



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 323**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03736235 .7**

96 Fecha de presentación : **18.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1541674**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Adipocitos de cultivo primario para terapia génica.**

30 Prioridad: **18.06.2002 JP 2002-177648**
19.08.2002 JP 2002-237974

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

73 Titular/es: **EISAI R&D MANAGEMENT Co., Ltd.**
6-10, Koishikawa 4-chome
Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es: **Ito, Masashi y**
Saito, Yasushi

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 358 323 T3

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

DESCRIPCION

Adipocitos de cultivo primario para terapia génica.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a adipocitos de cultivo primario para terapia génica, a los que se ha transferido un(os) gen(es) foráneo(s).

Antecedentes de la técnica

10 Las terapias génicas actuales (Toyooka *et al.*, Folia Pharmacol. Jpn. 116:158-162, 2000) pueden clasificarse en dos grupos: (1) métodos de transferencia de genes terapéuticos en pacientes administrando directamente vectores virales, plásmidos desnudos, o de manera que codifiquen para el gen (*in vivo*), y (2) métodos de extracción temporal de células de pacientes, transferencia de un gen a estas células y luego devolución de estas células al paciente (*ex vivo*).

15 En los métodos *in vivo*, siguen sin resolverse problemas importantes, tales como la eficacia de la transferencia, la expresión continua y la transferencia génica selectiva a células diana. En cambio, los métodos *ex vivo* pueden superar potencialmente estos problemas. La mayoría de ejemplos de métodos *ex vivo* se han realizado usando células del sistema sanguíneo (linfocitos periféricos y células de médula ósea), dado que su recogida y trasplante es relativamente fácil y se reduce la carga para los pacientes (Tani *et al.*, Saishin Igaku, 56:258-267, 2001). Con respecto a células distintas de células del sistema sanguíneo, se han llevado a cabo métodos que transfieren genes a hepatocitos y luego devuelven estas células al paciente (Raper, S.E. *et al.*, Cell Transplant 2(5):381-400, 1993), pero la mayoría de estos métodos se centran en la recuperación, el mantenimiento y la potenciación de la función de las propias células transfectadas.

20 Descripción de la invención

Mientras buscaban células adecuadas para terapia génica *ex vivo*, los presentes inventores desarrollaron la idea de usar adipocitos de cultivo primario. El uso de adipocitos tiene las siguientes ventajas:

25 (1) existen muchos informes de factores humorales secretados de adipocitos, y los adipocitos comprenden las funciones de producción de hormonas y pueden actuar como órganos secretores (Bradley R.D., *et al.*, Recent Prog. Horm. Res., 2001, 56, 329-358);

(2) los adipocitos pueden recogerse fácilmente dado que también existen subcutáneamente, y están desarrollándose técnicas relacionadas con su extirpación en los campos de la cirugía plástica y cosmética; además, incluso cuando se injertan adipocitos en tejido subcutáneo, que permite una fácil implantación, estas células no son heterotrópicas dado que pertenecían originalmente a esta región;

30 (3) dado que los adipocitos de cultivo primario aislados proliferan activamente, incluso *in vitro*, son apropiados para procedimientos tales como transferencia génica;

(4) dado que los adipocitos es probable que permanezcan en una zona limitada tras su implantación, las células injertadas pueden extirparse tras su implantación si así se desea (específicamente, cuando se quiere eliminar la expresión génica);

35 (5) dado que los propios adipocitos producen factores angiogénicos (Mick, G.J., *et al.*, Endocrinology 2002, 143(3): 948-53), puede esperarse un alto nivel de aceptación del injerto tras su implantación;

(6) la extirpación o implantación de adipocitos tiene un impacto pequeño en el organismo humano porque el peso de este órgano cambia enormemente en los adultos; y

40 (7) los adipocitos se reconocen ampliamente como superfluos y obstructivos, y puede obtenerse fácilmente el consentimiento para su recogida.

45 Aunque están en marcha actualmente investigaciones con objetivos similares usando queratinocitos (J. Gene. Med. enero-febrero de 2001, 3 (1):21-31; Histochem. Cell Biol. 2001 Ene, 115(1):73-82), la eliminación de la barrera biológica de la piel en el procedimiento de aislamiento del cultivo primario es problemática considerando el riesgo de infección. Se predice que el dolor del paciente durante la extirpación e implantación es fuerte, y no es fácil volver a extirpar (4, mencionado anteriormente) para eliminar la expresión. Además, cuando se usan queratinocitos o piel, que sólo pueden injertarse de manera bidimensional, la cantidad del injerto sólo puede aumentarse aumentando el área de superficie del injerto. Por tanto, se consideran más útiles los adipocitos, que permiten el trasplante tridimensional.

50 Los presentes inventores diseñaron métodos para transferir genes eficazmente en adipocitos de cultivo primario. También confirmaron que los genes transferidos funcionan tras su implantación, y encontraron que los adipocitos pueden utilizarse eficazmente en terapia génica. Además, pueden obtenerse adipocitos que expresan de manera estable el gen foráneo transferido *in vivo* durante un largo periodo de tiempo mediante los métodos de esta

invención. Los adipocitos maduros implantados pueden seguir expresando los genes foráneos durante un año o más. Además, si la expresión del gen foráneo se vuelve innecesaria tras la implantación de los adipocitos, la expresión puede detenerse extrayendo el injerto.

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un preadipocito de cultivo primario, en la que el preadipocito mantiene de manera estable un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula y en la que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral, en la que la proteína es insulina o péptido 1 similar al glucagón (GLP-1).
- 10 2. Un preadipocito de cultivo primario, manteniendo de manera estable el preadipocito un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula, y en el que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral, para su uso en terapia génica, en el que la proteína es insulina o GLP-1.
- 15 3. La composición farmacéutica del punto 1, o el preadipocito para su uso según el punto 2, en la que el preadipocito tiene la capacidad para expresar significativamente la proteína *in vivo* durante al menos 20 días.
4. La composición farmacéutica del punto 1 ó 3, o el preadipocito para su uso según el punto 2 ó 3, en la que se usa el preadipocito para liberar la proteína en el flujo sanguíneo.
5. Un método de producción *in vitro* de un preadipocito para su uso en terapia génica, comprendiendo el método las etapas de:
 - (1) Llevar a cabo un cultivo primario de un preadipocito; y
 - 20 (2) transferir, y luego mantener de manera estable un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula,
- en el que la proteína es insulina o GLP-1.
6. El método del punto 5, en el que el gen foráneo se transfiere mediante un vector retroviral.
7. El preadipocito para su uso según el punto 2 que se ha producido mediante el método del punto 5 ó 6.
- 25 8. Una composición de implante, comprendiendo la composición un preadipocito de cultivo primario, que mantiene de manera estable un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula, y en la que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en terapia génica, en la que la proteína es insulina o GLP-1.
- 30 9. La composición de implante para su uso según el punto 8, o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, que comprende además un componente de matriz extracelular.
10. La composición de implante para su uso según el punto 8 ó 9, o la composición farmacéutica según uno cualquiera de los puntos 1, 3, 4 y 9, que comprende además un factor de angiogénesis.
- 35 11. Un preadipocito de cultivo primario que mantiene de manera estable un gen que codifica para insulina o péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) para su uso en la disminución de la glucemia, en el que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral.
12. Un animal no humano, en cuyo organismo se ha implantado el preadipocito de cultivo primario del punto 2.

A continuación en el presente documento, se describirá el modo para llevar a cabo esta invención.

40 En primer lugar, la presente invención proporciona adipocitos de cultivo primario para terapia génica, en la que los adipocitos mantienen de manera estable un(os) gen(es) foráneo(s) que codifica(n) para una(s) proteína(s) que se secreta(n) al exterior de la célula.

45 En el presente documento, un gen foráneo se refiere a un gen de insulina o GLP-1 transferido a los adipocitos de cultivo primario desde el exterior. Además, células de cultivo primario se refiere a células no establecidas que se cultivan a partir de tejidos extraídos de un organismo vivo. Adipocitos se refiere a adipocitos maduros y células que comprenden la capacidad para diferenciarse en tejido adiposo, tales como preadipocitos. Más específicamente, a menos que se diga particularmente que los adipocitos son adipocitos "maduros", también incluyen preadipocitos. Los adipocitos maduros son células esféricas que almacenan grasa, y contienen gotitas de lípidos. La grasa almacenada en adipocitos maduros puede identificarse usando tinción con rojo aceite O. Los adipocitos maduros generalmente secretan leptina en respuesta a insulina. Los preadipocitos normalmente existen como células del estroma que aún no se han diferenciado en adipocitos maduros. Los preadipocitos pueden aislarse tratando el tejido adiposo con colagenasa, o

5 pueden aislarse como resultado de la división de adipocitos maduros, usando el método de cultivo en techo descrito a continuación (Sugihara, *et al.* Nippon Rinsho 1995, 53, 115-120; Sugihara, H., *et al.* J. Lipid Res. 1987, 28, 1038-1045; Zhang H.H., *et al.* J. Endocrinol. 2000, 164, 119-128). Aunque no se ha confirmado la existencia de antígenos de superficie específicos de adipocitos, se han encontrado altos niveles de expresión de CD36 y similares en adipocitos maduros (Abumrad N.A., *et al.* J. Biol. Chem. 25 de agosto de 1993, 268 (24):17665-8). Por tanto, pueden recogerse adipocitos extremadamente puros usando tales moléculas como marcadores. Induciendo la diferenciación tal como se describe a continuación, los preadipocitos puede diferenciarse en adipocitos maduros en el plazo de unos cuantos días a unas cuantas semanas (Hauner H., *et al.*, J. Clin. Invest. 84, 1663-1670, 1989; Marko, *et al.*, Endocrinology 136, 4582-4588, 1994). Pueden aislarse adipocitos de cultivo primario de un tejido deseado, por ejemplo, tejido adiposo subcutáneo o tejido adiposo visceral tal como tejido que rodea al epidídimo o tejido mesentérico.

15 La expresión "para terapia génica" se refiere a usar la expresión *in vivo* de una(s) proteína(s) codificada(s) por un(os) gen(es) foráneo(s) previendo un efecto terapéutico. Además, células para terapia génica se refiere a células que portan un(os) gen(es) foráneo(s), usándose las células para administrar el gen foráneo a un organismo mediante administración *ex vivo*, y las células comprenden la capacidad para expresar la proteína en ese organismo. Administración *ex vivo* se refiere a extraer tejidos adiposos o adipocitos de un individuo, realizar la transferencia génica *in vitro* y entonces implantar las células en el mismo individuo o uno diferente.

20 Células para terapia génica se refiere preferiblemente a células usadas para tratar trastornos, que son células que se implantan de modo que se produce una proteína específica. Preferiblemente, el tratamiento mediante una proteína específica incluye terapia de sustitución, que usa una proteína cuya ausencia o deficiencia física o funcional provoca un trastorno. La proteína específica es insulina o GLP-1 que muestra actividad en el torrente sanguíneo, o se suministra a un tejido diana por medio del torrente sanguíneo, y funciona en la superficie celular de ese tejido. Se requiere también preferiblemente un suministro continuo de la proteína específica durante un determinado periodo de tiempo (por ejemplo, durante de unos cuantos días a unas cuantas semanas o más). Los factores y trastornos para los que ya está llevándose a cabo terapia de sustitución de proteínas, o se predice que es eficaz, pueden convertirse todos en dianas.

A continuación en el presente documento, se enumeran dianas representativas según su clasificación, pero no ha de entenderse que su uso se limita a estos ejemplos, y se incluye el uso de factores similares para fines similares dentro del alcance de esta invención.

30 La terapia de sustitución incluye complementación contra trastornos que se desarrollan o se exacerban por una falta o una función reducida de una hormona, complementación contra trastornos debidos a un defecto genético congénito, y complementación de un factor para mejora patológica:

insulina/diabetes; péptido-1 similar al glucagón (GLP-1)/diabetes, obesidad, trastornos de la alimentación.

35 Además, los adipocitos de la presente invención no se limitan a los usados para la denominada "terapia", sino que incluyen células usadas para la expresión *in vivo* de una proteína secretora deseada. Por ejemplo, los métodos de esta invención permiten la producción de animales modelo mediante una expresión *a posteriori* de una proteína particular. Usando estos métodos, pueden producirse animales modelo de enfermedades con expresión *a posteriori* de factores de patogénesis o agravantes, y pueden usarse estos animales para seleccionar fármacos. Además, expresando factores de mejora patológica, pueden utilizarse estos métodos como prueba de hipótesis de trabajo para los descubrimientos de fármacos novedosos en los que un factor dado mejora un estado patológico. Los animales que se usan incluyen animales no humanos deseados, y preferiblemente mamíferos no humanos (incluyendo roedores y primates).

45 Los adipocitos de cultivo primario para las terapias génicas de esta invención mantienen de manera estable un(os) gen(es) de insulina o GLP-1 que codifican para insulina o GLP-1 que se secreta fuera de la célula. La expresión "mantiene de manera estable" significa que el gen foráneo pasa a las células hijas durante la división celular, y más específicamente, esta expresión se refiere a la incorporación del gen foráneo en un cromosoma celular. Los adipocitos para terapia génica de esta invención comprenden un(os) gen(es) de insulina o GLP-1, transferido(s) de manera estable mediante un vector viral de incorporación en cromosoma. El gen de insulina o GLP-1 se transfiere mediante un vector retroviral.

50 El vector retroviral se integra de manera estable en un cromosoma celular y comprende la capacidad para expresar un gen transferido durante un largo periodo. La eficacia de transferencia del vector y la continuación de la expresión del gen transferido depende del tipo de célula. Por ejemplo, un gen transferido por un vector retroviral puede mostrar expresión continua mientras que las células crecen, pero la expresión puede detenerse cuando se detiene el crecimiento celular (Lund, A.H., *et al.*, J. Biomed. Sci. 1996, 3:365-378; Niwa, O. *et al.*, 1983, Cell, 32:1105-1113). A menudo, se observa que la expresión del gen foráneo se suprime, particularmente tras introducir el gen en un organismo mediante métodos *in vivo* o *ex vivo*. Se dice que tal supresión de la expresión implica la metilación *de novo* del promotor o la secuencia codificante del gen transferido (Jahner, D. y Jaenisch, R., Nature 315: 594-597, 1985; Challita, P.-M. y Kohn, D.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2567-2571, 1994; Hoeben, R.C. *et al.*, J. Virol. 65:904-912, 1991). Además, la desacetilación de la histona está implicada en el silenciamiento del gen transferido (Chen, W.Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:377-382, 2000; Chen, W.Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5798-5803, 1997). Sin

embargo, cuando los presentes inventores transfirieron un gen foráneo a adipocitos de cultivo primario usando un vector retroviral, sorprendentemente, se encontró que la expresión del gen transferido persistía de manera extremadamente estable, tanto *in vitro* como *in vivo*. La expresión de los genes transferidos es estable en adipocitos antes de su diferenciación y también en adipocitos maduros. Se confirmó que la expresión del gen transferido persistía durante toda la duración del experimento para cultivos *in vitro* (80 días o más), y durante toda la duración del experimento cuando se implantó en el organismo (360 días o más). Por tanto, pueden usarse adipocitos de cultivo primario, a los que se ha(n) transferido de manera estable un(os) gen(es) de insulina o GLP-1, como implantes que expresan de manera estable un(os) gen(es) durante un largo periodo.

