



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 810**

51 Int. Cl.:
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07724702 .1**
96 Fecha de presentación : **27.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2015736**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54 Título: **Microcápsulas esféricas o no esféricas que comprenden péptidos GLP-1, su producción y su uso.**

30 Prioridad: **10.05.2006 EP 06009678**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2011

73 Titular/es: **BIOCOMPATIBLES UK LIMITED**
Chapman House, Farnham Business Park
Weydon Lane
Farnham Surrey GU9 8QL, GB

72 Inventor/es: **Geigle, Peter;**
Wallrapp, Christine;
Thoenes, Eric y
Thürmer, Frank

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 363 810 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microcápsulas esféricas o no esféricas que comprenden péptidos GLP-1, su producción y su uso.

La presente invención se refiere a microcápsulas esféricas que comprenden al menos un revestimiento superficial y un núcleo, donde el al menos un revestimiento superficial comprende polímeros reticulados, en las que el núcleo comprende polímeros reticulados y células transfectadas con y capaces de expresar y secretar un péptido de fusión que comprende GLP-1 o un fragmento o una variante del mismo seleccionados de un péptido de fusión que comprende como componente (I) en el extremo N-terminal una secuencia de GLP-1(7-35, 7-36 ó 7-37) o un fragmento funcional o una variante de la misma, y como componente (II) en el extremo C-terminal una secuencia peptídica de como mínimo 9 aminoácidos y donde el péptido de fusión, sus fragmentos o variantes conservan la actividad biológica del GLP-1 nativo.

La presente solicitud está dirigida a métodos para producir estas microcápsulas esféricas y al uso de estas microcápsulas, por ejemplo en el tratamiento de la diabetes tipo 2, trastornos de peso y enfermedades o estados asociados a los mismos, trastornos neurodegenerativos y enfermedades o estados asociados(as) a los mismos, o para el tratamiento de trastornos y enfermedades o estados asociados(as) a la apoptosis.

El gen del glucagón está bien estudiado, véase por ejemplo White, J.W. y col., 1986, Nucleic Acid Res. 14(12) 4719-4730. La molécula del preproglucagón, como molécula precursora de alto peso molecular, se sintetiza en las células alfa pancreáticas y en las células L del yeyuno y colon. El preproglucagón es una prohormona de 180 aminoácidos de longitud y su secuencia contiene, además de glucagón, dos secuencias de estructura afín: péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y péptido 2 similar al glucagón (GLP-2). En la molécula de preproglucagón, entre el GLP-1 y el GLP-2, se halla una secuencia peptídica de 17 aminoácidos (o más bien una secuencia de 15 aminoácidos más el sitio de escisión RR C-terminal), el péptido interpuesto 2 (IP2). La secuencia de IP2 (situada entre el GLP-1 y el GLP-2 en la molécula precursora) se escinde normalmente por proteólisis después del aa 37 de GLP-1. Por tanto, la molécula del preproglucagón se escinde en distintos péptidos, dependiendo de la célula y del entorno, entre los que se incluye GLP-1 (1-37), un péptido de 37 aminoácidos en su forma no procesada. Por lo general, este procesamiento se realiza en el páncreas y el intestino. La secuencia del GLP-1 (1-37) puede continuar procesándose por proteólisis, dando como resultado GLP-1 activo (7-37), la forma procesada de 31 aminoácidos, o amida de GLP-1 (7-36). Por consiguiente, la designación GLP-1(7-37) significa que el fragmento en cuestión comprende los residuos aminoácidos número 7 (incluido) al número 37 (incluido), contando desde el extremo N-terminal del péptido de partida, GLP-1. La secuencia de aminoácidos de la amida de GLP-1(7-36) y del GLP-1 (7-37) se indica en la fórmula I (SEQ ID NO: 25):

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-X (I)

que representa la amida de GLP-1(7-36) si X es NH₂ y GLP-1 (7-37) si X es Gly-OH.

El GLP-1 es una hormona intestinal y es el agente insulínico endógeno más potente, con efectos entre los que se incluye la estimulación de la actividad de la adenilato-ciclasa y la proteína-quinasa en las células beta. Fisiológicamente, junto con los polipéptidos inhibidores gástricos del intestino superior, hace las veces de una hormona incretina que reduce el nivel de glucemia. Por consiguiente, el GLP-1, secretado en respuesta a la ingesta de alimentos, tiene múltiples efectos por ejemplo en el estómago, el hígado, el páncreas y el cerebro, que obran conjuntamente para regular el azúcar en sangre. Por tanto, la amida del péptido similar al glucagón GLP-1(7-36) y su análogo no amidado GLP-1(7-37) han despertado un considerable interés debido a sus potentes efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos y su aplicabilidad potencial al tratamiento de la diabetes, incluyendo la diabetes tipo 2. La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina, esto es que las células no responden apropiadamente cuando hay insulina presente. Este es un problema más complicado que la diabetes tipo 1. La diabetes tipo 2 puede pasar inadvertida durante años en un paciente antes del diagnóstico, dado que los síntomas son generalmente más leves (sin cetoacidosis) y pueden ser esporádicos. No obstante, una diabetes tipo 2 inadvertida puede tener como resultado complicaciones graves, incluyendo insuficiencia renal y enfermedad cardíaca coronaria. Esto lleva a una mayor morbilidad y mortalidad.

Sin embargo, la amida de GLP-1 (7-36), o el GLP-1(7-37), tiene una vida corta en suero. El péptido es escindido por la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV) entre los residuos 8 y 9, de lo que resulta un péptido inactivo. Así, el GLP-1, administrado de forma exógena tiene una vida sumamente corta en el paciente tratado y, por tanto, no ejerce sus efectos fisiológicos en aplicaciones terapéuticas.

Se han llevado a cabo diversos intentos para sintetizar análogos estabilizados (contra DPP-IV) de GLP-1 (GLP-1(7-37)) presentes en la naturaleza. En particular se sustituyó el residuo 8, que *in vivo* es Ala, por otro residuo, por ejemplo Gly, Ser o Thr (Burcelin, R. y col. (1999), Metabolism 48, 252-258). El Gly8 y el análogo de G8 se han ensayado exhaustivamente, ambos como moléculas sintetizadas, y se han producido mediante líneas celulares diseñadas genéticamente para secretar el polipéptido mutante (Burcelin, R., y col. (1999), Annals of the New York Academy of Sciences 875: 277-285). En el GLP-1 (7-37) se han introducido otras diversas modificaciones para

mejorar su estabilidad *in vivo* sin comprometer su actividad biológica. Sin embargo, ninguno de estos planteamientos ha llegado a tener significación terapéutica alguna debido a los considerables problemas implicados.

Además, ninguno de estos planteamientos permite un suministro de larga duración de GLP-1 *in vivo*. Esto es debido a la degradación proteolítica arriba mencionada, al metabolismo del GLP-1 y a la degradación normal de proteínas que se produce en el cuerpo en general. Así, el paciente necesitado de GLP-1 debe recibir una o incluso múltiples dosis de GLP-1, o sus análogos o variantes, a intervalos cortos durante un largo período de tiempo o, incluso peor, durante toda la vida o, de cualquier modo, mientras padezca la enfermedad a tratar. Por consiguiente, un doctor en medicina o bien el propio paciente debe administrar dosis de GLP-1. Con el fin de evitar este problema, el GLP-1 puede administrarse proporcionando a un paciente células que contengan un ácido nucleico que codifique y exprese GLP-1. El implante de tales células aseguraría un suministro a más largo plazo de GLP-1 *in vivo* y, gracias a la secreción de GLP-1 desde las células injertadas, proporcionar GLP-1 directamente en el lugar de interés.

