinsulina humana seleccionada del grupo formado por: proinsulina humana natural o proinsulina humana que tiene una variante H10D en comparación con la proinsulina humana de origen natural.
10. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que la primera y segunda casete de expresión están enlazadas.
11. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que la primera y tercera casete de expresión están enlazadas.
12. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que la segunda y tercera casete de expresión están enlazadas.
13. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que la primera, segunda y tercera casete de expresión están enlazadas.
14. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que la primera y segunda casete de expresión están empaquetadas en replicones distintos, y en la que dicha primera y segunda casete de expresión están unidas a dicha tercera casete de expresión pero comprenden al menos genes marcadores seleccionables diferentes de dicha tercera casete de expresión.
15. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que dicha tercera casete de expresión comprende además un promotor/amplificador LTR.
16. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que dicho promotor regulable por glucosa de dicha segunda casete de expresión es el promotor de TGF-alfa.
17. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que dicho gen marcador seleccionable de dicha tercera casete de expresión es un nucleótido que codifica la neomicin fosfotransferasa.
18. El sistema de expresión de la reivindicación 8 en el que dicho promotor constitutivo de dicho gen marcador seleccionable de dicha tercera casete de expresión es el promotor de SV40.
19. Un vector recombinante que contiene no-LTR para transformar células que produzcan proinsulina humana, de forma que dicho vector comprenda:
 - un promotor;
 - una secuencia de nucleótidos que codifique la proinsulina humana que tiene lugares a escindir por la furina en sus uniones B-C y C-A, de forma que la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de la proinsulina humana es guiada por dicho promotor;
 - una secuencia de poliadenilación enlazada a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana;
 - un promotor regulable por glucosa;
 - una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana, de forma que dicha secuencia de nucleótidos de furina humana es guiada por dicho promotor regulable por glucosa; y
 - una secuencia de poliadenilación enlazada en 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana.
20. El vector recombinante de la reivindicación 19 en el que dicho promotor se elige del grupo formado por el citomegalovirus (CMV), la fosfoglicerato cinasa (PGK) y el factor de elongación 1 (EF1).
21. El vector recombinante de la reivindicación 20 en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana codifica una proinsulina seleccionada del grupo formado por: proinsulina humana natural y proinsulina humana que tiene una variante H10D en comparación con la proinsulina humana natural.
22. El vector recombinante de la reivindicación 19 en el que el promotor regulable por glucosa es un promotor de TGF-alfa.
23. El vector recombinante de la reivindicación 19 que además comprende:
 - un promotor constitutivo; y
 - un gen marcador seleccionable enlazado operativamente a dicho promotor constitutivo.
24. El vector recombinante de la reivindicación 23 en el que dicho gen marcador seleccionable es la neomicin fosfotransferasa.

25. El vector recombinante de la reivindicación 23 en el que dicho promotor constitutivo es el promotor de SV40.

26. El vector recombinante de la reivindicación 23 que comprende una secuencia de poliadenilación enlazada en 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la neomicin fosfotransferasa.

27. Un sistema de expresión para inducir la producción de insulina en una célula, de forma que dicho sistema comprende:

(a) una primera casete de expresión que consta de:

1. un promotor CMV;
2. una secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana que tiene lugares a escindir por la furina en sus uniones B-C y C-A, de forma que la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de la proinsulina humana es guiada por dicho promotor CMV; y
3. una secuencia de poliadenilación 3' enlazada a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana;

(b) una segunda casete de expresión que consta de:

1. un promotor regulable por glucosa; y
2. una secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana, de forma que dicha secuencia de nucleótidos de furina humana es guiada por dicho promotor regulable por glucosa; y
3. una secuencia de poliadenilación enlazada en 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la furina humana.

(c) una tercera casete de expresión que consta de:

1. una secuencia de nucleótidos que codifica un gen marcador seleccionable;
2. un promotor constitutivo de dicho gen marcador seleccionable enlazado operativamente a dicho gen marcador seleccionable; y
3. una secuencia poliadenilada 3' enlazada a dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicho gen marcador seleccionable.

28. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana de dicha primera casete de expresión codifica una proinsulina humana elegida del grupo formado por: proinsulina humana natural y proinsulina humana que tiene una variante J10D en comparación con la proinsulina humana de origen natural.

29. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicha primera y segunda casete de expresión están enlazadas.

30. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicha primera y tercera casete de expresión están enlazadas.

31. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicha segunda y tercera casete de expresión están enlazadas.

32. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicha primera, segunda y tercera casete de expresión están enlazadas.

33. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicha primera, segunda y tercera casete de expresión están empaquetadas en vectores de transformación distintos.

34. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicho promotor regulable por glucosa de dicha segunda casete de expresión es el promotor de TGF-alfa.

35. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicho gen marcador seleccionable de dicha tercera casete de expresión es un nucleótido que codifica la neomicin fosfotransferasa.

36. El sistema de expresión de la reivindicación 27 en el que dicho promotor constitutivo de dicho gen marcador seleccionable de dicha tercera casete de expresión es el promotor del SV40.

37. Una célula transformada para producir insulina y que comprende el vector recombinante de la reivindicación 1.
38. Una célula transformada para producir insulina y que comprende el vector recombinante de la reivindicación 5.
39. Una célula transformada para producir insulina y que comprende el sistema de expresión de la reivindicación 8.
40. Una célula transformada para producir insulina y que comprende el vector recombinante que contiene no-LTR de la reivindicación 19.
41. Una célula transformada para producir insulina y que comprende el vector recombinante que contiene no-LTR de la reivindicación 23.
42. Una célula transformada para producir insulina y que comprende el sistema de expresión de la reivindicación 27.
43. La célula manipulada genéticamente de una de las reivindicaciones 37 a 42 en la que el gen de proinsulina humana es el ADNc.
44. La célula manipulada genéticamente de una de las reivindicaciones 37 a 42 en la que el gen de furina humana recombinante es el ADNc.
45. La célula manipulada genéticamente de una de las reivindicaciones 37 a 42 en la que la célula que es transformada se elige del grupo formado por HEPM, U-2 OS, A-498, NCI-H441, SHP-77.
46. Una célula derivada de la célula manipulada genéticamente de la reivindicación 44 y que comprende el vector recombinante o el sistema de expresión al que se hace referencia en cualquiera de las reivindicaciones 37-42.
47. Uso de células manipuladas genéticamente en un dispositivo inmunoaislante, donde dichas células son manipuladas al introducir un primer segmento de ADN que consta de un gen estructural que codifica la proinsulina humana que tiene lugares a escindir por la furina en sus uniones B-C y C-A y un promotor constitutivo enlazado operativamente a dicho gen estructural de proinsulina, siendo la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de proinsulina humana conducida por el promotor/amplificador de LTR y por dicho promotor constitutivo, o bien comprendiendo una secuencia de poliadenilación enlazada 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana, y un segundo segmento de ADN que comprende un gen estructural que codifica la furina humana y un promotor regulable por glucosa enlazado operativamente a dicho gen estructural de furina, en el que dichos primer y segundo segmento de ADN son eficaces para la expresión de una cantidad eficaz terapéuticamente de insulina para preparar un medicamento para tratar la diabetes mellitus.
48. El uso de la reivindicación 47 en la que dichos segmentos de ADN son una parte integral de uno o más vectores.
49. El uso de la reivindicación 47 en la que dichos segmentos de ADN se introducen a dichos pacientes en las células, habiendo sido tratadas las células *in vitro*, para incorporar dichos segmentos de ADN.
50. El uso de la reivindicación 49 en la que dichas células se introducen en el paciente por medio de una fábrica de células preferible desde el punto de vista inmunológico.
51. El uso de la reivindicación 49 en la que dichas células son inyectadas directamente en un tejido de dicho paciente.
52. El uso de la reivindicación 49 en la que dichas células son introducidas en dicho paciente en un neo-órgano.
53. Uso de un ácido nucleico que codifica un gen de proinsulina humana que tiene lugares escindibles por la furina en sus uniones B-C y C-A y un promotor constitutivo enlazado operativamente a dicho gen de proinsulina humana, siendo la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de proinsulina humana guiada por un promotor/amplificador LTR y por dicho promotor constitutivo, o comprendiendo una secuencia de poliadenilación enlazada 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana, y un ácido nucleico que codifica la furina humana y un promotor regulable por glucosa enlazado operativamente a dicho gen de furina, para preparar un medicamento para tratar la diabetes mellitus en el cual dichos ácidos nucleicos se introducen en una célula; y la célula se introduce en un individuo.
54. Uso de una población celular colocada en una membrana selectivamente permeable, de forma que dicha población celular comprenda células manipuladas genéticamente que segreguen insulina como respuesta a la glucosa, de forma que las células manipuladas comprendan un ácido nucleico que codifique un gen de proinsulina humana que tenga lugares escindibles por la furina en sus uniones B-C y C-A, un promotor constitutivo enlazado operativamente a dicho gen de proinsulina humana, siendo la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de proinsulina humana