Los adipocitos para terapia génica de esta invención comprenden la capacidad para expresar significativamente insulina o GLP-1 codificado por un(os) gen(es) de insulina o GLP-1 foráneo(s) durante al menos 20 días o más *in vitro*, o más preferiblemente *in vivo*. La expresión "expresar significativamente" significa, por ejemplo, que se detecta expresión a un nivel estadísticamente significativo en comparación a cuando no se transfirió el gen foráneo (por ejemplo, con un nivel de significación del 5% o una significación superior). Más preferiblemente, los adipocitos de la presente invención, cuando se trasplantan en un organismo, comprenden la capacidad para expresar significativamente insulina o GLP-1 codificado por un(os) gen(es) de insulina o GLP-1 en el organismo durante al menos 30 días o más, preferiblemente 40 días o más, más preferiblemente 50 días o más, incluso más preferiblemente 60 días o más, todavía más preferiblemente 80 días o más, incluso aún más preferiblemente 100 días o más, incluso aún más preferiblemente 150 días o más, incluso aún más preferiblemente 200 días o más, incluso aún más preferiblemente 250 días o más, incluso aún más preferiblemente 300 días o más, e incluso aún más preferiblemente 350 días o más.

Los adipocitos para terapia génica de esta invención son particularmente útiles como células para liberar insulina o GLP-1, que están codificados por genes foráneos portados por las células, en el flujo sanguíneo. Las proteínas liberadas en el flujo sanguíneo son insulina y/o péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) para tratar diabetes y similares. Por ejemplo, para la insulina, pueden sustituirse los sitios de escisión (sitio 1 y sitio 2) por la secuencia de escisión de una proteasa expresada en adipocitos, de modo que puede producirse eficazmente insulina madura (por ejemplo, Groskreutz, D.J., *et al.* JBC, 1994, 269(8), 6241). Puede usarse también un análogo de insulina modificado con una cadena sencilla (Lee, H.C., *et al.*, Nature. 23 de noviembre de 2000, 408 (6811):483-8). Para GLP-1, puede usarse un péptido deseado que actúa como ligando para el receptor de GLP-1 (NP_002053; Thorens, B. *et al.*, Diabetes 42, 1678-1682 (1993); Dillon, J.S. *et al.*, Endocrinology 133, 1907-1910 (1993); Graziano, M.P. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 196, 141-146 (1993); Stoffel, M. *et al.*, Diabetes 42, 1215-1218 (1993)). Un ejemplo es GLP-1(7-37) (Diabetes, 1998, 47:159-69; Endocrinology, 2001, 142: 521-7; Curr. Pharm. Des., 2001, 7:1399-412; Gastroenterology, 2002, 122:531-44).

La presente invención también se refiere a métodos de producción de adipocitos para su uso en terapia génica, comprendiendo los métodos las etapas de:

- (1) Llevar a cabo un cultivo primario de preadipocitos, y
- (2) transferir células con un(os) gen(es) foráneo(s) que codifica(n) para una(s) proteína(s) que se secreta(n) al exterior de la célula, preferiblemente usando un vector retroviral de modo que el gen se mantiene de manera estable, siendo dicha proteína insulina o GLP-1.

La presente invención también se refiere a los adipocitos para terapia génica producidos mediante este método. "Mantenido de manera estable" significa la transferencia de un(os) gen(es) foráneo(s) de manera que pasa(n) a las células hijas cuando la célula se divide, y más específicamente, se refiere a la integración del gen foráneo en el cromosoma de las células. La transferencia de tipo Southern o la PCR usando ADN genómico pueden demostrar desde el punto de vista de la biología molecular que el gen foráneo ha logrado la expresión estable mediante su integración en un cromosoma. Además, para concentrar las células transfectadas de manera estable puede usarse, por ejemplo, un método que usa clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), que concentra células reconociendo la GFP expresada conjuntamente por las células junto con el gen diana.

1. Métodos de recogida de adipocitos de cultivo primario

Pueden recogerse adipocitos de cultivo primario mediante los métodos descritos en el informe de Sugihara *et al.* (Sugihara, H. *et al.*, Differentiation, 31:42-49, 1986). Más específicamente, se extirpa tejido adiposo, y preferiblemente el propio tejido adiposo subcutáneo o tejido adiposo visceral del receptor del implante, tal como el tejido que rodea al epidídimo o tejido mesentérico, en condiciones estériles, y, por ejemplo, tras lavar con PBS, se trocea usando unas tijeras o un bisturí. Se digiere este tejido troceado agitando a 37°C en un medio que comprende una cantidad apropiada de colagenasa, preferiblemente de 1 a 3 mg/ml, durante un periodo de tiempo apropiado, preferiblemente durante de 20 a 60 minutos, y entonces se separa en un residuo precipitado y una capa flotante mediante centrifugación.

La capa flotante preferiblemente se lava adicionalmente una o dos veces mediante centrifugación, y luego se añade a un matraz de cultivo lleno de medio. Se eliminan las burbujas, y se deja reposar el matraz en un incubador de CO₂ para su cultivo, de manera que la superficie de cultivo convencional es un techo (cultivo en techo). Tras cultivar durante un periodo apropiado, preferiblemente de diez a 14 días, se recogen las células adheridas a la superficie del

techo mediante tratamiento con tripsina. Posteriormente, se subcultivan estas células en un sistema de cultivo convencional.

Pueden almacenarse adipocitos de cultivo primario mediante congelación antes o tras la transferencia génica. Este procedimiento permite un múltiple uso de los adipocitos tras una única recogida.

5 2. Transferencia génica a adipocitos

La transferencia génica puede realizarse usando reactivos de transferencia génica (Fugene 6, Roche; Lipofectamin, Invitrogen; kit de transfección Cellfect (método de fosfato de calcio), Amersham; etc.), métodos de electroporación (Chen, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1997, 272(12), 8026-31), o vectores virales (Kay, M.A., *et al.*, *Nat. Med.* 2001, 7, 33-40). Preferiblemente se realiza la transferencia usando vectores virales, y más preferiblemente usando vectores retrovirales (*por ejemplo*, Arai, T. *et al.*, *J. Virol.*, 1998, 72, págs. 1115-21).

10 Cuando se realiza la transferencia génica usando un plásmido, se transfecta el plásmido en adipocitos, y pueden seleccionarse los adipocitos que mantienen de manera estable el gen foráneo transferido. Tales adipocitos pueden seleccionarse, por ejemplo, dotando al plásmido que codifica para el gen foráneo de un gen de resistencia a fármacos, o realizando la transfección junto con un plásmido que porta un gen de resistencia a fármacos, y entonces seleccionando las células transfectadas usando este fármaco. Por otra parte, las células pueden obtenerse clonando las células mediante técnicas de dilución limitante. Además, cuando se realiza la transferencia génica usando un plásmido, puede usarse un método de expresión transitoria de una integrasa derivada de fago para aumentar la eficacia de la inserción cromosómica (*Mol. Cell Biol.* 2001 Jun, 21(12):3926-34).

20 En la presente invención, el gen de insulina o GLP-1 foráneo se transfiere a adipocitos usando un vector retroviral. Retrovirus se refiere a virus que pertenecen a la familia Retroviridae, e incluyen oncovirus, espumavirus (Russell, D.W. y Miller, A.D., *J. Virol.* 1996, 70:217-222; Wu, M. *et al.*, *J. Virol.* 1999, 73:4498-4501) y lentivirus (por ejemplo, VIH-1 (Naldini, L. *et al.*, *Science* 1996, 272:263-267; Poeschla, E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:11395-11399; Srinivasakumar, N. *et al.*, *J. Virol.* 1997, 71:5841-5848; Zufferey, R., *et al.* *Nat. Biotechnol.* 1997, 15: 871-875; Kim, V.N., *et al.*, *J. Virol.* 1998, 72:811-816) y virus de la inmunodeficiencia felina (Johnston, J.C. *et al.*, *J. Virol.* 1999, 73:4991-5000; Johnston, J. y Power, C., *J. Virol.* 1999, 73:2491-2498; Poeschla, E.M. *et al.*, *Nat. Med.* 1998, 4:354-357). Un vector retroviral preferible para su uso en esta invención es un vector de virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM) (T. M. Shinnick, R. A. Lerner y J. G. Sutcliffe, *Nature* 293, 543-548, 1981).

30 Los retrovirus pueden ser vectores autoinactivantes (SIN). Un vector SIN puede prepararse delecionando una parte de la LTR en 3' durante el empaquetamiento viral (Yu S.F. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3194; Yee, J. K. *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5197-5201; Zufferey, R. *et al.*, 1998, *J. Virology*, 72, 9873-9880). El gen foráneo en el retrovirus puede transcribirse mediante la LTR, o puede expresarse a partir de otro promotor dentro del vector. Por ejemplo, puede usarse un promotor de expresión constitutiva tal como promotor de CMV, promotor EF-1 α o promotor CAG, o un promotor inducible deseado. Además, puede usarse un promotor quimérico, en el que una parte de la LTR se sustituye por otro promotor.

35 Para transferir genes usando retrovirus, específicamente, un plásmido que porta un gen que va a transferirse, tal como pBabe CL-SEAP-IRES-GFP, se introduce por transferencia génica en las células de empaquetamiento, tales como células 293-EBNA (Invitrogen), usando un reactivo para transferencia génica y similares. Entonces, esto se cultiva durante un periodo de tiempo apropiado, preferiblemente de uno a tres días, y se recogen los virus recombinantes producidos en el sobrenadante. Entonces, se infectan estos virus en los adipocitos que van a transfectarse.

40 Los vectores retrovirales comprenden preferiblemente una proteína de la envuelta con amplio tropismo, de modo que pueden infectar a una amplia gama de adipocitos de mamíferos, incluyendo los de seres humanos. Por ejemplo, puede usarse proteína de la envuelta anfotrópica (por ejemplo 4070A) (registro K02729; Sorge, J. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4 (9), 1730-1737 (1984)). En la presente invención, el retrovirus está preferiblemente pseudotipado (Emi, T. Friedmann y J. K. Yee, *J. Virol.*, 65 (3), 1202-1207 (1991); Yee, J.-K. *et al.* (1994) *Methods Cell Biol.* 43 43:99-112; Burns, J. C. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 90: 8033-8037) mediante la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (Rose, J.K. y Gallione, C.J., *J. Virol.* 39 (2), 519-528 (1981)). La pseudotipificación mediante VSV-G permite una transferencia altamente eficaz de genes a adipocitos. Puede producirse el vector pseudotipado mediante VSV-G expresando VSV-G en las células de empaquetamiento. Más específicamente, por ejemplo, pueden usarse favorablemente células de empaquetamiento que pueden expresar de manera inducible VSV-G (por ejemplo, Arai T. *et al.*, *J. Virol.*, 1998: 72, págs. 1115-21).

55 El título de los virus producidos puede determinarse infectando células con disoluciones de virus que se han diluido gradualmente, y contando el número de colonias de células infectadas (para detalles, véase Ausubel *et al.*) (Ausubel, F.M. *et al.* Eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology.* (John Wiley & Sons, NY)). Alternativamente, el título puede determinarse mediante el método de Byun *et al.* (Byun, J. *et al.* (1996) *Gene Ther.* 33333:1018-1020), Tafuro *et al.* (Tafuro, S. *et al.* (1996) *Gene Ther.* 33333:679-684), Miyao *et al.* (Miyao, Y. *et al.* (1995) *Cell Struct. Funct.* 2020:177-183), Claudio *et al.* (Claudio, P. P. *et al.* (2001) *Anal. Biochem.* 291: 96-101), o Cashion *et al.* (Cashion, L. M. *et al.* (1999) *Biotechniques* 26: 924-930).

Pueden introducirse vectores virales en adipocitos de cultivo primario poniendo en contacto los vectores con las células. Por ejemplo, se incuban adipocitos de cultivo primario en una disolución de cultivo que comprende vectores virales. Preferiblemente, los adipocitos se infectan en forma de preadipocitos. La eficacia de la infección puede aumentarse añadiendo más o menos de 0,5 a 8 mg/ml de polibreno. La multiplicidad de infección (MOI) no está particularmente limitada, pero puede ajustarse apropiadamente dentro del intervalo de 0,1 a 100. Pueden seleccionarse células sometidas a transferencia génica usando un gen marcador, por ejemplo. Sin embargo, si la infección se lleva acabo a una MOI de aproximadamente 2 o más, o preferiblemente de aproximadamente 3, 4, 5 o más, el gen puede transferirse a la mayoría de las células, incluso sin selección. Los adipocitos sometidos a transferencia génica pueden usarse para su implantación sin tratamiento adicional, o en determinados casos, pueden convertirse en adipocitos maduros mediante cultivo en un medio que comprende 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), dexametasona e insulina. En tales casos, dado que se usan principalmente IBMX y dexametasona para activar el receptor- γ activado por proliferador de peroxisomas de adipocitos (PPAR- γ), pueden añadirse al mismo tiempo fármacos que activan directamente este receptor (por ejemplo los derivados de tiazolidina, pioglitazona/Takeda Pharmaceutical Company Limited y rosiglitazona/GlaxoSmithKline).