El documento WO 99/53064 da a conocer por ejemplo una estrategia para crear un casete de expresión de GLP-1 multimérico que puede incorporarse a diversos tipos de células, que son líneas celulares inmortalizadas públicas disponibles, y dividir los cultivos celulares primarios. Entre los ejemplos se incluyen neuroesferas sensibles al EGF, células madre progenitoras neurales sensibles al bFGF del SNC de mamíferos, aunque el ejemplo puesto en práctica utiliza células renales de cría de hámster (BHK). Se decía que las células transfectadas implantadas se habían utilizado para tratar con éxito a ratones diabéticos, permitiendo un control de la glucosa sustancialmente equivalente a los controles no diabéticos. Sin embargo, este tipo de técnica de implante no cumple los requisitos de un tratamiento rutinario para, por ejemplo, pacientes diabéticos.

Además, es conocido en el estado de la técnica actual que, por regla general, el sistema inmunitario reconoce las células extrañas y provoca una respuesta inmunitaria con el fin de proteger al organismo contra el material externo, por ejemplo células extrañas. El implante de células capaces de expresar GLP-1 o cualquiera de sus variantes o derivados puede llevar así a una respuesta inmunitaria en el organismo. Tal respuesta defensiva puede causar efectos colaterales considerables y no deseables durante el tratamiento y llevar a complicaciones graves o incluso a la muerte del organismo tratado.

Para resumir, actualmente no se dispone en la técnica de ninguna terapia eficaz para la diabetes tipo 2 que permita reducir el nivel de glucemia en base al GLP-1 durante un período de tiempo duradero. En otras palabras, el estado de la técnica no es capaz de proporcionar una terapia que refleje todo el espectro de los efectos beneficiosos conocidos del GLP-1, por ejemplo su actividad para reducir en gran medida la entrada de nutrientes en la circulación en sujetos obesos o su actividad estimuladora de la insulina, sin necesidad de una administración reiterada de péptido(s) GLP-1 ni/o el riesgo de una respuesta inmunitaria no deseada contra, por ejemplo, células alogénicas implantadas que expresen GLP-1.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar moléculas peptídicas basadas en GLP-1 que sean biológicamente activas *in vivo* durante un período de tiempo duradero, sin la necesidad de una administración reiterada de péptido(s) GLP-1 o el riesgo de provocar una respuesta inmunitaria no deseada.

El objeto subyacente a la presente invención se logra proporcionando una microcápsula esférica que comprende al menos un revestimiento superficial y un núcleo (esférico), microcápsula en la que el al menos un revestimiento superficial comprende o consiste en polímeros reticulados, microcápsula en la que el núcleo (esférico) comprende o consiste en polímeros reticulados y células transfectadas con y capaces de expresar y secretar un péptido de fusión que comprende: como componente (I), en el extremo N-terminal, una secuencia de GLP-1(7-35, 7-36 ó 7-37), o un fragmento o una variante funcional de la misma, y, como componente (II), en el extremo C-terminal, una secuencia peptídica de como mínimo 9 aminoácidos y microcápsula en la que el péptido de fusión, sus fragmentos o variantes conservan la actividad biológica del GLP-1 nativo.

Normalmente, el núcleo (esférico) de la microcápsula esférica de la invención comprende o consiste en polímeros reticulados y células transfectadas con y capaces de expresar y secretar un péptido de fusión que comprende: como componente (I), en el extremo N-terminal, una secuencia de GLP-1(7-35, 7-36 ó 7-37), o un fragmento o una variante funcional de la misma, y, como componente (II), en el extremo C-terminal, una secuencia peptídica de como mínimo 9 aminoácidos, conservando el péptido de fusión, sus fragmentos o variantes la actividad biológica del GLP-1 nativo.

En el contexto de la presente invención, los polímeros reticulados del núcleo (esférico), esto es el núcleo puede ser esférico o no, forman una estructura tipo andamio que incluye la o las células en sus cavidades. Las células pueden estar incluidas en la estructura tipo andamio individualmente o, normalmente, en forma de agregados, por ejemplo como (un pool de) células agregadas, con un número de células entre aproximadamente 10 y aproximadamente 10.000, por ejemplo entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1.000 o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 10.000 células. El núcleo (esférico) comprende preferentemente una distribución homogénea de los polímeros reticulados y de células incluidas capaces de expresar y secretar un péptido de fusión que comprende GLP-1 o un fragmento o una variante del mismo. El núcleo, incluyendo la estructura tipo andamio y las células incluidas según se han definido anteriormente, se prepara preferentemente según el método descrito más abajo.

Las células pueden estar presentes en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención en una concentración de $0,5 \times 10^7$ células/ml de polímero de andamio reticulado a 5×10^8 células/ml de polímero de andamio reticulado, preferentemente en una concentración de 1×10^7 células/ml de polímero de andamio reticulado a 5×10^7 células/ml de polímero de andamio reticulado y en especial en una concentración de 2×10^7 células/ml de polímero de andamio reticulado a 4×10^7 células/ml de polímero de andamio reticulado.

El diámetro del núcleo de la microcápsula esférica de la invención puede variar ventajosamente en gran medida dependiendo del tratamiento específico. Normalmente, el diámetro del núcleo de la microcápsula esférica de la invención oscila entre aproximadamente 20 y aproximadamente 4.000 μm , preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 3.000 μm y en especial entre aproximadamente 20 y aproximadamente 2.000 μm .

A la hora de preparar las microcápsulas esféricas de la invención tiene una importancia crítica incluir las células encapsuladas (alogénicas) por completo en la matriz polimérica. El término "esféricas" se entiende en su significado más amplio. Se entiende que una partícula esférica tiene una forma similar a la de una esfera, pudiendo la forma ser simétrica o asimétrica. Por ejemplo, una microcápsula esférica puede tener forma elipsoidal. En una realización, la microcápsula de la invención puede no ser esférica dentro del significado anterior, sino tener una forma arbitraria con, por ejemplo, con segmentos salientes o entrantes en la superficie de la microcápsula. Siempre que en la presente revelación se mencionen microcápsulas "esféricas", también pueden proporcionarse, prepararse o usarse microcápsulas "no esféricas".

Las células (alogénicas) situadas en la periferia del núcleo o las células que sobresalgan de la estructura de andamio pueden provocar problemas inmunológicos, dado que el sistema inmunitario reconocerá estas microcápsulas como componentes extraños y, así, estas microcápsulas serán atacadas por el sistema inmunitario. Aunque este efecto puede evitarse reduciendo la concentración de células en la solución inicial, la presente invención permite mejorar la eficacia de la microcápsula aumentando el número de células en el núcleo. Cuanto mayor es la concentración de células encapsuladas, tanto menor es el volumen total de las microcápsulas resultantes que han de trasplantarse. Con el fin de evitar problemas inmunológicos a la hora de utilizar altas concentraciones de células en el núcleo, la invención prevé como mínimo un revestimiento superficial aplicado sobre el núcleo (esférico) de la microcápsula esférica de la invención. Este revestimiento superficial impide que se produzca una respuesta inmunitaria incluso en caso de que haya células situadas muy cerca de la periferia del núcleo, dado que estas células no son accesibles para el sistema inmunitario del anfitrión gracias a que el revestimiento superficial actúa como barrera. Normalmente, este revestimiento superficial está compuesto por un polímero reticulado según se ha definido anteriormente y no contiene células. Según una realización especial, el núcleo (esférico) anteriormente definido está revestido con al menos uno o más de un revestimiento superficial, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 5-10 o más revestimientos superficiales. En general, cada revestimiento superficial presenta un espesor uniforme alrededor del núcleo. El espesor del o de los revestimientos superficiales de la microcápsula de la invención puede variar casi de forma arbitraria y normalmente se encuentra entre aproximadamente 10 y aproximadamente 4.000 μm , preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 3.000 μm y en especial entre aproximadamente 10 y aproximadamente 2.000 μm .