guiada por un promotor /amplificador de LTR y por dicho promotor constitutivo, o bien comprendiendo una secuencia de poliadenilación enlazada 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana, un ácido nucleico que codifique la furina humana, y un promotor regulable por glucosa enlazado a dicho gen de furina humana para preparar un medicamento que aporte una capacidad de secreción de insulina sensible a la glucosa a un mamífero.

55. Un método para fabricar insulina humana, de forma que el método consta de las etapas siguientes:

a) cultivo de una célula que segregue insulina humana, de forma que la célula comprenda un gen que codifique proinsulina humana que tenga lugares a escindir por la furina en las uniones B-C y C-A y un promotor constitutivo enlazado operativamente a dicho gen de proinsulina humana, siendo la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de proinsulina humana guiada por un promotor/amplificador de LTR y por dicho promotor constitutivo, o comprendiendo una secuencia de poliadenilación enlazada 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifique la proinsulina humana, y un gen que codifique la furina humana, en el que al menos ambos genes sean genes recombinantes introducidos en la célula por medio de un vector recombinante;

b) estímulo de dicha célula para segregar insulina;

c) recogida de la insulina segregada.

56. Un método para fabricar insulina humana, de forma que el método consta de las etapas siguientes:

a) obtención de una célula que segregue insulina humana en respuesta a la glucosa, de forma que la célula comprenda un gen que codifique proinsulina humana que tenga lugares a escindir por la furina en las uniones B-C y C-A y un promotor constitutivo enlazado operativamente a dicho gen de proinsulina humana, siendo la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de proinsulina humana guiada por un promotor/amplificador de LTR y por dicho promotor constitutivo, o comprendiendo una secuencia de poliadenilación enlazada 3' a dicha secuencia de nucleótidos que codifique la proinsulina humana, y un gen que codifique la furina humana, en el que al menos ambos genes sean genes recombinantes introducidos en la célula por medio de un vector recombinante;

b) crecimiento de la célula de la etapa a) en un medio de cultivo;

c) puesta en contacto de dicha célula con un tampón que contiene glucosa durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que dicha célula responda;

d) recogida del medio que ha sido puesto en contacto con dicha célula; y

e) purificación de la insulina humana del medio recolectado.