Los adipocitos de cultivo primario de esta invención, que portan un gen de insulina o GLP-1 terapéutico deseado, pueden implantarse en el organismo de un receptor inmunológicamente compatible, permitiendo así la terapia génica mediante la expresión *in vivo* de la proteína secretora codificada por el gen terapéutico. Los adipocitos de cultivo primario que van a implantarse son preferiblemente células del mismo huésped que el receptor. Los métodos de terapia génica en los que se implantan los adipocitos de cultivo primario de esta invención pueden aplicarse expresando una proteína secretora de insulina o GLP-1 deseada en un organismo, previendo los efectos de esa proteína. Por ejemplo, puede tratarse o prevenirse un trastorno implantando los adipocitos de esta invención, que mantienen un(os) gen(es) de insulina o GLP-1 foráneo(s) que codifica(n) para una insulina o un GLP-1 comprendiendo un efecto terapéutico o preventivo contra el trastorno. Además, la presente invención se refiere a métodos de liberación de proteínas en el flujo sanguíneo, comprendiendo los métodos la etapa de administrar los adipocitos de cultivo primario de esta invención a un organismo. Usando estos métodos, la insulina o el GLP-1 codificado por un gen de insulina o GLP-1 foráneo puede secretarse significativamente en el flujo sanguíneo durante al menos 20 días o más, preferiblemente 30 días o más, más preferiblemente 40 días o más, incluso más preferiblemente 50 días o más, todavía más preferiblemente 60 días o más, incluso aún más preferiblemente 80 días o más, incluso aún más preferiblemente 100 días o más, incluso aún más preferiblemente 150 días o más, incluso aún más preferiblemente 200 días o más, incluso aún más preferiblemente 250 días o más, incluso aún más preferiblemente 300 días o más, y incluso aún más preferiblemente 350 días o más. Puede detectarse y/o cuantificarse el gen de insulina o GLP-1 foráneo expresado en un organismo, por ejemplo mediante inmunoensayos tales como EIA. La extracción de las células trasplantadas puede detener la expresión del gen de insulina o GLP-1 foráneo administrado en cualquier momento. En determinados casos, transfiriendo un gen suicida inducible (por ejemplo, HSV-tk) a las células del injerto, pueden eliminarse las células del injerto administrando ganciclovir, por ejemplo.

La presente invención también proporciona composiciones de implante para su uso en terapia génica, comprendiendo las composiciones adipocitos de cultivo primario que mantienen de manera estable un(os) gen(es) de insulina o GLP-1 que codifica(n) para una insulina o un GLP-1 secretado al exterior de la célula, y vehículos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de los vehículos son solución salina fisiológica, tampón fosfato, disoluciones de cultivo, sueros y líquidos corporales. Estos también pueden combinarse con un soporte sólido o de gel que se convierte en un armazón para las células.

Las composiciones de implante de la presente invención comprenden preferiblemente un componente de matriz extracelular (CME). Un componente de matriz extracelular se refiere a un componente tal como una proteína o un mucopolisacárido comprendido en una red insoluble o estructura fibrosa acumulada entre las células. Pueden aislarse de organismos o reconstruirse artificialmente. Componentes CME preferiblemente usados en esta invención son colágeno, fibronectina, vitronectina, laminina, sulfato de heparán, proteoglicano, glucosaminoglucano, sulfato de condroitina, hialuronato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, elastina o combinaciones de dos o más de los anteriores. Preferiblemente, estos componentes CME se forman en un gel y entonces se mezclan con los adipocitos. Los geles de CME usados en esta invención no están particularmente limitados, siempre que estén comprendidos al menos uno o más de los componentes mencionados anteriormente, pero preferiblemente comprenden al menos colágeno de tipo IV, laminina y sulfato de heparán. Tales CME incluyen un sustrato extraído de tumor de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (Matrigel®) (Becton Dickinson Labware) (patente estadounidense n.º 4.829.000). La estructura de las composiciones que comprenden el componente CME y los adipocitos usadas en la presente invención no está particularmente limitada, y puede ser, por ejemplo, una estructura de red de gel o pasta, una estructura fibrosa, estructura plana (disco), estructura en panal y estructura similar a una esponja. Los componentes CME pueden gelificarse según métodos convencionales. Por ejemplo, la gelificación puede realizarse incubando una disolución acuosa que comprende aproximadamente colágeno a del 0,3 al 0,5% a 37°C durante de diez a 30 minutos. Por otra parte, los componentes CME pueden gelificarse usando un agente de gelificación.

Además, las composiciones de implante de la presente invención comprenden preferiblemente un factor de angiogénesis. Las composiciones de implante de esta invención que comprenden un factor de angiogénesis provocan que se formen vasos sanguíneos a su alrededor tras su implantación, y pueden secretar una proteína foránea en el flujo sanguíneo con una eficacia superior. Los factores de angiogénesis no están particularmente limitados, siempre que

5 sean factores que puedan inducir angiogénesis *in vivo*, y ejemplos son el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor- β de crecimiento transformante (TGF- β), osteonectina, angiopoyetina y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). El ejemplo más preferido es bFGF. Los bFGF, que también se denominan FGF2, no sólo son factores de crecimiento de fibroblastos, sino que también comprenden la actividad de promoción del crecimiento de diversas células tales como células endoteliales vasculares, cartílago, osteoblastos y células epidérmicas (Abraham *et al.*, EMBO J., 5, 2523-2528, 1986; Prats *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1836-1840, 1989). Los bFGF usado en la presente invención no sólo son proteínas naturales, sino que también pueden producirse mediante ingeniería genética mediante tecnología de ADN recombinante, y formas modificadas de las mismas. Ejemplos de los bFGF son los descritos en el documento WO87/01728, documento WO89/04832, documento WO86/07595, documento WO87/03885, publicaciones de solicitud de patente europea n.ºs 237966, 281822, 326907, 394951 y 493737. Alternativamente, puede introducirse en los adipocitos otro vector de expresión que expresa de manera transitoria un factor de angiogénesis (véase el documento WO97/49827). El principal objetivo de los factores de angiogénesis usados de esta manera es formar vasos sanguíneos alrededor de las células trasplantadas, de modo que la proteína foránea pueda secretarse eficazmente en el flujo sanguíneo desde los adipocitos de esta invención. Por tanto, cuando se usa un vector que codifica para un factor de inducción vascular para expresar ese factor de inducción vascular desde los adipocitos, se prefiere el uso de un vector de expresión transitoria (más específicamente, un vector que no se incorpora en el cromosoma). Cuando los adipocitos expresan un factor de inducción vascular durante un periodo largo, se forman cantidades en exceso de vasos sanguíneos alrededor de los adipocitos implantados, lo que puede provocar efectos secundarios sistémicos. Por tanto, es preferible que el gen foráneo que codifica para un factor de angiogénesis no se transfiera de manera estable a los adipocitos de cultivo primario de esta invención.

3. Implantación de adipocitos

25 Se prepararon adipocitos sometidos a transferencia génica a una concentración celular apropiada, preferiblemente de $0,2 \times 10^7$ a 2×10^7 células/ml, o de $0,2 \times 10^6$ a 5×10^6 células/ml cuando se transfectaron con un retrovirus. Se infunden tal cual en el tejido subcutáneo o tejido adiposo, preferiblemente tejido subcutáneo, o mediante mezclado con un medio eficaz, preferiblemente una disolución que comprende una matriz extracelular tal como colágeno. La inyección en el tejido adiposo puede realizarse haciendo una incisión y exponiendo el tejido adiposo. Las células que se han diferenciado de manera terminal en adipocitos maduros no proliferarán tras el trasplante, y expresarán el gen foráneo durante un periodo largo a un nivel constante. El nivel de expresión de un gen foráneo en un organismo que recibe un implante es proporcional al número de células implantadas. Por tanto, cuando se realiza una implantación, puede mantenerse un nivel de expresión deseado durante un periodo largo en un organismo que recibe un implante ajustando la cantidad de adipocitos que se implantan para igualar el nivel de expresión del gen foráneo *in vitro* medido previamente.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 es un conjunto de microfotografías de adipocitos de cultivo primario aislados de la grasa subcutánea de ratones ICR de tres semanas de edad. (A) muestra adipocitos que se adhieren a la superficie de cultivo del lado del techo tras 14 días de cultivo en techo, (B) muestra adipocitos de cultivo primario hechos crecer en un cultivo normal, (C) muestra adipocitos maduros que han almacenado gotitas de lípidos debido a la inducción de la diferenciación, y (D) muestra una imagen teñida con rojo aceite O de células con diferenciación inducida.

40 La figura 2 muestra la actividad de la fosfatasa alcalina plasmática (FA) obtenida implantando en ratones desnudos ICR adipocitos de cultivo primario (derivados de grasa subcutánea de ratones ICR) que se transfectan de manera transitoria con el plásmido pcDNA3.1-SEAPmh que expresa FA.

La figura 3 muestra una comparación de la eficacia de transferencia génica cuando se transduce el vector retroviral MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP en adipocitos de cultivo primario derivados de diversos tejidos adiposos.

45 La figura 4 es un conjunto de microfotografías que muestran imágenes de la inducción de la diferenciación de los adipocitos de cultivo primario transducidos con MLV(VSV)/pBabeCL(GFP)IP. (A) y (B), respectivamente, muestran una microfotografía óptica, y una fotografía de fluorescencia de GFP del mismo campo visual.

50 La figura 5 muestra la duración de la expresión de FA en subcultivos de adipocitos de cultivo primario transducidos con un vector viral que expresa FA. (A) muestra el resultado de la transferencia del gen SEAP (MLV(VSV)/pBabeCL(SEAPmh)I2G) o el gen PLAP (MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP) a células derivadas de grasa subcutánea de ratones C57BL/6. (B) muestra el resultado de la transferencia del gen PLAP (MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP) o gen GFP (MLV(VSV)/pBabeCL(GFP)IP) a adipocitos derivados de ratones ICR.

55 La figura 6 es un conjunto de fotografías y un gráfico que muestra el cambio en la expresión en adipocitos sometidos a transferencia génica con diferenciación inducida. (A) muestra una imagen microscópica de luz de GFP de adipocitos de cultivo primario en condiciones que no inducen la diferenciación, en la que los adipocitos transfectados con MLV(VSV)/pBabeCL(GFP)IP se derivan de grasa subcutánea de ICR. (B) muestra una imagen microscópica de GFP similar tomada en condiciones que inducen la diferenciación celular. (C) muestra la producción de FA por adipocitos de cultivo primario transfectados con MLV(VSV)/pBabeCL(FLAP)IP (derivados de grasa subcutánea de ICR)

en condiciones que no inducen la diferenciación (sin diferenciación) y condiciones que inducen la diferenciación (diferenciación).

La figura 7 muestra la producción de (pro)insulina mediante transfección de plásmidos en adipocitos de cultivo primario.

5 La figura 8 muestra la expresión estable de FA en adipocitos de cultivo primario (derivados de grasa subcutánea de ratones C57BL/6) transfectados con VAA que expresa FA.

La figura 9 muestra la expresión de insulina en el momento de la inducción de la diferenciación en adipocitos de cultivo primario transfectados con el vector retroviral que expresa insulina s1s2B10. (A) muestra los resultados usando un EIA producido por Morinaga y (B) muestra los resultados usando un EIA producido por IBL.

10 La figura 10 muestra la expresión de GLP-1(7-37) en adipocitos de cultivo primario transfectados con vector retroviral que expresa GLP-1(7-37). Se realizaron mediciones por triplicado, y se muestran sus valores promedio y desviaciones estándar.

15 La figura 11 muestra el efecto de la presencia o ausencia de estimulación antes de la implantación de la inducción de la diferenciación sobre la expresión de FA *in vivo* en la implantación de adipocitos de cultivo primario que expresan FA.

20 La figura 12 es un conjunto de gráficos y una fotografía. (A) muestra el cambio en la actividad de FA plasmática cuando se implantan adipocitos de cultivo primario que expresan FA en presencia de estimulación de la diferenciación usando Matrigel complementado con FGF básico. (B) muestra la pérdida de la actividad de FA plasmática al extirpar el Matrigel implantado (individuo A). (C) muestra una imagen de microscopio óptico de GFP del Matrigel extirpado del grupo control que recibió células transfectadas con GFP. Para el grupo al que se le implantó PLAP mostrado en (A), los valores mostrados son el promedio del grupo y la desviación estándar de valores medidos para cada individuo hasta el 32º día. Los valores restantes son valores promedio.

La figura 13 muestra los resultados del examen a largo plazo de la actividad de FA en la sangre de ratones que recibieron un implante mediante el método de la figura 12(A), y mediante una variedad de otros métodos.

25 La figura 14 muestra los resultados de la realización de una prueba de extirpación similar a la de la figura 12(B) en la fase tardía del trasplante.

La figura 15 muestra la dependencia de la actividad de FA sanguínea del número de células implantadas cuando se implantaron adipocitos que expresan FA. Los valores indicados son el promedio del grupo y la desviación estándar de las mediciones de cada individuo.

30 La figura 16 muestra el efecto de la implantación de adipocitos que expresan insulina s1s2B10 en ratones diabéticos inducidos con STZ. (A) muestra el efecto sobre el nivel de glucosa plasmática en ayuno, y (B) muestra el efecto sobre el peso corporal. Los valores indicados son el promedio del grupo y la desviación estándar de las mediciones de cada individuo.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

35 A continuación se describirá en detalle la presente invención haciendo referencia a los ejemplos, pero no debe entenderse que se limita a los mismos. En esta descripción se incorporan todas las referencias citadas en el presente documento.

[Ejemplo 1] Cultivo primario de adipocitos murinos

[Métodos]

40 Se anestesiaron ratones ICR macho de tres semanas de edad o ratones C57BL/6 macho de cuatro a cinco semanas de edad (ambos de Charles River) con dietil éter, y se sacrificaron mediante la recogida de sangre completa del corazón. A continuación, se extirparon individualmente la grasa subcutánea inguinal, o grasa que rodea al epidídimo, y el tejido adiposo mesentérico en condiciones estériles. Se lavaron los tejidos extirpados con PBS, y luego se trocearon usando unas tijeras o un bisturí. Se digirió este tejido troceado con agitación a 37°C durante de 20 a 60 minutos en medio normal (DMEM-alto contenido en glucosa/SIGMA, FCS al 10%) que comprendía 1 mg/ml de colagenasa (fracción S1/gelatina Nitta), y entonces se separó en precipitado y capa suspendida mediante centrifugación (300 g, cinco minutos).

50 Se centrifugó adicionalmente la capa flotante una o dos veces para eliminar la colagenasa por dilución, y entonces se añadió a un matraz T-25 (IWAKI) lleno de medio. Se eliminaron las burbujas, y esto se cultivó bajo una atmósfera de CO₂ al 5% en un incubador de CO₂ a 37°C de modo que la superficie de cultivo convencional estuviese al revés (cultivo en techo). De diez a 14 días tras cultivar, se recogieron las células que se adhirieron a la superficie del

techo mediante tratamiento con tripsina y se transfirieron a un sistema de cultivo normal. Entonces se realizó el subcultivo a una razón de 1:3 a 1:10.