Para la formación del núcleo (esférico) y del o de los revestimientos superficiales de la microcápsula esférica de la invención puede utilizarse cualquier polímero (reticulable) conocido en la técnica que sea adecuado para el encapsulado. Preferentemente se utilizan polímeros que, por una parte, sean permeables en su estado reticulado, para el suministro de oxígeno y nutrientes y, por otra parte, permitan la difusión del péptido expresado y secretado por las células del núcleo de la microcápsula al tejido o los líquidos corporales del paciente. Además, los polímeros reticulados impiden la penetración de componentes del sistema inmunitario del cuerpo a través de la matriz. A modo de ejemplo, pueden utilizarse polímeros tales como (bio)polímeros hidrosolubles sintéticos, semisintéticos y naturales, por ejemplo polímeros naturales tales como proteínas seleccionadas o polímeros seleccionados basados en proteínas (por ejemplo colágenos, albúminas, etc.), poliaminoácidos (por ejemplo poli-L-lisina, ácido poli-L-glutámico, etc.), polisacáridos y sus derivados (por ejemplo carboximetilcelulosa, sulfato de celulosa, agarosa, alginatos, incluyendo alginatos de alga parda (por ejemplo de las especies Laminariales, Ectocarpales, Fucales), carragenanos, ácido hialurónico, heparina y sulfatos de glucosamina afines, dextranos y sus derivados, quitosano y sus derivados). También pueden utilizarse polímeros sintéticos tales, por ejemplo poliésteres alifáticos (por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polihidroxibutiratos, etc.), poliamidas, polianhídridos, poliortoésteres, polifosfacenos, poliuretanos termoplásticos, alcoholes polivinílicos, polimetacrilatos de hidroxietilo, polimetacrilatos de metilo y politetrafluoretilenos, etc. Aquí pueden utilizarse además correspondientemente polímeros en bloque, es decir polímeros derivados por combinación de dos o más de los polímeros mencionados. Tales polímeros en bloque pueden seleccionarse por parte del técnico en la materia en función de las propiedades deseadas, por ejemplo el tamaño de poro, el estado de reticulación, la toxicidad, el manejo, la biocompatibilidad, etc. Todos los polímeros arriba mencionados se definen como "polímeros químicamente diferentes" en el contexto de la presente invención, es decir que normalmente cada uno de estos polímeros no presenta ni una masa molar ni una estructura idénticas a las de ningún otro de los polímeros arriba mencionados. En cambio, "polímeros químicamente idénticos" significa que los polímeros presentan una masa molar y una estructura idénticas. Por último, también se incluyen aquí mezclas de los polímeros arriba mencionados, pudiendo las cantidades de polímeros contenidos en una mezcla tal ser seleccionadas por el técnico en la materia en función de las propiedades deseadas, por ejemplo

como se ha explicado anteriormente. A este respecto, una mezcla de polímeros puede considerarse químicamente idéntica a otra mezcla de polímeros ("polímeros químicamente idénticos") si la masa molar total de la mezcla de polímeros resultantes y el porcentaje molar correspondiente de los polímeros individuales de la mezcla son idénticos a los de la otra mezcla de polímeros.

5 Según la presente invención se utiliza preferentemente alginato como polímero para la formación del núcleo (esférico) y/o del o de los revestimientos superficiales, debido a su biocompatibilidad y sus propiedades de reticulación. Desde un punto de vista químico, los alginatos son polisacáridos aniónicos derivados de grupos homopoliméricos de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, separados por regiones heteropoliméricas de
10 ambos ácidos. Los alginatos son solubles en agua y forman soluciones muy viscosas en presencia de cationes monovalentes, tales como sodio o potasio. En una interacción de cadenas sencillas de alginato con cationes bivalentes, trivalentes o multivalentes (tales como calcio, bario o polilisina) se forma un hidrogel reticulado insoluble en agua. Para el encapsulado se utilizan preferentemente alginatos purificados (por ejemplo según el documento DE 198 36 960, cuya descripción se cita aquí por referencia), preferentemente alginatos de potasio o sodio en solución salina fisiológica. Tales alginatos presentan normalmente una masa molar media de aproximadamente 20 kDa a
15 aproximadamente 10.000 kDa, con mayor preferencia una masa molar media de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1.200 kDa. Los alginatos empleados para la formación del núcleo y/o del o de los revestimientos superficiales de la microcápsula de la invención pueden proporcionarse preferentemente en forma de solución, en especial en forma de solución acuosa. Por ejemplo, la viscosidad de una solución acuosa al 0,1% (p/v) del alginato a utilizar puede estar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 mPa·s, en especial entre aproximadamente
20 10 y aproximadamente 60 mPa·s.

Cuando se emplean los alginatos según la presente invención, son preferentes aquellos ricos en ácido β -D-manurónico (por ejemplo los dados a conocer en Biomaterials, Vol. 8, 1997, páginas 707 a 713). Pueden obtenerse alginatos adecuados para preparar las microcápsulas esféricas de la invención extrayéndolos de ciertas especies de algas, incluyendo, sin limitarse a las mismas, algas pardas, por ejemplo Laminariales, Ectocarpales, Fucales, etc., y
25 otras especies de algas que contienen alginatos. Los alginatos pueden aislarse de material de algas fresco o seco según cualquiera de los métodos de preparación de alginatos conocidos por el técnico en la materia. Con este fin se aplica preferentemente el método según el documento EP 1109837, cuya descripción se incorpora aquí como referencia. En pocas palabras, el método según el documento EP 1109837 comprende los pasos siguientes: primero se extrae el material de algas inicial en presencia de agentes formadores de complejos, si es adecuado en una solución de sosa. A continuación se hace que todos los componentes celulares y partículas presentes en la solución se sedimenten añadiendo un granulado y, si es necesario, añadiendo intercambiadores de iones (por ejemplo Amberlite). Después se filtra la solución. El paso de filtrado puede incluir un filtrado múltiple con un tamaño de poro que disminuya a cada paso, por ejemplo de 20 μ m a 0,2 μ m. El alginato precipita de la solución filtrada mediante un precipitante adecuado. La precipitación se realiza preferentemente con un alcohol (por ejemplo etanol). Como
30 alternativa puede utilizarse para la precipitación un ácido u otro precipitante adecuado. La concentración de alcohol en la solución de precipitación está normalmente entre un 10% (v/v) y un 50% (v/v), preferentemente entre un 30% (v/v) y aproximadamente un 50% (v/v). Dentro de este margen de concentraciones, las impurezas debidas a polisacáridos inmunológicamente activos, por ejemplo fucoidán, permanecen en solución y pueden así separarse del alginato. Durante la precipitación es preferible que un propelente (por ejemplo aire) fluya a través de la solución. El alginato precipitado es impulsado hacia arriba por el aire inyectado y puede separarse fácilmente de la superficie de la solución con un dispositivo adecuado (por ejemplo una red, un colador o similar). A continuación, el alginato recogido puede secarse con un filtro prensa. Los pasos del método arriba mencionados pueden llevarse a cabo según se ha explicado o, adicionalmente, repitiendo uno o más pasos, una vez o más de una, cuando sea apropiado. Además, los pasos del método arriba mencionados pueden repetirse en una forma parcialmente
45 modificada, dependiendo de la aplicación. Después de la pasada final, el alginato altamente purificado se lava en etanol, y adicionalmente en agua si es apropiado, y se seca con aire a temperatura ambiente. Dependiendo del material inicial, el alginato purificado tiene una relación monomérica ácido manurónico:ácido gulurónico de 0,1-9 (que corresponde a un 1% - 90% de ácido manurónico) y un peso molecular medio de entre aproximadamente 10 kD y más de 1.000 kD. Este tipo de alginato purificado implantado en una rata BB/OK diabética autoinmune no provoca ninguna respuesta inmunitaria, o sólo provoca una reacción muy débil 3 semanas después del implante.
50