Figura 1 de 5

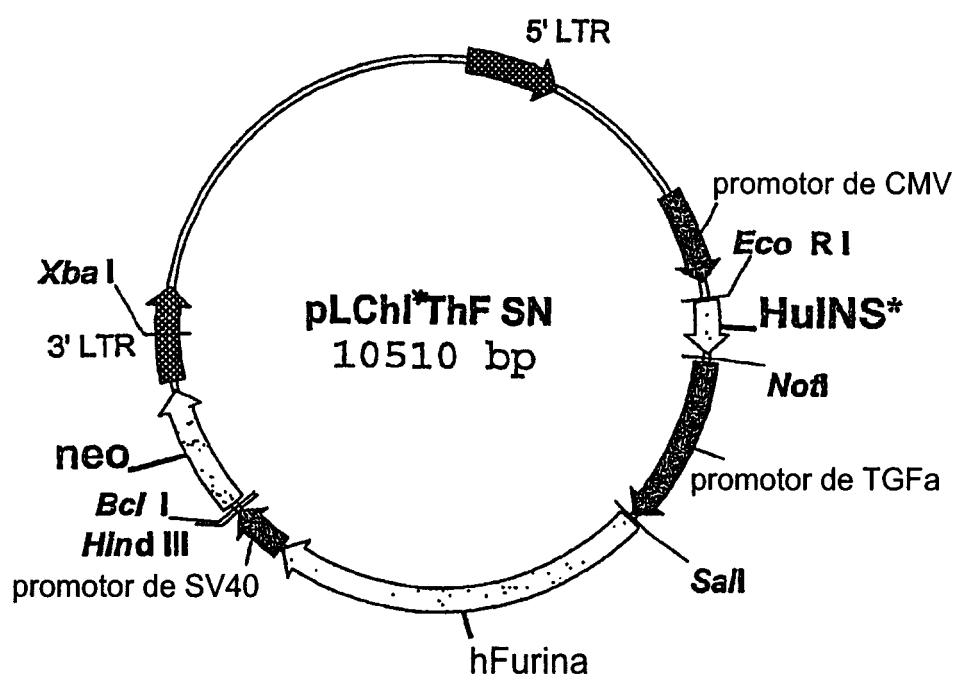


Figura 2 de 5

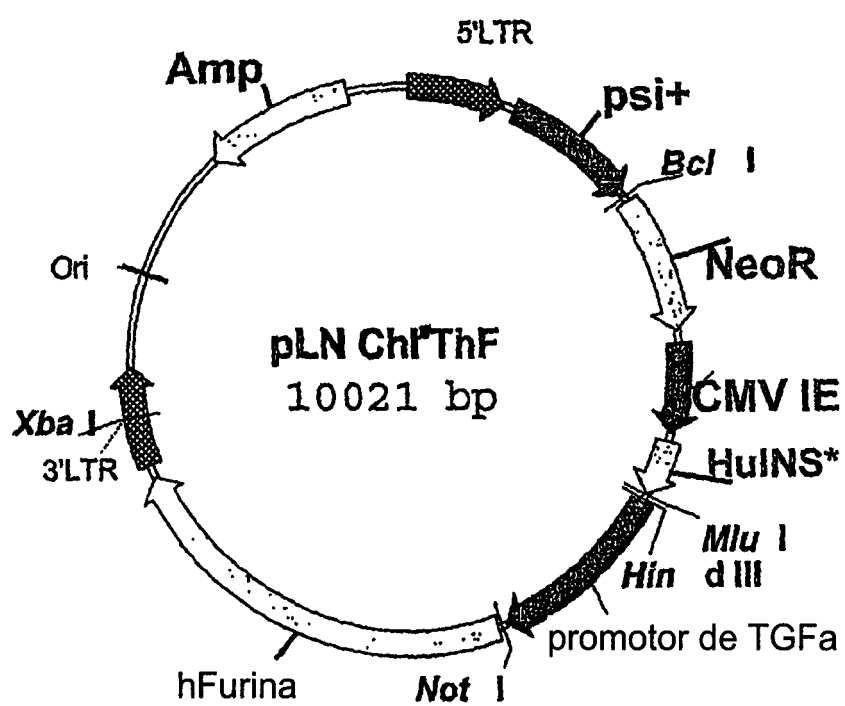


Figura 3 de 3

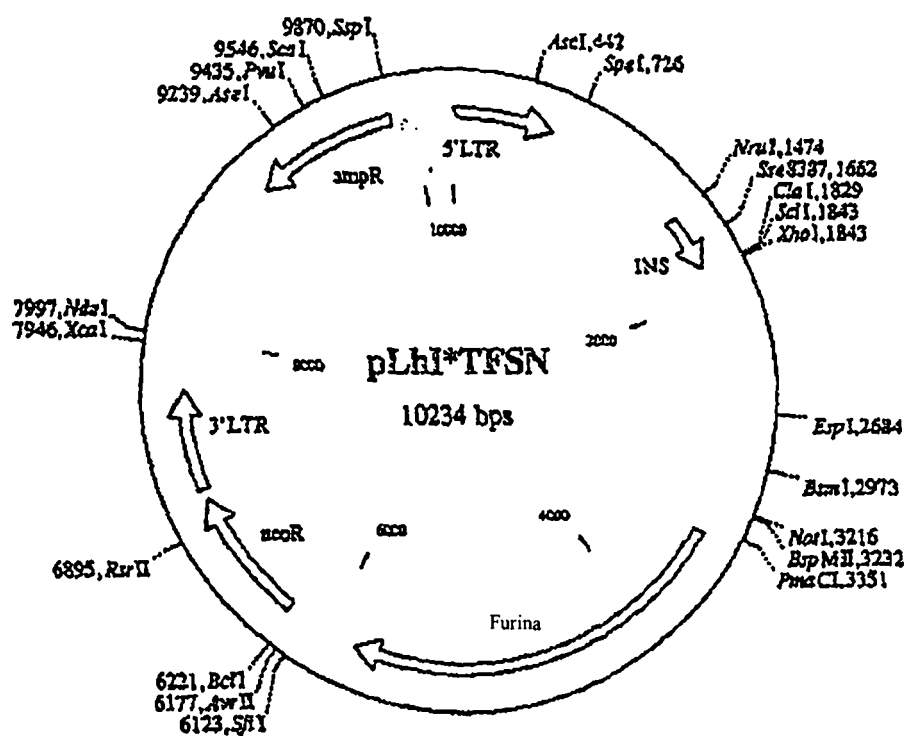