Para inducir la diferenciación, se transfirió el medio de células cultivadas hasta la confluencia en una placa de 6 pocillos a un medio de inducción (medio normal complementado con IBMX 0,5 μ M, dexametasona 0,25 μ M e insulina 10 μ g/ml). Se continuó esta estimulación durante 48 horas. A continuación, se diferenciaron las células en un medio de maduración (medio normal complementado con insulina 10 μ g/ml). Se intercambió el medio de maduración cada tres días.

Se preparó la disolución de tinción de rojo aceite O mezclando una disolución madre, preparada mezclando 0,3 g de rojo aceite O en 100 ml de isopropanol (99%), con agua destilada en una razón de 3:2 en el momento de uso. Se lavaron las células con PBS y luego se fijaron con disolución de formalina neutra al 10% (WAKO). Tras lavar de nuevo con PBS, se tiñeron las células con disolución de tinción de rojo aceite O a temperatura ambiente durante diez minutos. Se lavaron las células con PBS de nuevo, y entonces se examinaron mediante microscopio.

[Resultados]

La figura 1 es un conjunto de microfotografías de adipocitos de cultivo primario aislados de la grasa subcutánea de ratones ICR de tres semanas de edad. Tras 14 días de cultivo en techo, se observó la adhesión de adipocitos que portaban gotitas de lípidos en la superficie de cultivo del lado del techo (A). Cuando se transfirieron estas células a un sistema de cultivo normal, mostraron crecimiento similar a fibroblastos, tal como se muestra en (B). Sin embargo, cuando se indujo la diferenciación mediante IBMX, dexametasona e insulina, las células se diferenciaron de nuevo en adipocitos maduros que portan gotitas de lípidos (C). Se tiñó la grasa almacenada con tinción con rojo aceite O (D). Se demostró que las células aisladas mediante este método eran adipocitos de cultivo primario que comprendían la capacidad para diferenciarse.

[Ejemplo 2] Transferencia transitoria del gen de la fosfatasa alcalina (FA) secretora termoestable en adipocitos de cultivo primario, e implantación de adipocitos transfectados en ratones

Como sistema modelo para la expresión génica, se transfirió el gen de FA, más específicamente, el gen SEAP (Clontech) o el gen PLAP (Goto, M. *et al.* Mol. Pharmacol. vol.49 860-873 (1996)) a adipocitos de cultivo primario, y se examinaron los cambios en la actividad de FA. (Ambos productos génicos de FA son termoestables y pueden distinguirse fácilmente de fosfatasas alcalinas endógenas mediante tratamiento térmico).

[Métodos]

(1) Producción de adipocitos de cultivo primario transfectados de manera transitoria con el gen SEAP

Se construyó un plásmido que expresaba FA (pcDNA3.1-SEAPmh) insertando la secuencia de SEAP, obtenida mediante digestión doble del vector pSEAP2-basic (Clontech) con enzimas de restricción HindIII-XbaI, en el sitio HindIII-XbaI de pcDNA3.1Myc-HisA (Invitrogen), que es un vector para la expresión en células de mamíferos.

Para cada transferencia génica a una placa de 10 cm, se mezclaron 500 μ l de medio DMEM libre de FCS y 15 μ l de reactivo Fugene 6 (Roche), luego se añadieron 5 μ g de pcDNA3.1-SEAPmh. Se dejó reposar esta mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió esta mezcla a células de cultivo primario (derivadas de grasa subcutánea de ICR) cultivadas hasta una confluencia del 70 al 80% en una placa de 10 cm. Entonces esto se cultivó durante 24 horas en un incubador de CO₂.

(2) Implantación en ratones de adipocitos de cultivo primario sometidos a transferencia génica de fosfatasa alcalina

Se recogieron células sometidas a transferencia génica mediante tratamiento con tripsina, y se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación. Entonces se suspendieron las células en PBS a 1×10^7 células/ml. Se anestesiaron los animales (ratones desnudos ICR, cinco semanas de edad en el momento de la operación) mediante la administración intraperitoneal de 50 mg/kg de pentobarbital sódico (Nembutal; Dainippon Pharmaceutical). Tras desinfectar la zona que va a operarse con la disolución de Hibitane diluida (Sumitomo Pharmaceuticals), se realizó una incisión de más o menos de 3 mm a 5 mm en la piel cerca de la base de la pata trasera derecha, y se expuso la grasa subcutánea inguinal. Se cargaron 0,55 ml de la disolución de suspensión celular preparada ($5,5 \times 10^6$ células/cabeza) en una jeringuilla de 1 ml, y se inyectó en la grasa subcutánea usando una aguja de inyección de 22 G. Como control, se inyectó PBS en el mismo sitio. Para comparar esto con el método de complementación con proteínas, se disolvió 1 mg de FA purificada (Roche) en PBS en condiciones estériles, y se inyectó de una manera similar. Se suturó la piel con la incisión y se desinfectó el sitio operado con Isodine quirúrgico (Meiji Seika).

Se recogió sangre usando un capilar recubierto con heparina (Dramond) del plexo venoso postorbital antes de la implantación (día 0) y tras la implantación a lo largo del tiempo. Se obtuvo plasma a partir de sangre completa mediante centrifugación a 2000 g durante 15 minutos. Se midió la actividad de FA en este plasma usando un kit de ensayo (kit de ensayo de gen indicador SEAP, Roche) siguiendo las instrucciones adjuntas.

[Resultados]

La figura 2 muestra la actividad de FA plasmática lograda implantando en ratones células de cultivo primario, que se han transfectado de manera transitoria con plásmido pcDNA3.1-SEAPmh que expresa fosfatasa alcalina (FA). Para fines de comparación, se administró a los ratones 1 µg de proteína FA purificada (Roche) mediante inyección. Siete días tras la administración, la actividad de FA sanguínea en estos ratones disminuyó hasta el nivel del control. Por otra parte, se confirmó que la actividad de FA sanguínea en ratones que recibieron un implante de células que mantienen genes transferidos de manera transitoria alcanza un máximo en el cuarto día tras la implantación, y la duración de la expresión fue de 14 días. La duración de la expresión *in vivo* implantando células que portan el gen transferido de manera transitoria fue corta, y se encontró que la concentración en la sangre variaba enormemente, aunque se mantuvo más tiempo que inyectando la proteína.

[Ejemplo 3] Producción, usando un vector viral, de adipocitos que expresan FA de manera estable

[Métodos]

(1) Construcción de vectores de expresión de GFP de control y de FA

Se cortó el gen PLAP de pTK-PLAP usando *HindIII* y *BglII*, tal como se describió en la bibliografía (Goto, M. *et al.* Mol. Pharmacol. vol. 49, 860-873 (1996)). Se obtuvo el gen SEAP mediante digestión doble de pcDNA 3.1-SEAPmh con *HindIII/PmeI*. Se cortó el gen GFP de pEGFP-N2 usando *NotI-NcoI*.

Se produjo el plásmido, pBabeCLX12G, usado para la producción de vectores virales, basándose en pBabePuro (Morgenstern, J.P. *et al.* Nucleic Acids Res. vol. 18, 3587-3596 (1990)), cortando su promotor de SV40 y los genes de resistencia a neomicina usando *SalI-ClaI*, y haciendo romos esos extremos con fragmentos de Klenow, sustituyendo entonces estos por el sitio de reentrada al ribosoma interno (IRES) del virus de encefalomiocarditis (VEMC), que se cortó de pIRES2-EGFP mediante *HincII-HincII*, y la proteína fluorescente verde (GFP); luego sustituyendo la parte de la repetición terminal larga (LTR) en el sitio de inserción del gen foráneo (sitio de clonación múltiple) (*Sspl-BamHI*) por una secuencia correspondiente (*Sspl-BamHI*) de pCLXSN (IMGENEX). Además, también se usó pBabeCLXIP, en el que se había sustituido la parte IRES-GFP de pBabeCLX12G por el gen de resistencia a puromicina-IRES.

Se hicieron romos los extremos de cada uno de los fragmentos de ADN de PLAP, SEAP y GFP mencionados anteriormente, con fragmentos de Klenow, entonces se insertaron en el vector pBabeCLXIP o pBabeCLX12G escindido con *Hpa I*, produciendo pBabeCL(PLAP)IP, pBabeCL (SEAPmh)12G y pBabeCL(GFP)IP, respectivamente.

(2) Producción de vectores virales

Se realizó cada transferencia génica a una placa de 10 cm tal como sigue: se mezclaron 30 µl de reactivo de transfección de plásmidos TransIT (MIRUS) en 500 µl de medio DMEM libre de FCS, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante cinco minutos (disolución de DMEM/TransIT mezclada). En un tubo separado, se mezclaron 3,3 µg de un vector que codifica para VSV-G (pCALG, modificado según Arai, T. *et al.*, J. Virol., 1998, 72, págs. 1115-21), 3,3 µg de un vector que codifica para Gag-Pol (sistema pCLAmpho/RetroMax (IMGENEX)) y 3,3 µg de un vector que comprende una señal de empaquetamiento y el gen transferido (pBabeCL(PLAP)IP, pBabeCL(SEAPmh)12G o pBabeCL(GFP)IP), totalizando 9,9 µg (disolución de plásmidos). Se añadió la disolución de plásmidos a la disolución de DMEM/TransIT mezclada, se mezcló vigorosamente y entonces se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Entonces se añadió esto a células 293-EBNA (Invitrogen), se cultivaron durante la noche a partir de 2×10^6 células/placa de 10 cm en el día anterior.

Se intercambió el medio ocho horas tras la adición, y se recogió el sobrenadante del cultivo durante otros dos días. Se centrifugó el sobrenadante del cultivo recogido (300 g, cinco minutos) o se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 µm (Millipore) para eliminar los contaminantes, y se usó este sobrenadante como disolución de virus (MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP, MLV(VSV)/pBabeCL(SEAPmh)12G y MLV(VSV)/pBabeCL(GFP)IP, respectivamente). Se concentró algo de la disolución de virus mediante ultracentrifugación (19.500 rpm, 100 minutos) y entonces se usó.

(3) Transferencia génica a y cultivo de adipocitos de cultivo primario

Se prepararon adipocitos que van a usarse para la transferencia génica (derivados de grasa subcutánea, grasa que rodea al epididimo y grasa mesentérica de ratones ICR, y la grasa subcutánea de ratones C57BL/6) en placas de 6 pocillos o de 96 pocillos de modo que tenían una confluencia del 50 al 80% el día anterior a la transfección. Se desechó el medio, y se añadieron cantidades iguales de disolución de polibreno 4 mg/ml (SIGMA) y disolución de virus a las células para transducir el vector viral. Ocho horas tras la transducción, se cambió el medio a un medio normal, y se realizaron cultivos y subcultivos adicionales. Se midió la actividad de FA de una parte de las células recogiendo el sobrenadante de cultivo de 24 horas en el día cuatro tras la transfección (figura 3).

Se realizó el subcultivo según el método del ejemplo 1 en una escala de placa de 10 cm. Se cultivaron las células durante de cuatro a siete días, y se intercambió el medio al alcanzar la confluencia. Se midió la actividad de FA

en el sobrenadante del cultivo 17 horas después. Se subcultivaron estas células de manera continua y realizando apropiadamente manipulaciones similares, se examinó el mantenimiento de la expresión (figuras 5 y 6). No se midió la actividad de FA cada vez que se realizaba un subcultivo.

Se indujo la diferenciación en placas de 6 pocillos según el método del ejemplo 1. Sin embargo, se realizó el tratamiento durante tres días con medio de inducción, que se sustituyó por medio de maduración cada tres días después de eso. Se midió la actividad de FA del sobrenadante del cultivo usando el sobrenadante del cultivo obtenido cada tres días, y los ejes x en las figuras muestran el día en el que se recogió el sobrenadante. Para las células transfectadas con GFP, se tomaron microfotografías bajo luz de GFP apropiada (figuras 4 y 6). Condiciones que no inducen la diferenciación se refiere a condiciones en las que se continúa el cultivo en un medio normal en vez de un medio de inducción o medio maduro.

[Resultados]

La figura 3 es una comparación de la eficacia de transferencia génica para cada clase de célula derivada de tejido cuando se usan vectores retrovirales. Se confirmó la actividad de FA en el sobrenadante del cultivo de todas las células cuando se realizó la transferencia génica en los adipocitos de cultivo primario aislados de cada uno de los tejidos adiposos que existen en el tejido subcutáneo inguinal, la zona alrededor del epididimo y el mesenterio de ratones ICR. Esto demostró que los vectores retrovirales pueden transferir genes independientemente del sitio de origen celular.

La figura 4 es un conjunto de microfotografías que muestran imágenes de la inducción de la diferenciación de células transducidas con un vector retroviral que expresa GFP. Se inició la inducción de la diferenciación 13 días tras la transferencia génica, y se tomaron las fotografías tres semanas después. Se observó fluorescencia de GFP en células que contenían gotitas de lípidos, lo que demostró que el viral vector puede transferir genes a preadipocitos que poseen la capacidad para diferenciarse, y que la transferencia génica mediante el vector no afecta a su capacidad para diferenciarse.

La figura 5 muestra la continuidad de la expresión en los subcultivos de adipocitos de cultivo primario transfectados con un vector viral que expresa FA. Se midió la actividad de FA en sobrenadante del cultivo tomado 17 horas después de que las células alcanzaran la confluencia en una placa de 10 cm. Se confirmó la producción de FA continua a lo largo de los 87 días durante los que se examinaron adipocitos de cultivo primario derivados de grasa subcutánea de ratones C57BL/6 (A), y a lo largo de los 63 días durante los que se examinaron adipocitos de cultivo primario derivados de tejido subcutáneo de ratones ICR (B). Estos resultados mostraron que la transducción del vector viral en adipocitos de cultivo primario puede producir células de expresión estable que mantienen los genes foráneos en las células hijas producidas tras la división.