Los polímeros reticulados arriba definidos empleados para la preparación del núcleo (esférico) y del al menos un revestimiento superficial de la microcápsula esférica de la invención pueden ser idénticos o diferentes. Según una primera realización, los polímeros reticulados utilizados para la preparación del núcleo y el al menos un revestimiento superficial pueden comprender polímeros químicamente idénticos, en concentraciones idénticas o
55 diferentes. Los polímeros presentes en el núcleo y en el al menos un revestimiento superficial se preparan preferentemente empleando una solución de polímeros no reticulados seleccionados entre cualesquiera de los polímeros arriba definidos. En la solución polimérica, en general los polímeros no reticulados están presentes en una concentración de aproximadamente un 0,1% (p/v) a aproximadamente un 8% (p/v) del polímero no reticulado, preferentemente en una concentración de aproximadamente un 0,1% (p/v) a aproximadamente un 4% (p/v), con especial preferencia en una concentración de aproximadamente un 0,5% (p/v) a aproximadamente un 2,5% (p/v) y en particular en una concentración de aproximadamente un 1% (p/v) a aproximadamente un 2% (p/v). Si, como polímeros, se emplean alginatos según se explica más arriba, la concentración elegida para la solución de polímeros destinada a la preparación del núcleo (esférico) y del al menos un revestimiento superficial de la microcápsula de la
60

invención puede estar además entre un 0,1 y un 4% (p/v), preferentemente entre un 0,4 y un 2% (p/v). Para preparar el núcleo (esférico) y el al menos un revestimiento superficial de las microcápsulas de la invención pueden utilizarse concentraciones de alginato diferentes. Los polímeros no reticulados empleados para la preparación del núcleo y/o del al menos un revestimiento superficial comprenden preferentemente polímeros químicamente idénticos, en especial en concentraciones idénticas, por ejemplo en concentraciones como las definidas anteriormente, con polímeros tales como los definidos más arriba. En este contexto, el término “% (p/v)” se refiere a que la concentración de polímeros no reticulados se determina normalmente en base a cierta cantidad de un polímero en su forma seca versus el volumen total de la solución polimérica, por ejemplo después de solubilizar el polímero no reticulado en un disolvente adecuado (antes de la reticulación). Sin embargo, las concentraciones anteriores pueden indicarse también como las concentraciones “% v/v” correspondientes, si es aplicable, por ejemplo cuando se utilizan polímeros que estén presentes en estado agregado líquido en condiciones estándar (temperatura ambiente, presión normal, etc.).

De acuerdo con una segunda realización, los polímeros reticulados empleados para la preparación del núcleo y/o del al menos un revestimiento superficial pueden comprender polímeros químicamente diferentes, en concentraciones idénticas o diferentes. Estas últimas pueden elegirse como se define más arriba. Además, los polímeros pueden seleccionarse entre los polímeros arriba definidos, incluyendo por ejemplo polímeros naturales, polímeros sintéticos y combinaciones de polímeros, es decir polímeros en bloque.

Adicionalmente, los polímeros de cada revestimiento superficial pueden ser idénticos o diferentes, es decir que los polímeros reticulados de cada revestimiento superficial pueden comprender polímeros químicamente idénticos o diferentes, en concentraciones idénticas o diferentes. Por ejemplo, la microcápsula esférica de la invención puede comprender como mínimo un revestimiento superficial según se ha definido, consistente en cualquier polímero según se define más arriba, y un revestimiento superficial externo adicional consistente en policationes, por ejemplo los poliaminoácidos según han definido anteriormente, por ejemplo poli-L-lisina, ácido poli-L-glutámico, etc. La diferencia en la naturaleza de los polímeros empleados puede deberse además a un peso molecular diferente de los polímeros empleados y/o a una reticulación diferente de polímeros idénticos, etc.

Como ya se ha expuesto, el núcleo de la microcápsula esférica de la invención comprende además células que expresan y secretan un péptido de fusión que comprende GLP-1. Estas células que expresan y secretan péptido GLP-1 pueden seleccionarse de cualquier tipo de células capaces de expresar y secretar el péptido de fusión que comprende GLP-1. En general, tales células pueden obtenerse mediante transfección estable de una célula con un ácido nucleico o, en particular, con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica para un péptido de fusión que comprende GLP-1 o un fragmento o una variante del mismo, según se define más abajo. Pueden seleccionarse células adecuadas de entre células madre adultas, tales como células madre mesenquimales (humanas) (MSC, hMSQ) (por ejemplo derivadas de la médula ósea humana o de tejido adiposo), células madre hematopoyéticas, células madre epidérmicas, células madre neurales y fibroblastos inmaduros, incluyendo fibroblastos de la piel (miofibroblastos), etc. Estas células madre (no diferenciadas) son normalmente capaces de una división celular simétrica, es decir aquella división celular que tiene como resultado copias idénticas. Las células madre conservan la capacidad de transformarse en cualquier tipo de célula. Además, las células madre son capaces de dividirse asimétricamente, dando como resultado una copia de la célula madre y otra célula diferente de la copia de la célula madre, por ejemplo una célula diferenciada.

Como alternativa, las microcápsulas esféricas de la invención pueden contener células seleccionadas de entre células (diferenciadas) obtenibles, por ejemplo, a partir de las células madre anteriores, por ejemplo células de la familia conectivas, por ejemplo fibroblastos (maduros), células cartilaginosas (condrocitos), células óseas (osteoblastos/osteocitos, osteoclastos), células grasas (adipocitos) o células musculares lisas, o células sanguíneas, incluyendo células progenitoras linfoides o células derivadas de las mismas, por ejemplo células NK, células T, células B o células dendríticas, o células progenitoras mieloides comunes o células derivadas de las mismas, por ejemplo células dendríticas, monocitos, macrófagos, osteoclastos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, megacariocitos o eritrocitos, o macrófagos, células neuronales, incluyendo astrocitos, oligodendrocitos, etc., o células epiteliales o células epidérmicas. Estas células diferenciadas son normalmente capaces de una división celular simétrica, es decir aquella división celular que tiene como resultado copias idénticas de la célula precursora diferenciada. Además, en algunos casos, estas células diferenciadas pueden ser capaces de dividirse asimétricamente, dando como resultado una copia idéntica de la célula precursora y otra célula diferente de la célula precursora, es decir una célula que está más diferenciada que la célula precursora. Como alternativa, en algunos casos las células diferenciadas arriba definidas pueden ser capaces de diferenciarse aun más sin necesidad de una división celular, por ejemplo añadiendo factores de diferenciación selectivos.

Además, las células incluidas en la microcápsula esférica de la invención pueden ser células obtenidas del propio paciente a tratar (células autólogas) o bien pueden obtenerse de células alogénicas (por ejemplo obtenerse de una línea celular establecida cultivada *in vitro*, por ejemplo células HEK293, células hTERT-MSC, etc.). Gracias al revestimiento superficial que envuelve el núcleo en la microcápsula esférica de la invención, la presente invención permite utilizar células alogénicas sin provocar ninguna respuesta inmunitaria no deseada en el paciente a tratar.