Figura 4 de 5

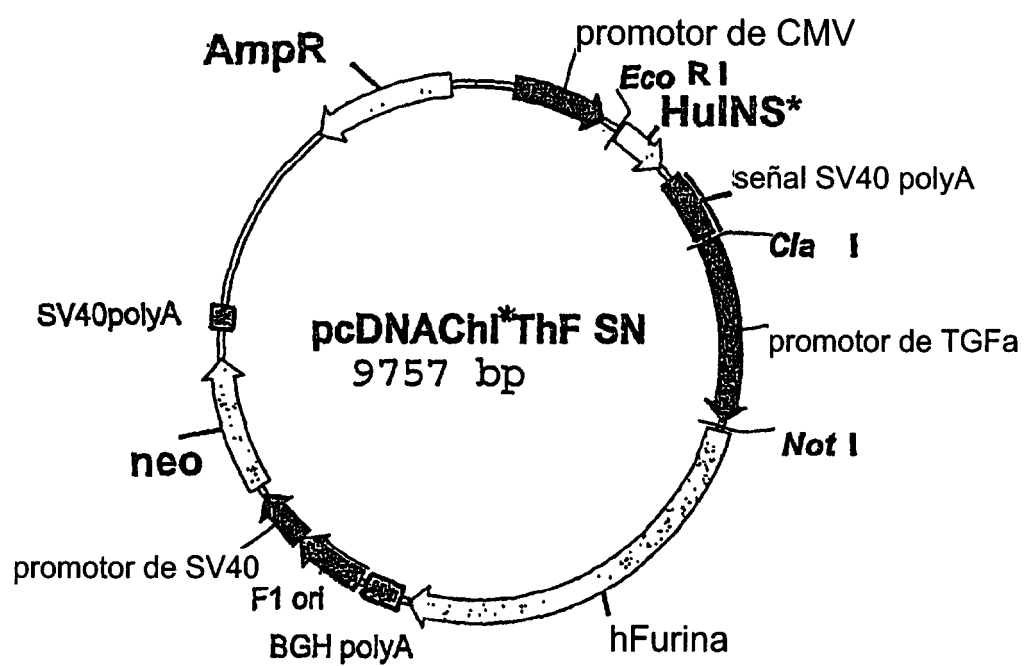
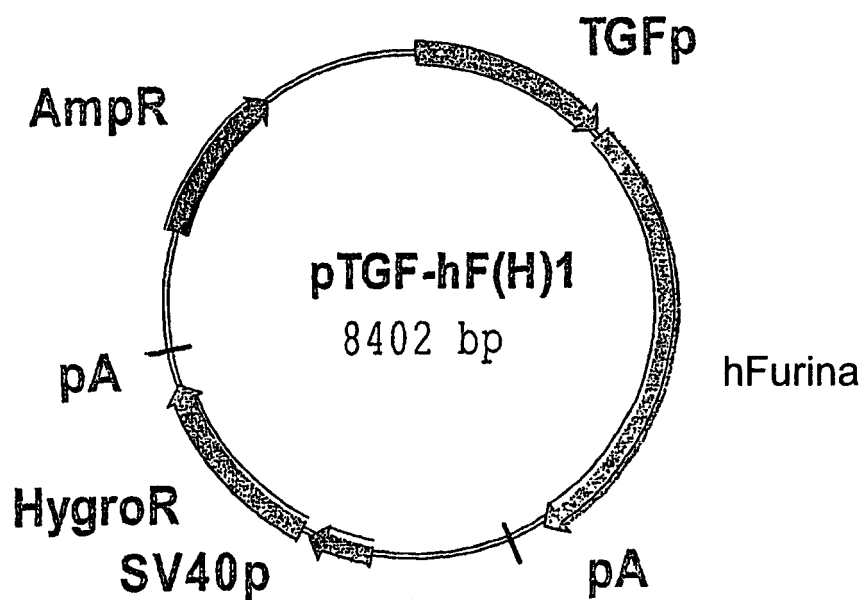
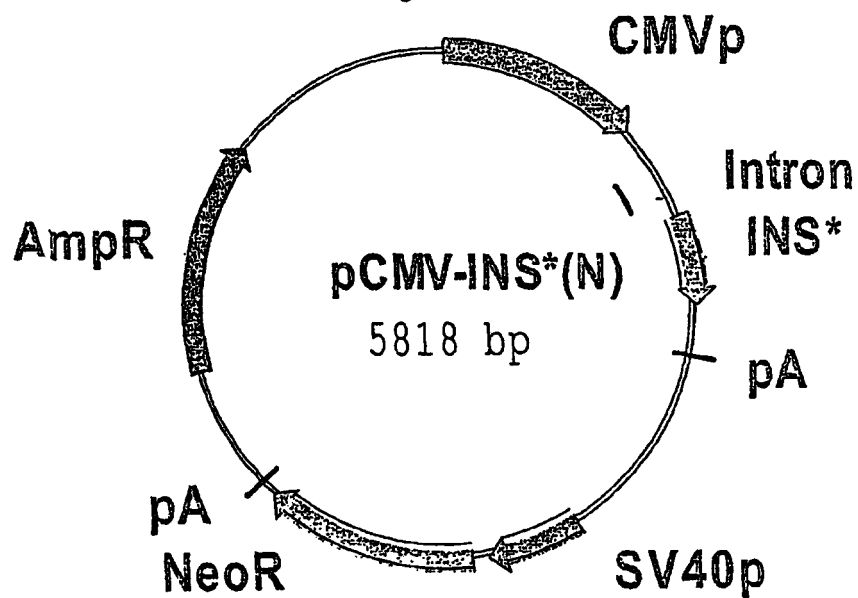