La figura 6 es un conjunto de fotografías y un gráfico que muestra cambios de la expresión en adipocitos sometidos a transferencia génica con diferenciación inducida. Los adipocitos que expresaban GFP derivados de grasa subcutánea de ICR mostraron fuerte expresión de GFP tanto en condiciones de cultivo normales (A), como condiciones que inducen la diferenciación (B). Además, los adipocitos que expresaban FA derivados de grasa subcutánea de ICR mostraron expresión continua de FA tanto en condiciones que no inducen la diferenciación (sin diferenciación) como en condiciones que inducen la diferenciación (diferenciación) (C). Se encontró que los adipocitos de cultivo primario que se sometieron a transferencia génica expresaban de manera estable genes en cualquier fase, no sólo en las condiciones de proliferación descritas en la figura 5, sino también en condiciones que no inducen la diferenciación, o más específicamente en condiciones no proliferativas o condiciones maduras.

[Ejemplo 4] Producción, usando un vector de plásmido, de adipocitos que expresan insulina de manera estable

Los métodos de transferencia génica incluyen métodos que usan vectores de plásmido.

[Métodos]

(1) Aislamiento y modificación del gen de la insulina humana

Se realizó PCR en una biblioteca de ADNc derivado de páncreas humano (Stratagene), usando los cebadores mostrados en la tabla 1 (insulina dir. e inv.). Se obtuvo un fragmento del gen de la insulina humana. Se determinó la secuencia de nucleótidos de este fragmento de 354 pb obtenido, y se subclonó el fragmento en el vector pCR2.1TOPO (Invitrogen) como insulina nativa.

Tabla 1

Secuencias de cebadores usados para la PCR

Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-)
Insulina Fw	CATAAGCTTACC <u>ATGGCCCTGTGGATGCGC</u> (SEQ ID NO: 1)
Insulina Rv	CATTCTAGACT <u>AGTTGCAGTAGTTCTCCAG</u> (SEQ ID NO: 2)
Sitio1	CTTCTACACACCCAGGACCA <u>AGCGGGAGGCAGAGGAC</u> (SEQ ID NO: 3)
Sitio2	CCCTGGAGGGG <u>TCCC</u> <u>GGCAGAAGCGTGG</u> (SEQ ID NO: 4)
B10	CACCTGTGCGG <u>ATCC</u> <u>GACCTGGTGAAGC</u> (SEQ ID NO: 5)
sPL-GLP-1Fw	TTCCACC <u>ATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCT-</u> <u>-CCCTGGGCCATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTG</u> (SEQ ID NO: 6)
sPL-GLP-1Rv	AATTAT <u>CCTCGGCCTTTCACCAGCCAAGCAATGA</u> <u>ACTCCTTGGCAGCTTG-</u> <u>-GCCTTCCAAATAAGA</u> <u>ACTTACATCACTGGTAAAGGTCCTTCAGC</u> (SEQ ID NO: 7)
GLP-5'	TTCCACC <u>ATGCTGCTGCTGC</u> (SEQ ID NO: 8)
GLP-3'	AATTAT <u>CCTCGGCCTTTCACCAG</u> (SEQ ID NO: 9)

(Las letras en negrita indican el codón de iniciación en Fw, y la secuencia antisentido del codón de terminación en Rv. Lo subrayado indica partes mutadas.)

A continuación, con el fin de expresar insulina madura en los adipositos, se realizó una modificación genética basada en la bibliografía (JBC, 1994, 269(8), 6241-). Más específicamente, se sintetizaron individualmente cebadores de ambas direcciones para que contuviesen mutaciones en cada uno de los sitios de unión entre la cadena B de insulina humana y el péptido C (sitio1), entre el mismo péptido C y la cadena A (sitio2), y el 10º residuo de histidina de la cadena B (B10) (tabla 1). Se obtuvieron los mutantes usando un kit de mutagénesis Quickchange (Stratagene). La realización de esta reacción en el sitio1 y el sitio2 produjo el mutante s1s2. La realización de la reacción en el sitio1, sitio2 y B10 produjo la insulina mutante s1s2B10. Tras confirmar la secuencia de nucleótidos del gen de la insulina humana modificado obtenido, se incorporó el gen en el vector pcDNA3.1, y entonces se usó para la transferencia génica.

(2) Transferencia génica a adipocitos de cultivo primario

Tras mezclar 500 µl de medio DMEM libre de FCS y 15 µl de reactivo Fugene 6 (Roche), se añadieron 5 µg de plásmido de transfección, y entonces esto se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió la disolución mezclada a adipocitos de cultivo primario (derivados de tejido adiposo alrededor del epidídimo de ratones C57BL/6), que se habían cultivado hasta una confluencia del 70 al 80% en una placa de 10 cm. Esto se cultivó durante 24 horas en un incubador de CO₂. Cuatro días tras la transferencia génica, se subcultivaron las células en un matraz T225, y se cultivaron durante la noche. Entonces se intercambié el medio por un medio que comprendía 0,2 mgU/ml de G418 (SIGMA), y se continuó el cultivo durante tres semanas, tras lo cual se seleccionaron células sometidas a transferencia génica. Se sembraron en placa células resistentes a G418 sobre una placa de 10 cm, y se midió la cantidad de insulina en el sobrenadante del cultivo usando un kit de EIA para insulina ultrasensible (Morinaga). Este kit de EIA detecta tanto la proinsulina, que aún no se ha procesado, como insulina madura.

[Resultados]

La figura 7 muestra la producción de (pro)insulina mediante transfección de plásmidos en adipocitos de cultivo primario. Se transfectó cada uno de los vectores pcDNA3.1Myc-His que incorporaban individualmente el gen de la insulina humana nativo (nativo) y la forma sitio 1/sitio 2/B10-modificada (s1s2B10), o un vector vacío (simulado), en adipocitos derivados del tejido adiposo que rodea al epidídimo de ratones C57BL/6. Se detectó la (pro)insulina humana en el sobrenadante del cultivo de células resistentes obtenidas mediante selección con G418. Esto demostró que también es posible la transferencia génica estable a adipocitos de cultivo primario usando un vector de plásmido.

[Ejemplo 5] Producción, usando un virus adenoasociado, de adipocitos que expresan FA de manera estable

Los métodos de transferencia génica incluyen métodos que usan virus adenoasociados (VAA).

[Métodos]

Se llevó a cabo el estudio usando el sistema AAV Helper-Free (Stratagene). Se insertó el fragmento de PLAP del ejemplo 2 (un fragmento cortado usando *HindIII* y *BglII*) en el mismo sitio de enzimas de restricción del vector pAAV-MCS, produciendo pAAV-PLAP.

5 Se llevó a cabo la producción de vector de VAA tal como sigue: se mezclaron 1,75 ml de OPTI-MEM (Invitrogen) con 220 μ l del reactivo para transfección de plásmidos Fugene, entonces se mezclaron en 25 μ g de cada uno de pAAV-PLAP, pAAV-RC y pHelper, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos (disoluciones Fugene/plásmido). Mientras tanto, se prepararon células 293-EBNA hechas crecer hasta una confluencia del 60 al 70% en una placa de 15 cm. Se cambió la disolución de cultivo a DMEM libre de FCS, entonces se instiló
10 uniformemente la disolución de Fugene/plásmido, y esto se cultivó durante dos a tres horas. Entonces se añadió FCS a una concentración final del 10%, y esto se cultivó durante dos días más. Se recogieron las células mediante tratamiento con tripsina y centrifugación, y entonces se suspendieron en Tris-HCl 50 mM y disolución de NaCl 150 mM de modo que el volumen final era de 3 ml. Se rompieron las células realizando tres ciclos de congelación con etanol-nieve carbónica/descongelación a 37°C sobre esta disolución en suspensión. Además, tras degradar el ADN genómico del huésped usando Benzonase (SIGMA), se produjo la disolución de virus mediante centrifugación a 9.000 rpm durante
15 30 minutos, seguido de filtración del sobrenadante.

Se sembraron en placa adipocitos de cultivo primario (derivados de grasa subcutánea de ratones C57BL/6) sobre una placa de 12 pocillos a 1×10^4 células/pocillo el día anterior a la transferencia génica, y se cultivaron. Entonces se trataron durante seis horas en un medio que contenía 40 mM de hidroxurea y 1 mM de ácido burítico (ambos de SIGMA). Tras eliminar este medio, se añadieron 0,5 ml/pocillo de la disolución de virus, diluida hasta 1/100 con DMEM libre de FCS. Tras cultivar durante una hora, se añadió medio que contenía FCS hasta una concentración final del 10%, y esto se cultivó durante la noche. Después de eso, se realizaron intercambios con medio normal, y se realizó el subcultivo en el 24º día.

Se intercambió el medio en el primer, séptimo y 25º día de transferencia, y se usó el sobrenadante del cultivo recogido dos días tras cada intercambio para los ensayos de FA. Se calentaron 10 μ l del sobrenadante, que se diluyó según fuese necesario, a 65°C durante 20 minutos, entonces se mezclaron 50 μ l de tampón de ensayo (NaHCO₃ 16 mM, Na₂CO₃ 12 mM, MgSO₄ 0,8 mM) y se mezclaron 50 μ l de reactivo de tinción luminiscente (CDP-Star listo para su uso con Sapphire II, TROPIX), se hicieron reaccionar en la oscuridad durante 30 minutos, y entonces se midieron con un luminómetro.

30 [Resultados]

La figura 8 muestra la expresión estable de FA en adipocitos de cultivo primario (derivados de grasa subcutánea de ratones C57BL/6) transfectados con VAA que expresaba FA. Se detectó actividad de FA en el sobrenadante del cultivo a lo largo todo el periodo de examen. Esto demostró que puede llevarse a cabo la transferencia génica estable a adipocitos de cultivo primario usando un vector de VAA.

35 [Ejemplo 6] Construcción de un vector retroviral que expresa insulina humana y transducción del mismo en adipocitos

[Métodos]

Se insertó el gen de la insulina humana modificado construido en el ejemplo 4 (s1s2B10Ins) en el vector pBabeCLX12G siguiendo el método del ejemplo 3 (pBabeCL(s1s2B10Ins)I2G). Se introdujeron este plásmido junto con un vector que codifica para VSV-G (pVPack-VSV-G/Stratagene) y un vector que codifica para Gag-Pol (modificado de pVPack-gp/Stratagene) en células 293-EBNA según el método del ejemplo 3, produciendo así el vector retroviral que expresa insulina modificada (MLV(VSV)/pBabeCL(s1s2B10Ins)I2G). Se recogió el sobrenadante del cultivo (aproximadamente 200 ml) de células 293-EBNA de veintidós placas de 10 cm, se eliminó el material insoluble mediante tratamiento de centrifugación/filtración, y entonces se produjo la disolución de virus concentrada mediante ultracentrifugación (19.500 rpm, 100 minutos). Esto se transfirió a adipocitos de cultivo primario (derivados de grasa subcutánea de C57BL/6), que se habían sembrado en placa sobre una placa de 6 pocillos en el día anterior.

Volvieron a sembrarse en placa las células sometidas a transferencia génica sobre una placa de 6 pocillos, y se indujo la diferenciación según el método del ejemplo 1. Se recogió cada sobrenadante del cultivo durante tres días, desde tres días antes de la inducción hasta el día de la iniciación de la inducción (antes de la inducción), y durante tres días desde el día 14 hasta el 17 de inducción (tras la inducción). Se sometió a ensayo la cantidad de insulina mediante el mismo método que en el ejemplo 4. Además, para confirmar que se producía el procesamiento en los sitios deseados, y que se producía insulina madura, se realizaron mediciones usando el kit de EIA para insulina (IBL), que sólo reconoce insulina madura. Se usó el sobrenadante del cultivo de células no sometidas a transferencia génica, que se sometieron simultáneamente a inducción de la diferenciación, como control.

[Resultados]

La figura 9 muestra la expresión de insulina en el momento de la inducción de la diferenciación en adipocitos de cultivo primario transducidos con vector retroviral que expresa insulina s1s2B10. (A) muestra los resultados del uso del EIA producido por Morinaga, y (B) muestra los resultados del uso del EIA producido por IBL. Estos resultados demuestran que se secreta insulina de manera estable antes como tras la inducción de la diferenciación, y que la transferencia del gen de insulina mutante puede provocar la producción de insulina madura a partir de adipocitos.

[Ejemplo 7] Construcción de un vector retroviral que expresa péptido-1 similar al glucagón humano (GLP-1), y transducción del mismo en adipocitos

GLP-1 es un péptido que se produce a partir de células L del intestino delgado durante la ingesta de alimentos, y comprende el efecto de estimulación de la secreción de insulina actuando sobre células β pancreáticas. Se sabe también que GLP-1 tiene una variedad de otros efectos antidiabéticos y antiobesidad tales como un efecto de regeneración sobre células β pancreáticas, un efector supresor del apetito y un efecto inhibitor sobre el vaciado gástrico (Meier, J.J. *et al.* Eur. J. Pharmacol. 2002, 12; 440(2-3):269-79; Drucker, D.J. Gastroenterology 2002; 122(2):531-544). Se forma un péptido que comprende las posiciones 7 a 37 de la secuencia de aminoácidos de GLP-1 (o hasta la posición 36 en la forma amida), mediante procesamiento específico de tejido del polipéptido producido a partir del gen de preproglucagón, y se sabe que comprende la actividad farmacológica principal (Drucker, D.J. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987 May; 84(10):3434-3438; Kreymann, B. *et al.* Lancet. 1987, 5; 2(8571):1300-1304; Mojsov, S. *et al.* J. Clin. Invest. 1987 Feb; 79(2):616-619). Se llevó a cabo el siguiente examen con el fin de producir este factor a partir de adipocitos.