En el núcleo de la microcápsula esférica de la invención puede estar presente una combinación de diversos tipos de células. El núcleo de la microcápsula esférica de la invención, tal y como se define en la presente memoria, puede contener por ejemplo células madre mesenquimales humanas, pudiendo diferenciarse una parte de estas células *in vitro* o *in vivo* en un tipo de célula como los definidos antes, por ejemplo adipocitos (adecuados para el trasplante en tejido adiposo), etc. Por consiguiente es posible repartir en el núcleo diversos tipos de células (derivados por ejemplo de un tipo de célula madre específico), que por ejemplo compartan un linaje común.

En resumen, las células empleadas según la presente invención para preparar el núcleo de la microcápsula esférica de la invención pueden seleccionarse entre células no diferenciadas y células diferenciadas. Según una realización, puede tratarse de células no diferenciadas según se han definido más arriba. Tales células no diferenciadas pueden proporcionar propiedades ventajosas, por ejemplo un efecto prolongado de las microcápsulas esféricas de la invención, por ejemplo una capacidad prolongada para expresar y secretar péptidos GLP-1, por ejemplo gracias a una vida más larga de tales células no diferenciadas. En una realización alternativa pueden preferirse células diferenciadas según se define más arriba para la preparación del núcleo de la microcápsula esférica de la invención, dado que normalmente ya no proliferan y, así, no llevan a una proliferación no deseada de células dentro del núcleo de la microcápsula esférica de la invención. La diferenciación específica de células puede ser llevada a cabo por el técnico en la materia *in vitro* según métodos ya conocidos en la técnica actual, añadiendo factores de diferenciación seleccionados a células precursoras. Las células se diferencian preferentemente de tal modo que una inmensa mayoría de aquellas (o como mínimo un 90%, preferentemente como mínimo un 95% y especialmente como mínimo un 99%) incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención pertenecen al mismo tipo de células. En particular, las células madre mesenquimales arriba definidas pueden diferenciarse *in vitro*, por ejemplo para dar como resultado osteoblastos, condrocitos, adipocitos tales como células grasas, células de tipo neuronal, tales como las células cerebrales, etc., y utilizarse aquí correspondientemente. La opción de utilizar células no diferenciadas o células diferenciadas para preparar el núcleo de la microcápsula esférica de la invención puede depender de los requisitos específicos de la enfermedad a tratar, por ejemplo el sitio de la afección, el modo de administración, el tejido elegido para el implante, etc. El técnico en la materia puede realizar una selección de células apropiadas evaluando estos criterios.

Además, las células empleadas para preparar el núcleo de la microcápsula esférica de la invención pueden ser células inmortalizadas o no inmortalizadas, preferentemente son células inmortalizadas. Si se utilizan células inmortalizadas, éstas conservan preferentemente su capacidad de división celular simétrica y/o asimétrica tal como se ha explicado más arriba. Según la presente invención, las células se definen como inmortales cuando sobrepasan el doble de la vida de las células normales (es decir de células no inmortalizadas). La vida máxima de las células diploides normales *in vitro* varía en función del tipo de célula (por ejemplo células fetales vs. adultas) y las condiciones de cultivo. Así, la vida máxima de las células normales cultivadas *in vitro* es de aproximadamente 60-80 duplicaciones de población. Por ejemplo, los queratinocitos pueden dividirse alrededor de 80 veces, los fibroblastos más de 50 veces y los linfocitos aproximadamente 20 veces. Las células normales del estroma de la médula ósea pueden presentar una vida máxima de 30-40 duplicaciones de población. Preferentemente, una línea celular utilizada para la preparación del núcleo de una microcápsula esférica de la invención puede crecer de forma continua más allá de las 350 duplicaciones de población y mantener aún una tasa de crecimiento normal característica de las células jóvenes.

Los métodos para inmortalizar células son bien conocidos en la técnica actual y pueden aplicarse aquí correspondientemente (véanse por ejemplo los documentos WO 03/010305 ó WO 98/66827, que se citan aquí como referencia). Un ejemplo de método (según el documento WO 031010305) comprende, por ejemplo, los pasos siguientes:

- a) cultivo de células, por ejemplo células madre, en particular células madre derivadas de médula ósea humana (por ejemplo células madre mesenquimales (humanas) (MSC, hMSO)), según métodos de cultivo celular convencionales estándar ya conocidos por el técnico en la materia;
- b) transducción de dichos cultivos celulares con un vector retroviral que comprende como mínimo un fragmento del gen de telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) o una variante del mismo, mediante
 - b1) cultivo de una línea celular empaquetada (por ejemplo células PA317, células PG13, Phenix, etc.), donde la línea celular empaquetada son células en las que se produce el vector retroviral,
 - b2) construcción de un vector retroviral (por ejemplo derivado del virus de la leucemia murina de Moloney, etc.), comprendiendo éste como mínimo un fragmento de la subunidad catalítica del gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) o una variante del mismo, preferentemente un fragmento de ADNc de hTERT, por ejemplo un fragmento EcoRI de 3.452 pares de bases de pGRN145 (Geron Corporation),
 - b3) transfección de dicha línea celular empaquetada con dicho vector retroviral,
 - b4) transducción de dicha línea celular empaquetada con dichas células transfectadas, preferentemente centrifugando las células con el vector retroviral,

b5) transducción de las células cultivadas según el paso a) anterior con las células empaquetadas del paso b4), comprendiendo dichas células dicho vector retroviral;

- c) obtención de una línea celular inmortal, teniendo dicha línea celular inmortalizada características y propiedades sustancialmente idénticas a las de las células del paso a). Como resultado, la secuencia de polinucleótidos insertada derivada del gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (nTRT) puede transcribirse y traducirse para producir una telomerasa funcional. El técnico en la materia reconocerá que, debido a la redundancia del codón, cierto número de secuencias de polinucleótidos codificarán la misma telomerasa. Además se incluyen variantes de la telomerasa que tienen secuencias sustancialmente idénticas a la secuencia de la telomerasa de tipo salvaje y conservan la función del polipéptido de la telomerasa de tipo salvaje (por ejemplo resultante de sustituciones conservativas de aminoácidos en el polipéptido de la telomerasa de tipo salvaje).

Con un "péptido GLP-1 modificado" se entiende cualquier variante del GLP-1 o un fragmento del GLP-1, incluyendo combinaciones, por ejemplo un fragmento de una variante. Las variantes y los fragmentos se clasifican como modificaciones de la secuencia no modificada, por ejemplo GLP-1(7-35, 36 ó 37). En el sentido de la presente invención, toda variante o fragmento debe ser funcional, por ejemplo debe ejercer la misma actividad biológica que el péptido (GLP-1) no modificado, o una actividad biológica similar. El término "actividad" se refiere a la actividad biológica (por ejemplo una o más de las actividades biológicas que comprenden unión al receptor, activación del receptor, manifestación de actividad insulínica, es decir la capacidad de promover la secreción de insulina, capacidad de reducir la secreción de glucagón, capacidad de influir en la pérdida de peso, etc.) comparable en las mismas condiciones para el péptido GLP-1 presente en la naturaleza, tal y como se define en la presente memoria, y cualquier fragmento o variante del mismo. Una variante o un fragmento de un péptido GLP-1, tal y como se define en la presente memoria, preferentemente ejerce como mínimo un 25% de la actividad de un GLP-1 (7-35, 36 ó 37), con mayor preferencia como mínimo un 50% de la actividad (biológica), en especial un 60, 70, 80 ó 90% de la actividad (biológica) y en particular como mínimo un 95 o un 99% de la actividad (biológica) de un GLP 1(7-35, 36 ó 37).