Figura 5 de 5



ES 2 304 444 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Tatake, Ravati J.
Schneiderman, Richard
5 Barton, Randall wilber

<120> Construcciones de ácido nucleico útiles para la producción regulada por glucosa de insulina human en líneas celulares somáticas

<130> 9/218

10 <140> US 10/166, 147

<141> 2002-06-10

<150> US/60/296,936

15 <151> 2001-06-08

<160> 4

<170> patente versión 3.0

<210> 1

20 <211> 37

<212> ADN

<213> furina humana

<220>

25 <221> cebador

<222> (4)..(24)

<223> Un cebador delantero que contiene lugares de restricción SAII y SnaBI en las posiciones 4-9 y 10-15, respectivamente; y secuencia Kozak en las posiciones 16-24.

30 <400> 1

aaagtcgact acgtaccacc atggagctga ggcctt 37

35 <210> 2

<211> 35

<212> ADN

40 <213> furina humana

<220>

<221> cebador

45 <222> (4)..(15)

<223> Un cebador invertido que contiene lugares de restricción Bell y Bsiwl en las posiciones 4-9 y 10-15, respectivamente; y secuencia Kozak en las posiciones 16-24.

<400> 2

50 aaatgacac gtacgtcaga gggcgctctg gtctt 35

<210> 3

55 <211> 35

<212> ADN

<213> promotor de TGF-alfa 1

<220>

60 <221> cebador

<222> (4)..(15)

<223> Un cebador delantero que contiene lugares de restricción clal y HpaII en las posiciones 4-9 y 10-15, respectivamente

65

ES 2 304 444 T3

<400> 3

aaaatcgatg ttaacagctc cgggtcactg gagas

35

5

<210> 4

<211> 35

<212> ADN

10 <213> promotor de TGF-alfa 2

<220>

<221> cebador

<222> (4)..(15)

15 <223> Un cebador invertido que contiene lugares de restricción SAII y SnaBI en las posiciones 4-9 y 10-15, respectivamente.

<400> 4

20

aaagtcgact acgtaggcgg agcggcgccg cggtg

35

25

30

35

40

45

50

55

60

65