[Métodos]

Se diseñó una secuencia de nucleótidos con un total de 156 pares de bases, que comprendía una secuencia (la SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia codificante) en la que GLP-1 humano (7-37) y un codón de terminación se unen al péptido señal (17 aminoácidos) del gen PLAP usado en el ejemplo 3. Se sintetizaron nucleótidos de modo que estaba comprendida una superposición de 22 meros en el centro (sPL-GLP-1Fw y sPL-GLP-1Rv en la tabla 1). Estos se aparearon y se formó una doble cadena usando polimerasa Pfu (Stratagene). Entonces se amplificó el fragmento diana mediante PCR usando cebadores de extremo 5' y extremo 3' (GLP-5' y GLP-3' en la tabla 1). Se subclonó este fragmento en el vector pCR2.1, entonces se cortó usando enzimas de restricción y posteriormente se insertó en el vector pBabeCLX12G, como en el ejemplo 3 (pBabeC-L(sPL-GLP1)I2G). Esto se transfectó en células 293-EBNA mediante un método similar al del ejemplo 6, produciendo un vector retroviral que expresaba GLP-1 (MLV(VSV)/pBabeCL(sPL-GLP-1)I2G). Se recogieron aproximadamente 90 ml del sobrenadante del cultivo de células 293-EBNA de nueve placas de 10 cm. Se eliminó el material insoluble mediante tratamiento de centrifugación/filtración, y entonces se ultracentrifugó el sobrenadante (19.500 rpm, 100 minutos) para producir una disolución de virus concentrada. Esto se transdujo en adipocitos de cultivo primario (derivados de grasa subcutánea de C57BL/6) que se habían sembrado en placa sobre una placa de 6 pocillos el día anterior. Entonces se sembraron en placa de nuevo los adipocitos transfectados sobre una placa de 12 pocillos, y se llevó a cabo la inducción de la diferenciación según el método del ejemplo 1. "No inducido" se refiere a una condición en la que se continuó el cultivo en un medio normal en vez de en un medio de inducción o medio maduro. Siete días después, se intercambió el medio a medio DMEM libre de FCS que comprendía valina-pirrolidina 1 mM (inhibidor enzimático de la degradación de GLP-1; sintetizado en Eisai). Se recogió el sobrenadante del cultivo 18 horas después, y se midió la cantidad de GLP-1(7-37) activo usando ELISA (LINCO).

[Resultados]

La figura 10 muestra el nivel de expresión en adipocitos de cultivo primario transfectados con vector retroviral que expresa GLP-1(7-37). Se observó expresión de GLP-1(7-37) en forma activa en el sobrenadante del cultivo tanto de adipocitos sin diferenciación inducida como con diferenciación inducida. Esto demostró que incluso cuando se produce un factor como el preprotipo y luego se corta mediante procesamiento, este método permite la producción de sólo ese factor a partir de adipocitos.

[Ejemplo 8] Implantación en ratones de células que expresan FA de manera estable (Prueba 1)

[Métodos]

Tras cultivar los adipocitos que expresaban FA (transducidos con MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP; derivados de grasa subcutánea de C57BL/6) producidos mediante el método del ejemplo 3 hasta la confluencia, se recogieron las células mediante tratamiento con tripsina, se lavaron con PBS y se suspendieron a 5×10^7 células/ml en Matrigel enfriado en hielo (Becton Dickinson). Se realizó la implantación inyectando esto en la zona subcutánea dorsal (Sc) de ratones C57BL/6 (ocho semanas de edad en el momento de la operación; Charles River) a una dosis de 0,2 ml por ratón (1×10^6 células/cabeza) (sin inducción de la diferenciación). Por otra parte, se cultivaron las mismas células hasta la confluencia, entonces se cultivaron durante tres días en el medio de inducción del ejemplo 1, y luego se implantaron mediante métodos similares (con inducción de la diferenciación). Se recogió sangre a lo largo del tiempo mediante el método indicado en el ejemplo 2, y se midió la actividad de FA en el plasma.

[Resultados]

La figura 11 muestra el cambio en la actividad de FA plasmática en ratones a los que se les implantaron adipocitos de cultivo primario que expresaban FA. Individuos que recibieron un implante de células sometidas a estimulación que indujo la diferenciación durante tres días antes de la implantación (“con inducción de la diferenciación”) mostraron menos fluctuación en la expresión continuada que individuos que recibieron un implante de células que no se indujeron. Sin embargo, ambos métodos de implantación mostraron expresión continuada a lo largo de todos los 50 días o casi de examen. Esto demuestra que la tasa de supervivencia tras el trasplante de las células puede mejorarse proporcionando estimulación que induce la diferenciación.

[Ejemplo 9] Implantación en ratones de células que expresan FA de manera estable (Prueba 2)

[Métodos]

(1) Implantación

Se cultivaron hasta la confluencia los adipocitos que expresaban FA (transducidos con MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP; derivados de grasa subcutánea de ICR) producidos en el ejemplo 3. Se recogieron las células mediante tratamiento con tripsina, se lavaron con PBS y se suspendieron a 5×10^7 células/ml en un Matrigel enfriado con hielo (Becton Dickinson) al que se añadió 1 mg/ml de bFGF (Genzyme Techne). Se realizó la implantación inyectando esto a una dosis de 0,2 ml por ratón (1×10^6 células/cabeza) en cada sitio (zona subcutánea dorsal (Sc), grasa subcutánea inguinal (grasa) y región intraperitoneal (ip)), de los ratones desnudos ICR (seis semanas de edad en el momento de la operación, Charles River). Como control, se trataron de manera similar adipocitos que expresaban GFP y se implantaron en el tejido subcutáneo.

Se cultivaron algunas de las células que expresaban FA durante tres días mediante el medio de inducción del ejemplo 1, y entonces se recogieron e implantaron de la misma manera (Dif). Tras usar el medio de inducción, se cultivaron algunas de estas células durante cuatro días en un medio de maduración, y luego se recogieron e implantaron de la misma manera (Mat).

Además, se sembraron en placa algunas de las células que expresaban FA sobre una cámara Labteck de ocho pocillos (Nunc) en las mismas condiciones usadas para la implantación (Matrigel con bFGF añadido $1 \times 10^6/0,2$ ml), y se solidificaron las células calentando a 37°C. Se llevó a cabo la implantación insertando este gel solidificado en la zona subcutánea del ratón. En el presente documento, las células cultivadas en un medio normal tras la solidificación se denominaban (pf)/gr prefijadas, y las células cultivadas en un medio que induce la diferenciación se denominaban pf/dif. Se llevó a cabo la implantación tras siete días de cultivo.

Se midió la actividad de FA en el plasma a lo largo del tiempo, antes de la implantación (día 0) y tras la implantación, según el método del ejemplo 2.

(2) Extirpación

En el grupo implantado tras la inducción de la diferenciación (Dif/Sc), se extirparon las masas de células implantadas, junto con el Matrigel, de individuos A y B, cinco y 43 semanas tras la implantación, respectivamente. Se realizó la extirpación en la muestra control en la quinta semana desde la implantación. Se administraron a cada individuo por vía intraperitoneal 50 mg/kg de Nembutal, como anestesia. Entonces se realizó una incisión en su piel y se extirpó una sección de Matrigel implantada confirmada de manera visual. Se suturó el sitio de la cirugía y se desinfectó con Isodine (Meiji). Entonces se criaron los animales de la misma manera y se recogió sangre a lo largo del tiempo.

[Resultados]

La figura 12 (A) muestra el resultado del examen del cambio en la actividad de FA plasmática a lo largo de 50 días, cuando se implantaron adipocitos de cultivo primario que expresaban FA usando Matrigel con FGF básico añadido, en presencia de estimulación de la diferenciación (grupo Dif/Sc). El cambio en la actividad de FA sanguínea fue estable durante 49 días por encima de un intervalo de 5 veces. Esto demostró que la adición de bFGF en el momento de la implantación puede mejorar adicionalmente la tasa de aceptación de injertos tras la implantación. (B) muestra la desaparición de la actividad de FA plasmática debido a la extirpación del Matrigel implantado (individuo A) a lo largo del mismo periodo de tiempo. La actividad de FA en los individuos extirpados disminuyó significativamente en comparación con el valor promedio para el grupo transducido con PLAP. Esto demostró que la FA sanguínea se deriva de las células implantadas, y que la extirpación del injerto puede eliminar rápidamente la expresión génica. En este momento, también se realizó la extirpación en una parte del grupo control, al que se implantaron células transfectadas con GFP. Se encontraron células positivas para GFP en el Matrigel extirpado, y muchas de ellas mostraron una imagen de vacuolas (C) similar a la mostrada en la figura 6(B). Esto demostró que los adipocitos de cultivo primario implantados mediante este método pueden injertarse como tejido adiposo maduro *in vivo*.

La figura 13 muestra el resultado de un examen a largo plazo de la actividad de FA sanguínea en los ratones implantados de la figura 12 (A), y en ratones que recibieron un implante mediante una variedad de otros métodos. En el grupo al que se implantaron células transfectadas con PLAP, se confirmó un aumento evidente de la actividad de FA

5 sanguínea para todos los sitios de implantación y métodos de implantación. Se mantuvo la actividad de FA sanguínea durante un periodo largo y, en particular, se observó expresión estable de FA durante un año durante el periodo de prueba del grupo Dif/Sc (el grupo descrito en la figura 12 (A)). También se confirmó la producción de FA continua para los otros métodos de implantación, durante todo el periodo de examen (316 días para el grupo ip, 54 días para el grupo de grasa, 225 días para el grupo Sc, 317 días para el grupo Mat/Sc y 314 días para los dos grupos prefijados). El pico de actividad observado en el plazo de una semana de implantación fue el más alto en el grupo ip. Los valores más altos fueron entonces en el orden de Sc > grasa > Dif/Sc \approx pf-dif > pf-gr \approx Mat/Sc. Se observó el intervalo de variación tras la implantación como una razón entre la actividad tras 13 semanas y la actividad pico, que puede compararse en todos los grupos. La varianza fue la más pequeña, aproximadamente tres veces, en los dos grupos prefijados, aproximadamente cinco veces en los grupos ip, Dif/Sc y Mat/Sc, y aproximadamente diez veces en los grupos Sc y grasa. El valor pico inmediatamente tras la implantación, y el intervalo de variación tras la implantación difirieron para cada método de implantación. Por tanto, puede usarse cualquiera de estos métodos según las características del producto génico usado, las características patológicas y la simplicidad de la técnica. Esto demostró que puede realizarse la implantación de adipocitos de cultivo primario, a los que se introdujeron genes de manera estable *ex vivo*, mediante una variedad de métodos, y que es posible la expresión génica *in vivo* estable a largo plazo tras la implantación.

10 La figura 14 muestra el resultado de realizar un experimento de extirpación, similar al descrito en la figura 12(B), en la fase tardía de la implantación. Se confirmó que la actividad de FA sanguínea tras la extirpación desaparecía rápidamente, no sólo en individuos en los que se realizó la extirpación en las fases tempranas de la implantación (individuo A), sino también en individuos en el que se realizó la extirpación en las fases tardías de la implantación (individuo B). Esto demostró que los adipocitos implantados mediante este método se ubican en el sitio implantado durante un periodo largo tras la implantación, y su extirpación, cuando sea apropiada, puede eliminar la expresión génica independientemente del momento.

[Ejemplo 10] Trasplante en ratones de células que expresan FA de manera estable

(Prueba 3)

25 Se llevaron a cabo los siguientes exámenes para confirmar la dependencia de la "dosis" del número de células implantadas.

[Métodos]

30 Se cultivaron hasta la confluencia los adipocitos que expresaban FA producidos en el ejemplo 3 (transfectados con MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP; derivados de grasa subcutánea de ICR). Se cultivaron las células durante tres días en el medio de inducción indicado en el ejemplo 1, y entonces se recogieron mediante tratamiento con tripsina. Tras lavar con PBS, se suspendieron las células a 5×10^7 células/ml en Matrigel. Se llevó a cabo una dilución gradual de 5 veces en la disolución de suspensión de células con FA usando Matrigel, y se prepararon disoluciones de 1×10^7 células/ml y 2×10^6 células/ml, respectivamente. Se añadió bFGF a estas disoluciones a una concentración final de 1 mg/ml, y entonces se implantaron en la zona subcutánea dorsal de ratones desnudos ICR a una dosis de 0,2 ml por ratón (dosis alta: 1×10^6 células/cabeza; dosis media: 2×10^5 células/cabeza; dosis baja: 4×10^4 células/cabeza). Como control, se trataron de manera similar adipocitos que expresaban GFP, y se implantaron en el tejido subcutáneo en las mismas condiciones que para condiciones de dosis alta (1×10^6 células/cabeza).

[Resultados]

40 La figura 15 muestra la dependencia de la actividad de FA sanguínea del número de células implantadas cuando se implantaron adipocitos que expresaban FA. Se observó actividad de FA sanguínea dependiente de la dosis al cambiar el número de células implantadas, y esto no se vio influido por la duración. Más específicamente, los grupos de dosis baja o media no mostraron un pico en la fase temprana de la implantación, lo que se observó en el grupo de dosis alta, y el intervalo de fluctuación fue más estrecho. Esto demostró que el nivel de expresión *in vivo* puede ajustarse fácilmente usando el número de células implantadas, y que ajustando el número óptimo de células, puede estabilizarse la concentración sanguínea tras la implantación.

[Ejemplo 11] Efecto hipoglicémico en ratones modelo de diabetes debido a la implantación de adipocitos que expresan insulina

[Métodos]

50 Se produjeron ratones diabéticos administrando por vía intravenosa a ratones C57BL/6 macho de ocho semanas de edad 10 ml/kg de estreptozotocina 170 mg/kg (STZ, SIGMA). Se midieron individualmente los niveles de glucosa en sangre en ayunas (GSA) a una y dos semanas tras la administración de STZ, y se determinó que individuos con GSA de 300 mg/dl o más tenían diabetes. Se midió en nivel de azúcar en sangre realizando un tratamiento con perclorato inmediatamente tras la recogida de sangre completa, y luego usando la prueba-II de glucosa (WAKO).

55 Se sometieron los adipocitos transfectados con MLV(VSV)/pBabeCL(s1s2B10Ins)I2G producidos en el ejemplo 6 a estimulación de la inducción de la diferenciación usando el mismo método que en el ejemplo 10, y entonces se

5 suspendieron a 5×10^7 células/ml en Matrigel al que se había añadido $1 \mu\text{g/ml}$ de bFGF. Se implantó esta disolución en suspensión en la zona subcutánea dorsal de cada ratón diabético, a 0,2 ml por sitio, hasta un total de cuatro sitios (cuatro $\times 10^6$ /cabeza). Para el grupo control, se implantaron adipocitos no sometidos a transferencia génica mediante el mismo método. Se realizó la implantación 19 días tras el tratamiento con STZ, y después de eso, se midió el nivel de GSA a lo largo del tiempo. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante la comparación con el grupo control (prueba t para datos independientes).

[Resultados]

10 La figura 16 muestra el efecto de la implantación de adipocitos que expresan insulina s1s2B10 en ratones con diabetes inducida con STZ. Se implantaron células no sometidas a transferencia génica como control. El nivel de glucosa en sangre del grupo al que se implantaron células que expresaban insulina tendía a disminuir a partir del séptimo día de implantación, y se indicó un efecto hipoglucémico significativo en el día 13 y 21 de la implantación (A). El peso corporal 20 días tras la implantación era significativamente superior en el grupo al que se implantaron células que expresaban insulina que en el grupo control, y por tanto se mejoró la pérdida de peso debida a la diabetes (B). Los resultados del examen usando FA sugieren que este efecto hipoglucémico se mantendrá durante un periodo largo. Por tanto, se demostró que el producto génico foráneo producido a partir de los adipocitos de cultivo primario implantados puede contribuir a la modificación de la patología del receptor, lo que indica que este método puede tratar la diabetes.