El péptido GLP-1 expresado y secretado por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención puede seleccionarse de entre un péptido de fusión GLP-1 o una variante o fragmento del mismo. Tal y como se definen en la presente memoria, los péptidos de fusión GLP-1 tienen como mínimo dos componentes, por ejemplo los componentes (I) y (II) o componentes (I), (II) y (III), presentan la actividad biológica del GLP-1 y, al mismo tiempo, confieren estabilidad al componente (I) de los péptidos de fusión GLP-1 mediante una elongación C-terminal. El componente (I) de los péptidos de fusión GLP-1, tal y como se define en la presente memoria, contiene una secuencia que presenta como mínimo un 80%, en especial como mínimo un 85% y con mayor preferencia como mínimo un 90%, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos nativa de GLP-1(7-37) (longitud de 31 aminoácidos), que se conserva exclusivamente entre los mamíferos.

El componente (II) del péptido de fusión GLP-1 expresado y secretado por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención (o en general todo péptido GLP-1 que incluya fragmentos o variantes de péptidos de fusión) contiene normalmente una secuencia peptídica que tiene como mínimo nueve aminoácidos. El componente (II) del péptido de fusión GLP-1 puede contener además al menos un residuo prolina en su secuencia. Los residuos prolina son aminoácidos comunes dentro de una secuencia de aminoácidos tetramérica formadora de un giro β . Así, el componente (II) del péptido de fusión GLP-1 puede formar una estructura similar a un giro β . Una estructura de giro β es normalmente un elemento estructural secundario de las proteínas o péptidos. Por regla general está formada por cuatro aminoácidos, que invierten la dirección de la cadena de la estructura principal del péptido o la proteína. Si está presente, el residuo de prolina está situado generalmente en la posición 2 ó 3, preferentemente en la posición 2, de una secuencia de giro β tetramérica existente en el componente (II) del péptido de fusión GLP-1.

En general, las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención se transfectan antes de la preparación del núcleo con secuencias de ácidos nucleicos que codifican un péptido de fusión GLP-1 tal que estas células expresan y secretan el péptido de fusión GLP-1. En este contexto es particularmente preferente un péptido de fusión GLP-1, tal y como se define en la presente memoria, en el que el componente (II) sea una secuencia peptídica que contenga una secuencia según la SEQ ID NO: 22 (RRDFPEEVAI) (todas las secuencias peptídicas indicadas en el código de una letra) o una secuencia que presente como mínimo una identidad de secuencia del 80% con la SEQ ID NO: 22. La SEQ ID NO: 22 es una secuencia parcial de la secuencia completa del IP-2 (péptido interpuesto 2), que contiene los 10 aminoácidos N-terminales de la secuencia completa del IP-2 de 15 aminoácidos de longitud. IP-2 es un ejemplo preferente de componente (II) tal y como se utiliza en la presente memoria. Por consiguiente, otras secuencias también preferentes contenidas en el componente (II) son secuencias parciales de aminoácidos de IP-2 de mayor longitud, tales como la secuencia de 14 aminoácidos N-terminales presente en los humanos (SEQ ID NO: 23 (RRDFPEEVAIVEEL)), o su equivalente murina (SEQ ID NO: 24 (RRDFPEEVAIAEEL)), o una secuencia con como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 23 ó 24. Como elementos contenidos en el componente (II) del péptido de fusión son especialmente preferentes las secuencias completas de IP-2 con todos los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 presentes en la naturaleza (SEQ ID NO: 2 (RRDFPEEVAIVEELG), humana, o SEQ ID NO: 3 (RRDFPEEVAIAEELG), murina) o una secuencia

con como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 2 ó 3. Dentro del alcance de la presente invención se incluyen también todas las isoformas de IP2 de mamíferos (variantes naturales del IP2 entre los mamíferos). Puede preverse más de una copia de una secuencia incluida en el componente (II), por ejemplo 2, 3 o incluso más copias de IP2 o de un fragmento o variante de IP2.

5 Por tanto, un péptido de fusión GLP-1 expresado y secretado por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención contiene preferentemente secuencias según la SEQ ID NO: 8 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGRDRDFPEEVAIAEELG), es decir GLP-1(7-37) ligado, sin ninguna secuencia conectora, a través de su término C a IP2 murino, o según la SEQ ID NO: 12 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGRDRDFPEEVAIVEELG), es decir GLP-1 (7-37) ligado, sin ninguna
10 secuencia conectora, a través de su término C a IP2 humano. Aquí pueden utilizarse también variantes o fragmentos de las mismas que tengan una identidad de secuencia de como mínimo un 80% con las SEQ ID NO 8 y 12 o fragmentos o variantes de las mismas. En este contexto, los péptidos de fusión GLP-1 preferentes pueden comprender además secuencias según las SEQ ID NO 13, 14 19 y 20.

15 Sin vincularse a ninguna teoría, los inventores de la presente invención concluyen que la inestabilidad del GLP-1(7-35, 36 ó 37), cuando es secretado *in vivo* por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica implantada de la invención al tejido circundante del paciente, se debe a su estructura tridimensional no protegida. Las proteasas pueden escindir el péptido GLP-1 (7-35, 36 ó 37) y suprimir rápidamente su actividad fisiológica *in vivo*. Ligando una secuencia peptídica al término C del GLP-1(7-35, 36 ó 37), su estructura gana estabilidad contra
20 la degradación enzimática. Tal ganancia en estabilidad puede mejorarse si la secuencia peptídica C-terminal adicional (contenida en el componente (II) del péptido de fusión según la invención) se pliega, por ejemplo debido a la presencia de un elemento estructural de giro β que esté formado por su estructura primaria y que proporciona rigidez al componente (II). El péptido GLP-1 tal y como se define más arriba, que contiene preferentemente un elemento estructural de giro β en virtud de su extensión peptídica C-terminal, ha resultado tener una resistencia mejorada a la inactivación por DPP-IV. O bien el péptido C-terminal no es escindido de la secuencia del GLP-1(7-35, 36 ó 37) antes de actuar sobre su receptor en las células diana o bien puede ser escindido enzimáticamente para
25 formar GLP-1(7-35, 36 ó 37) *in vivo*. Sin tomar en consideración la forma exacta del péptido GLP-1 ligado en el sitio del receptor GLP-1, un péptido GLP-1 tal y como se define más arriba ejerce su función como compuesto insulínico activo.

30 Las secuencias peptídicas de GLP-1 que se consideran adecuadas para estar contenidas en el componente (II) de un péptido de fusión GLP-1 tal y como se define más arriba, debido a una estructura primaria que forma un elemento de giro β , pueden identificarse fácilmente por métodos adecuados, por ejemplo métodos espectroscópicos tales como dicroísmo circular, u otros métodos ya conocidos por el técnico en la materia.

El componente (II) y el componente (I) de un péptido de fusión GLP-1 expresado y secretado por las células
35 incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención pueden estar ligados directamente o ligados a través de una secuencia conectora. Preferentemente ambos componentes estén ligados directamente entre sí. En caso de que estén ligados a través de un conector (o espaciador), el conector es preferentemente un conector peptídico. Normalmente, un conector peptídico tiene una longitud de 1 a 10 aminoácidos, preferentemente de 1 a 5, en especial de 1 a 3 aminoácidos, y en algunos casos la secuencia conectora puede ser incluso más larga, comprendiendo entre 11 y 50 aminoácidos. Un conector peptídico puede estar compuesto de varias secuencias de
40 aminoácidos (presentes en la naturaleza). Un conector peptídico introducirá preferentemente cierta flexibilidad estructural entre los componentes que se han de ligar. La flexibilidad estructural se logra, por ejemplo, con un conector peptídico que contenga varios residuos de glicina o prolina, preferentemente como mínimo un 30%, en especial como mínimo un 40% y con aun mayor preferencia como mínimo un 60% de residuos de prolina y glicina dentro de la secuencia conectora. Sin tener en cuenta la secuencia específica, preferentemente el conector
45 peptídico puede ser inmunológicamente inactivo.

Las proteínas de fusión GLP-1 expresadas y secretadas por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención pueden contener adicionalmente un componente (III). En general, el componente (III) comprende como mínimo cuatro residuos de aminoácido, preferentemente como mínimo 10
50 residuos de aminoácido adicionales, con mayor preferencia como mínimo 20, o como mínimo 30. En términos funcionales, el componente (III) está destinado a mejorar aun más la estabilidad del péptido GLP-1. No se pretende que el componente (III) interfiera con la función biológica del péptido de fusión GLP-1, que es aproximadamente comparable a la actividad biológica del GLP-1(7-37). En términos generales, toda elongación C-terminal del componente (I) tal y como se define en la presente memoria, ya sea el componente (II), el componente (III) o una combinación de los componentes (II) y (III) tal y como han definido en la presente memoria, mejora la estabilidad del
55 componente (I), es decir un GLP-1 (7-37) o un fragmento suyo o una variante suya tal y como se define en la presente memoria.

Preferentemente el componente (III) del péptido de fusión GLP-1 codificado por ácidos nucleicos transfectados en las células utilizadas según la presente invención para preparar el núcleo de la microcápsula
60 esférica de la invención comprende como mínimo 4, preferentemente como mínimo 10 y con especial preferencia como mínimo 20 residuos de aminoácido adicionales de la secuencia N-terminal de una isoforma de GLP-2 de

cualquier organismo mamífero (otra variante de GLP-2 presente en la naturaleza entre los mamíferos), por ejemplo isoformas murinas o humanas según se muestra en las SEQ ID NO 4 y 5. El GLP-2 se presenta en el proglucagón y está implicado también en el metabolismo de los carbohidratos. En el contexto de la presente invención, el término "péptido GLP-2" significa preferentemente GLP-2 (1-33, 34 ó 35), mientras que "péptido GLP-2 modificado" se refiere a cualquier fragmento o variante de GLP-2, o un fragmento o variante de GLP-2(1-33, 34 ó 35). Las variantes o los fragmentos se clasifican como modificaciones de la secuencia no modificada, por ejemplo GLP-2(1-33, 34 ó 35). Igual que ocurría con la secuencia biológicamente activa incluida en el componente (I) (péptido GLP-1), el componente (III) puede comprender también variantes o fragmentos de formas de GLP-2 presentes en la naturaleza. Como alternativa, el componente (III) puede comprender también como mínimo 4, preferentemente como mínimo 10 y en especial como mínimo 20 residuos de aminoácido adicionales de la secuencia N-terminal de GLP-1(7-37), incluyendo correspondientemente todas las isoformas de mamíferos o - tal y como se revela en la presente memoria - todos los fragmentos o variantes funcionales de las mismas. En términos generales, el componente (III) puede contener cualquier forma de un péptido GLP-1 o un péptido GLP-1 modificado que se revele en la presente memoria como adecuado para el componente (I) del péptido de fusión GLP-1. En otra alternativa, el componente (III) puede contener también formas quiméricas de GLP-1(7-37) y GLP-2. Una forma quimérica puede producirse acoplado GLP-1(7-37) y GLP-2 (o fragmentos o variantes) entre sí e introduciendo posteriormente esta forma quimérica como componente (III) en el péptido de fusión GLP-1. La forma quimérica está compuesta preferentemente de una secuencia parcial de GLP-1(7-37) y una secuencia parcial de GLP-2 ligadas entre sí. La forma quimérica puede incluir por ejemplo los 5 a 30 aminoácidos N-terminales de GLP-1 y los 5 a 30 aminoácidos C-terminales de GLP-2 o viceversa, por ejemplo los aminoácidos 7 u 8 a 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 de GLP-1 (7-37) y la secuencia de aminoácidos que se extiende desde la posición 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 hasta, por ejemplo, el término C de GLP-2.

Si, como componente (III), están contenidas modificaciones de formas presentes en la naturaleza de GLP-2 o GLP-1 (7-37), respectivamente, el componente (III) contiene preferentemente la secuencia de SEQ ID NO 4 ó 5 o de la SEQ ID NO 1, respectivamente, o una secuencia que presenta al menos un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO 4 ó 5 o la SEQ ID NO 1.

En otra realización, el componente (III) del péptido de fusión GLP-1 expresado y secretado por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención puede contener una pluralidad de secuencias tal y como se describe más arriba. El componente (III) puede contener, por ejemplo, como mínimo dos y preferentemente 2, 3 ó 4 copias de GLP-1(7-37) y/o GLP-2 o como mínimo dos copias de secuencias que presenten al menos un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO 1, 4 ó 5. El componente (III) puede contener también más de una copia de una versión quimérica de GLP-1(7-37) o GLP-2 tal y como se ha descrito más arriba, por ejemplo formando eventualmente una combinación de una o más versiones quiméricas con GLP-1(7-37) y/o GLP-2 o sus modificaciones con como mínimo un 80% de identidad de secuencia. El péptido de fusión GLP-1 codificado por ácidos nucleicos transfectedos en las células utilizadas según la presente invención para preparar el núcleo de la microcápsula esférica de la invención puede comprender también dos o más, preferentemente dos, componentes (III), que, por ejemplo, pueden estar (1) ligados por su término N al término C del componente (I) o (II) y (2) ligados por su término C al término N del componente (I), a través de un conector o directamente. Si se prevén dos componentes (III), éstos pueden ser idénticos o diferentes.

Según una realización preferente, son preferentes las células (incluidas en el núcleo de las microcápsulas esféricas de la invención) que están transfectedas con ácidos nucleicos que codifican péptidos de fusión GLP-1 que contienen tres componentes (I), (II) y (III). Cuatro realizaciones específicas que contienen todos estos componentes están seleccionadas de un grupo compuesto por: SEQ ID NO 6 (N-GLP-1(7-37)-IP2(murino)-RR-GLP-1(7-37)-C, también designada CM1 murina en esta memoria), SEQ ID NO 7 (N-GLP-1(7-37)-IP2(murino)-RR-GLP-2-C, también designada CM2 murina en esta memoria), SEQ ID NO 10 (N-GLP-1(7-37)-IP2(humano)-RR-GLP-1(7-37)-C, también designada CM1 humana) y SEQ ID NO 11 (N-GLP-1(7-37)-IP2(humano)-RR-GLP-2-C), también designada CM2 humana en esta memoria) o una secuencia con como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO 6, 7, 10 u 11 o un fragmento o variante de las mismas. Todas las secuencias según las SEQ ID NO 6, 7, 10 y 11 contienen un conector RR (dos residuos de arginina) en el término C de IP2 (componente (II)), que como alternativa también puede descartarse. En cada una de las realizaciones según las SEQ ID NO 6, 7, 10 u 11, el componente (I) es GLP-1(7-37), mientras que el componente (III) (en cada una de estas realizaciones ligado al término C del componente (II)) es GLP-1(7-37) o bien GLP-2. En este contexto, los péptidos de fusión GLP1 preferidos pueden comprender además secuencias según las SEQ ID NO 15, 16, 17, 18 y 26.

En otra realización preferente de la presente invención, el péptido de fusión GLP-1 expresado y secretado por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención contiene, además del componente (I), un componente (III) (sin ningún componente (II) tal y como se define más arriba) que está ligado al término C del componente (I) y/o bien al término N del componente (I). El componente (III) está situado preferentemente en el término C del componente (I). Sin tener en cuenta que el componente (III) esté ligado al término N del componente (I) (por su término C) o al término C del componente (I) (por su término N), el acoplamiento puede ser directo o indirecto a través de una secuencia conectora. Con respecto a la secuencia conectora, nos remitimos a la descripción anterior relativa a un conector que conecta el componente (I) y el componente (II).