Aplicabilidad industrial

20 La presente invención estableció métodos de transferencia *ex vivo* de un gen foráneo en adipocitos de cultivo primario adecuados para terapia génica, y estableció adipocitos de cultivo primario que mantienen de manera estable un gen foráneo.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> EISAI CO., LTD.

<120> ADIPOCITOS DE CULTIVO PRIMARIO PARA TERAPIA GÉNICA

<130> E1-A0305Y1P

<150> JP 2002-177648

<151> 18-06-2002

<150> JP 2002-237974

<151> 19-08-2002

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para amplificar el gen de la insulina humana

<400> 1

cataagctta ccatggccct gtggatgcgc 30

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para amplificar el gen de la insulina humana

<400> 2

cattctagac tagttgcagt agttctccag 30

<210> 3

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para mutagénesis

<400> 3

ctctacaca cccaggacca agcgggaggc agaggac 37

<210> 4

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para mutagénesis

<400> 4

ccctggaggg atcccggcag aagcgtgg 28

<210> 5

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para mutagénesis

<400> 5

cacctgtgcg gatccgacct ggtggaagc 29

<210> 6

<211> 83

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para construir un gen que codifica para un GLP-1 secretor humano

<400> 6

ttccaccatg ctgctgtgc tgctgctgct gggcctgagg ctacagctct ccctgggcca 60

tgctgaaggg acctttacca gtg 83

<210> 7

<211> 95

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para construir un gen que codifica para un GLP-1 secretor humano

<400> 7

aattatcctc ggcctttcac cagccaagca atgaactcct tggcagcttg gccttccaaa 60

taagaactta catcactggt aaaggtccct tcagc 95

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para PCR

<400> 8

ttccaccatg ctgctgctgc 20

<210> 9

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para PCR

<400> 9

aattatcctc ggcctttcac cag 23

<210> 10

<211> 144

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> un gen que codifica para un GLP-1 secretor humano

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(144)

<223>

<400> 10

atg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ggc ctg agg cta cag ctc tcc ctg 48
 Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 1 5 10 15

ggc cat gct gaa ggg acc ttt acc agt gat gta agt tct tat ttg gaa 96
 Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu
 20 -25 30

ggc caa gct gcc aag gag ttc att gct tgg ctg gtg aaa ggc cga gga 144
 Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 35 40 45

<210> 11

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Un GLP-1 secretor humano

<400> 11

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu
 20 25 30

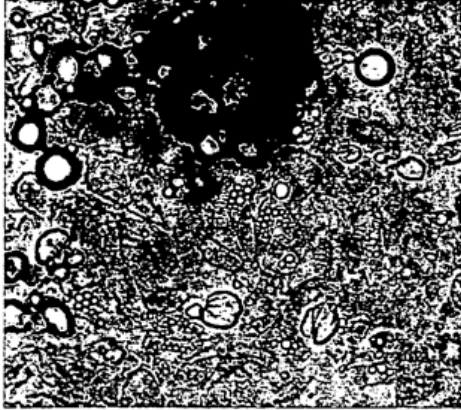
Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 35 40 45

REIVINDICACIONES

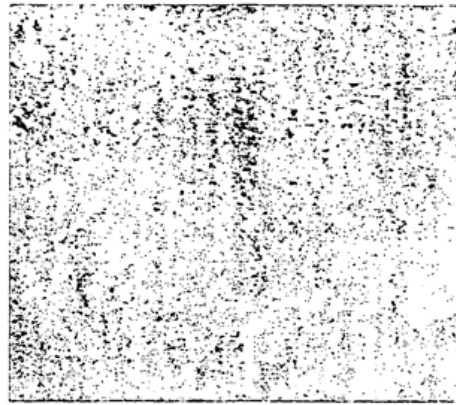
1. Composición farmacéutica que comprende un preadipocito de cultivo primario, en la que el preadipocito mantiene de manera estable un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula y en la que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral, en la que la proteína es insulina o péptido 1 similar al glucagón (GLP-1).
2. Preadipocito de cultivo primario, en el que el preadipocito mantiene de manera estable un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula, y en el que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral, para su uso en terapia génica, en el que la proteína es insulina o GLP-1.
3. Composición farmacéutica de la reivindicación 1, o preadipocito para su uso según la reivindicación 2, en la que el preadipocito tiene la capacidad para expresar significativamente la proteína *in vivo* durante al menos 20 días.
4. Composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 3, o preadipocito para su uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que el preadipocito se usa para liberar la proteína en el flujo sanguíneo.
5. Método de producción *in vitro* de un preadipocito para su uso en terapia génica, donde el método comprende las etapas de:
 - (1) llevar a cabo un cultivo primario de un preadipocito; y
 - (2) transferir, y después mantener de manera estable un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula,en el que la proteína es insulina o GLP-1.
6. Método de la reivindicación 5, en el que el gen foráneo se transfiere mediante un vector retroviral.
7. Preadipocito para su uso según la reivindicación 2 que se ha producido mediante el método de la reivindicación 5 ó 6.
8. Composición de implante, donde la composición comprende un preadipocito de cultivo primario, que mantiene de manera estable un gen foráneo que codifica para una proteína que se secreta fuera de la célula, y en la que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en terapia génica, en la que la proteína es insulina o GLP-1.
9. Composición de implante para su uso según la reivindicación 8, o composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, que comprende además un componente de matriz extracelular.
10. Composición de implante para su uso según la reivindicación 8 ó 9, o composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 9, que comprende además un factor de angiogénesis.
11. Preadipocito de cultivo primario que mantiene de manera estable un gen que codifica para insulina o péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) para su uso en la disminución de la glucemia, en el que el gen se ha insertado en un vector retroviral y se ha transferido a la célula mediante el vector retroviral.
12. Animal no humano, en cuyo organismo se ha implantado el preadipocito de cultivo primario de la reivindicación 2.

FIG. 1

(A)



(B)



(C)



(D)

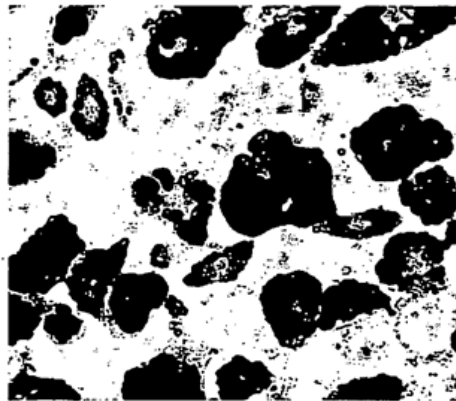


FIG. 2

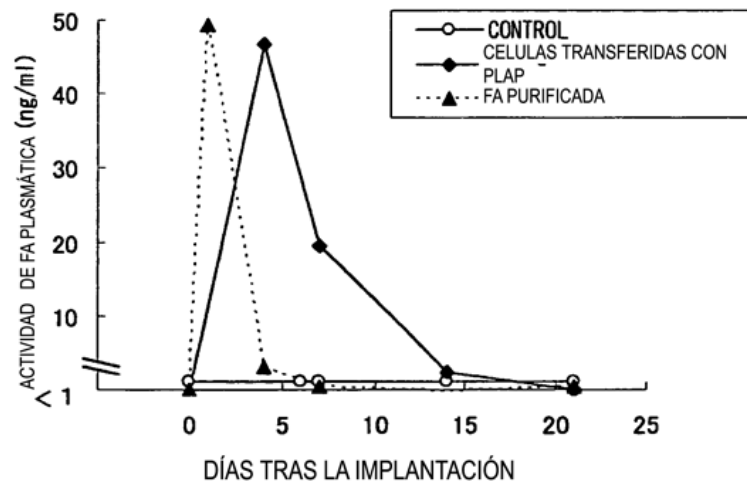


FIG. 3

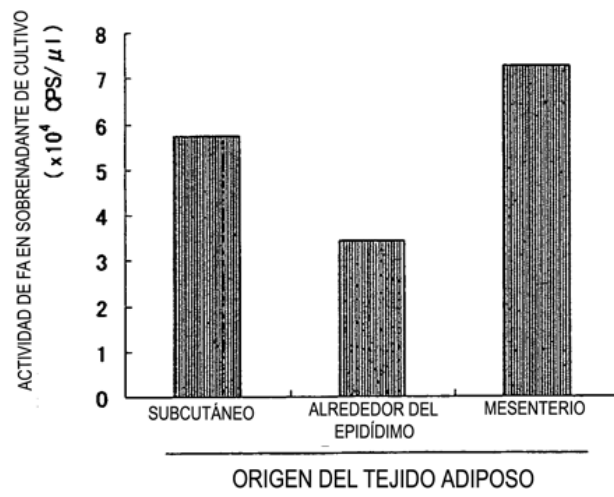
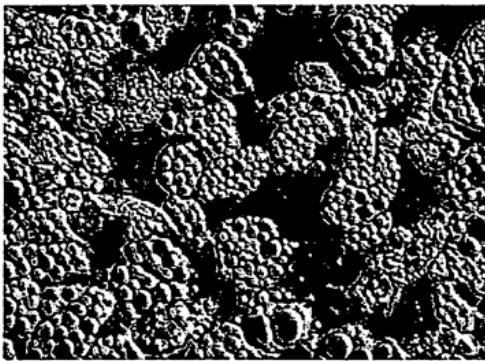


FIG. 4

(A)



(B)



FIG. 5

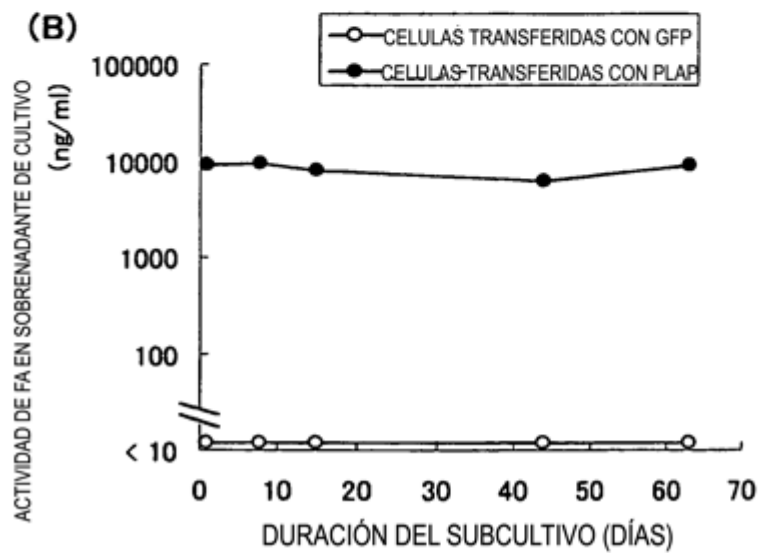
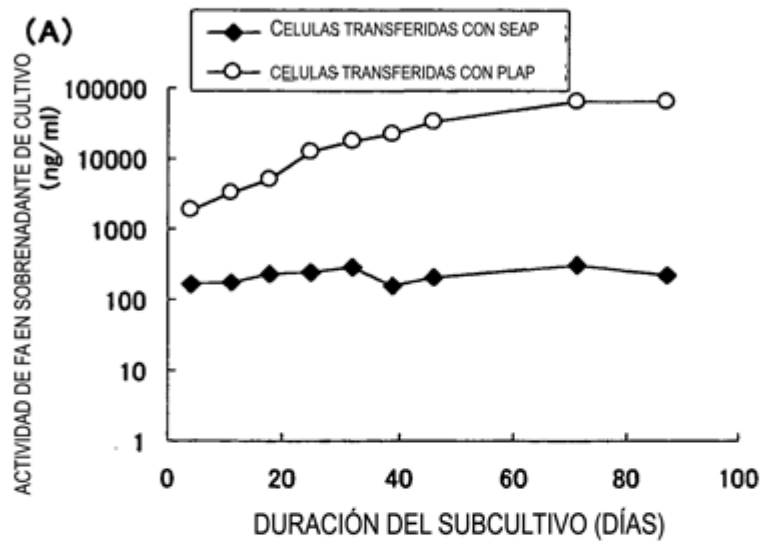


FIG. 6

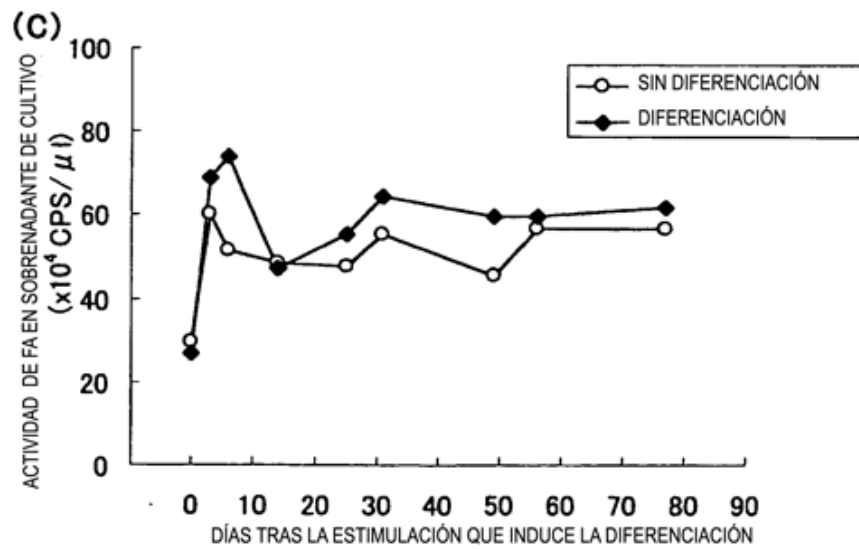
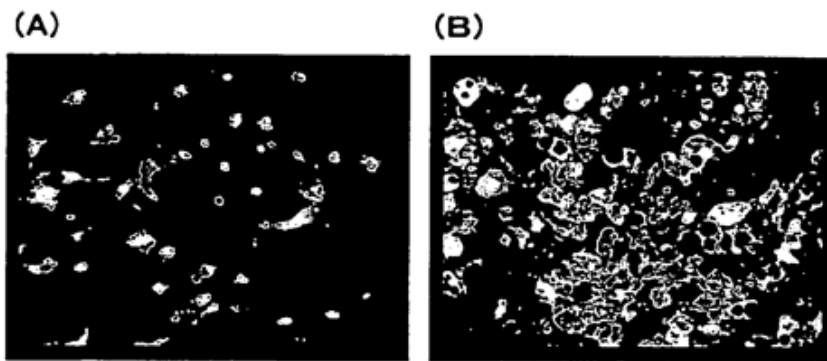


FIG. 7

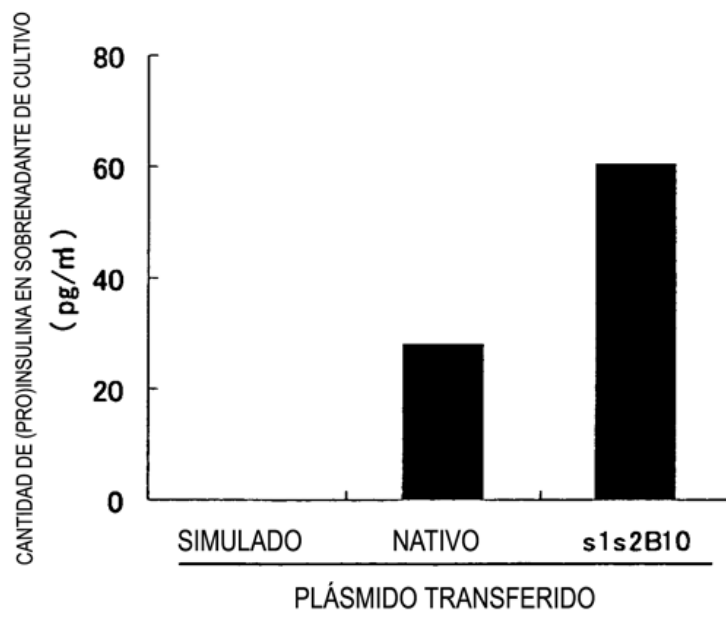


FIG. 8

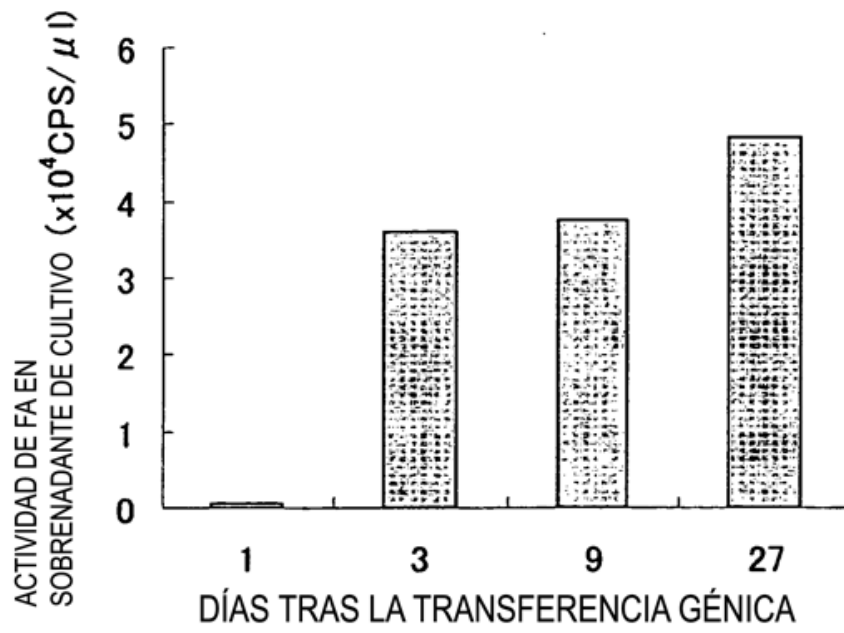


FIG. 9

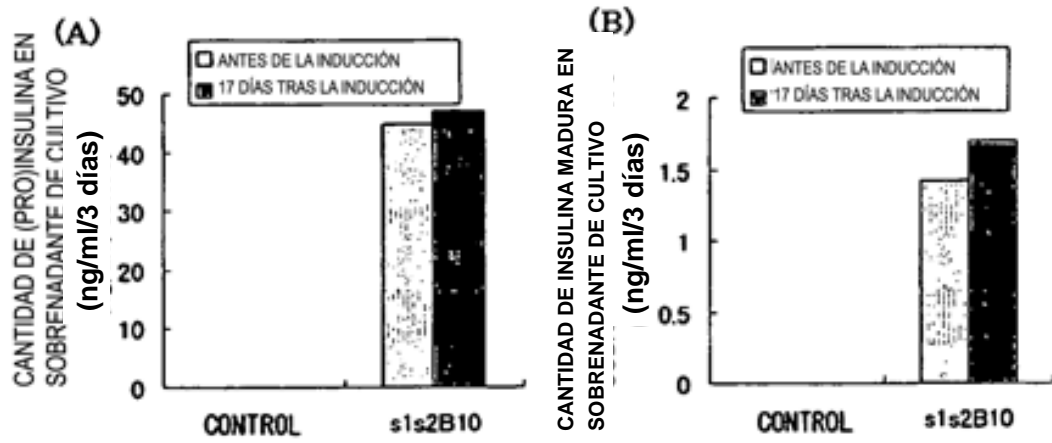


FIG. 10

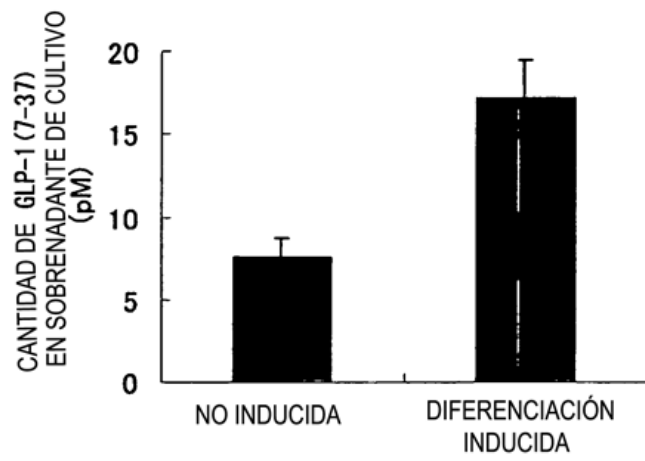


FIG. 11

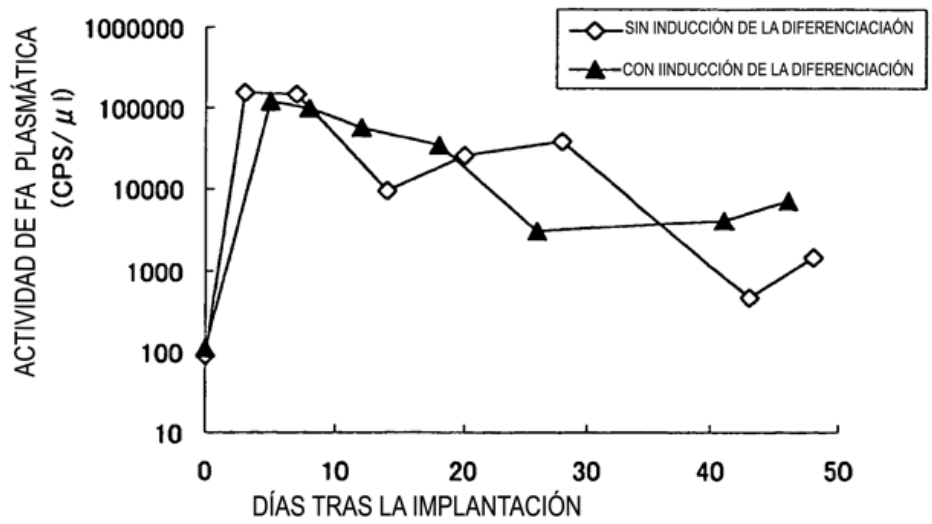
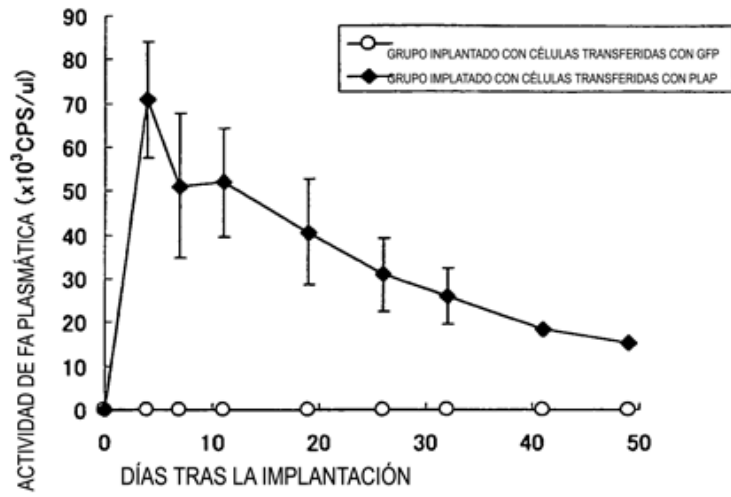


FIG. 12

(A)



(B)



(C)

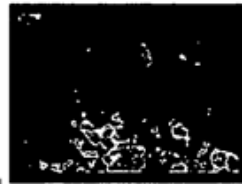


FIG. 13

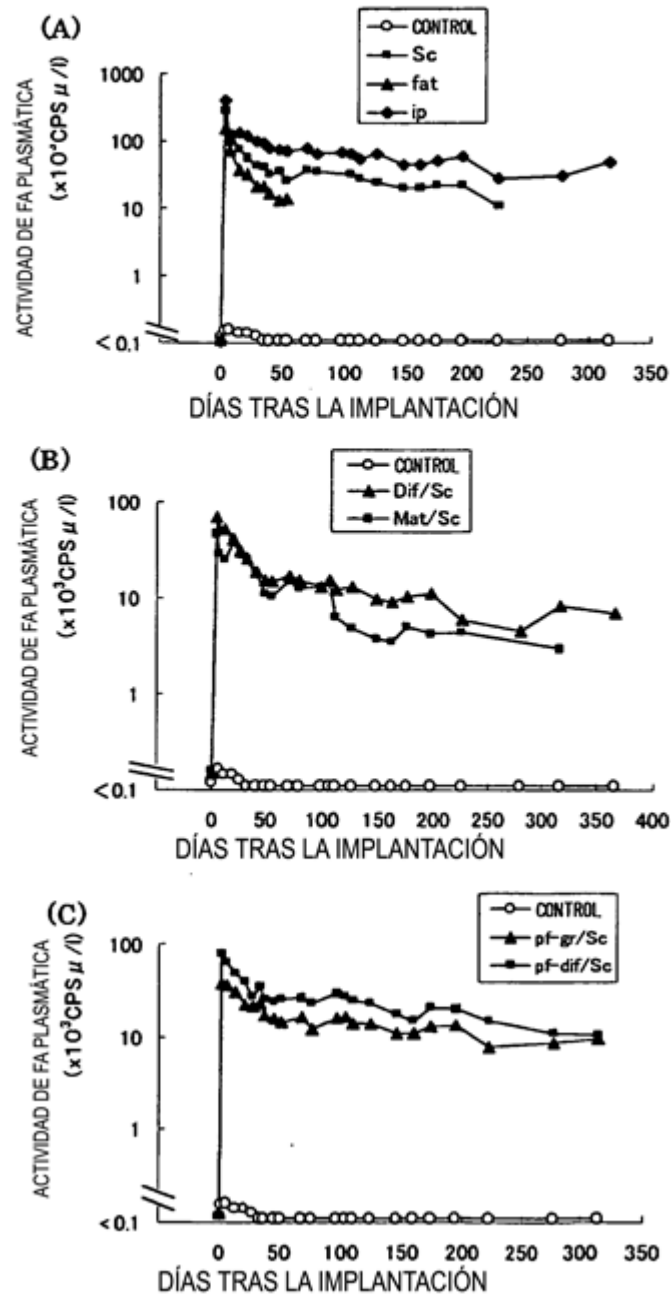


FIG. 14

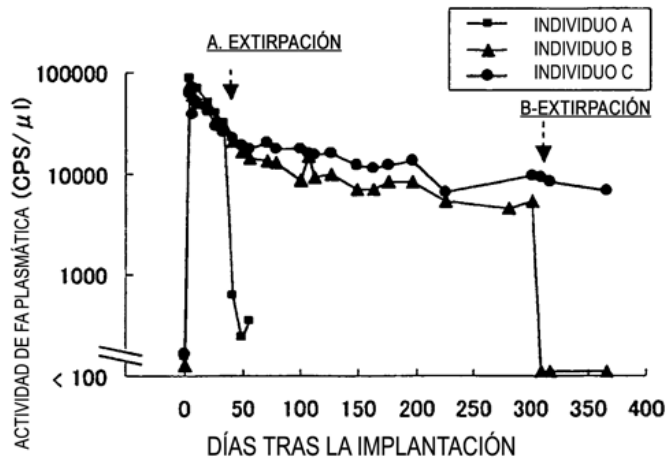


FIG. 15

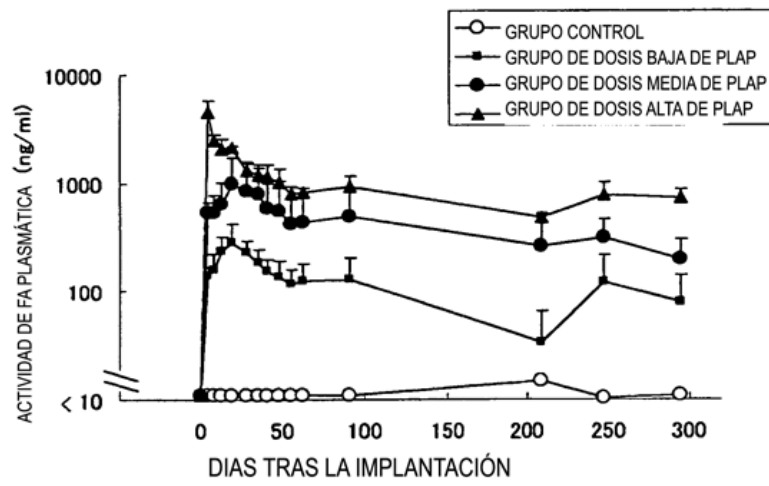


FIG. 16