En una realización preferente alternativa de la presente invención, el péptido de fusión GLP-1 expresado y secretado por las células incluidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención contiene, además de los componentes (I) y (II), un componente (III) que está ligado al término C del componente (II) y/o bien al término N del componente (I). El componente (III) está situado preferentemente en el término C del componente (II). Sin tener en cuenta que el componente (III) esté ligado al término N del componente (I) (por su término C) o al término C del componente (II) (por su término N), el acoplamiento puede ser directo o indirecto a través de una secuencia conectora. Con respecto a la secuencia conectora, nos remitimos de nuevo a la descripción anterior relativa a un conector que conecta el componente (I) y el componente (II).

Por último, la proteína de fusión GLP-1 embebida en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención puede comprender, además de cualquiera de las combinaciones de componentes de la proteína de fusión arriba mencionadas (es decir los componentes (I) y (II), los componentes (I) y (III) o los componentes (I), (II) y (III)), una proteína portadora, en particular transferrina o albúmina, como componente (IV). Tal componente (IV) puede estar ligado al término N y/o al término C de cualquiera de las combinaciones de componentes de la proteína de fusión arriba mencionadas, es decir los componentes (I) y (II), los componentes (I) y (III) o los componentes (I), (II) y (III), bien directamente o bien utilizando un conector tal y como se define más arriba.

Los péptidos GLP-1, tal y como se definen más arriba, codificados por ácidos nucleicos transfectados en las células utilizadas según la presente invención para preparar el núcleo de la microcápsula esférica de la invención, pueden presentarse en diversas formas modificadas. Estas formas modificadas se describen a continuación y más detalladamente.

Un "fragmento" de un péptido GLP-1 expresado y secretado por una célula tal y como está embebida en la microcápsula esférica de la invención se refiere a cualquier subconjunto de los péptidos GLP-1 arriba descritos, incluyendo los péptidos de fusión GLP-1, es decir un péptido más corto que conserva la actividad biológica deseada. Los fragmentos pueden prepararse fácilmente eliminando aminoácidos de cualquiera de los extremos de la molécula y ensayando el resultado en cuanto a sus propiedades como incretina. Las proteasas para eliminar un solo aminoácido cada vez del extremo N-terminal y/o bien del extremo C-terminal de un polipéptido son bien conocidas, por lo que la determinación de fragmentos que conserven la actividad biológica deseada sólo implica experimentos rutinarios. Para concluir, los fragmentos pueden deberse a deleciones de aminoácidos en los términos del péptido y/o de aminoácidos situados dentro de la secuencia del péptido.

Además, el péptido GLP-1, tal y como se define en la presente memoria, que presenta una actividad antidiabetes tipo 2, ya sea un péptido de fusión en sí, un fragmento y/o una variante funcional del mismo, puede contener también residuos de aminoácido adicionales que flanqueen el péptido GLP-1. Siempre que la molécula resultante conserve su resistencia o estabilidad a las proteasas y su capacidad de actuar como incretina, es posible determinar si cualquiera de tales residuos de flanqueo afectan a las características básicas del péptido central, por ejemplo por sus efectos en células pancreáticas, mediante experimentos de rutina. El término "consistente esencialmente en", cuando se refiere a una secuencia especificada, significa que pueden estar presentes residuos de flanqueo adicionales que no afecten a las características básicas del péptido GLP-1 especificado. Este término no abarca sustituciones, deleciones ni adiciones dentro de la secuencia especificada.

Una "variante" de un péptido GLP-1 expresado y secretado por una célula tal y como está incluida en la microcápsula esférica de la invención se refiere a una molécula que es sustancialmente similar al péptido GLP-1 completo arriba definido o bien a un fragmento del mismo. Pueden prepararse variantes de péptidos convenientemente utilizando métodos bien conocidos en la técnica actual. Por supuesto, tal variante de un péptido GLP-1 tendrá una actividad antidiabética, por ejemplo estimuladora de la insulina, similar a la del correspondiente péptido GLP-1 presente en la naturaleza. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos de los péptidos GLP-1 arriba definidos mediante mutaciones en las secuencias de ADN que codifiquen las variantes sintetizadas. Entre tales variantes se incluyen, por ejemplo, deleciones o inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Los péptidos GLP-1 expresados y secretados por una célula tal y como está incluida en la microcápsula esférica de la invención pueden contener también cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución, a condición de que el constructo final posea la actividad deseada. Obviamente, las mutaciones que se efectúen en el ADN que codifica la variante del péptido no deben alterar el marco de lectura ni, preferentemente, crear regiones complementarias que puedan producir una estructura de ARNm secundaria.

Los tipos de sustituciones que pueden estar contenidos en el péptido GLP-1 expresado y secretado por una célula incluida en la microcápsula esférica de la invención pueden basarse en análisis de las frecuencias de cambio de aminoácidos entre una proteína/un péptido homólogo(a) de diferentes especies. En base a tales análisis, las sustituciones conservativas pueden definirse aquí como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

- I. residuos pequeños, alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
- II. residuos polares, con carga negativa, y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
- III. residuos polares, con carga positiva: His, Arg, Lys;

- IV. residuos grandes, alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys;
- V. residuos grandes aromáticos: Phe, Try, Trp.

Dentro de los grupos anteriores se consideran "altamente conservativas" las sustituciones siguientes: Asp/Glu; His/Arg/Lys; Phe/Tyr/Trp; Met/Leu/Ile/Val. Las sustituciones semiconservativas se definen como intercambios entre dos de los grupos (I) - (IV) anteriores, que están limitados al supergrupo (A), que comprende los anteriores (I), (II) y (III), o al supergrupo (B), que comprende los anteriores (IV) y (V). Las sustituciones no están limitadas a los aminoácidos codificados genéticamente ni tampoco a los presentes en la naturaleza.

En general, las variantes de los péptidos GLP-1 (y péptidos de fusión GLP-1) arriba definidas pueden contener también sustituciones de aminoácidos realizadas, por ejemplo, con la intención de mejorar la solubilidad (sustitución de aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos).

En una realización, el péptido GLP-1 (modificado) expresado y secretado por una célula tal y como está incluida en la microcápsula esférica de la invención, incluyendo un péptido de fusión GLP-1 tal y como se define más arriba (presente en el componente (I) y/o (III) del péptido de fusión GLP-1), está caracterizado por una o más sustituciones en las posiciones 7, 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 33, 34, 35, 36 ó 37 del péptido GLP-1. Como ejemplo de la nomenclatura siguiente, [Arg34-GLP-1 (7-37)] designa un análogo de GLP-1 en el que la lisina presente en la naturaleza en la posición 34 ha sido sustituida por arginina.

En concreto, un péptido GLP-1 o un componente (I) y/o (III) de un péptido de fusión GLP-1, tal y como se define en la presente memoria, puede corresponder a variantes de GLP-1(7-35, 36, 37 ó 38) incluyendo, por ejemplo, Gln9-GLP-1 (7-37), D-Gln9-GLP-1(7-37), acetil-Lys9-GLP-1 (7-37), Thr16-Lys18-GLP-1 (7-37) y Lys18-GLP-1 (7-37), Arg34-GLP-1 (7-37), Lys38-Arg26-GLP-1 (7-38)-OH, Lys36-Arg26-GLP-1 (7-36), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg34-Lys38-GLP-1 (7-38), Ala37-Lys38-GLP-1 (7-38) y Lys37-GLP-1 (7-37).

En una realización preferente concreta de la invención, el péptido GLP-1 expresado y secretado por una célula tal y como está incluida en la microcápsula esférica de la invención, incluyendo un péptido de fusión GLP-1 tal y como se define más arriba (con respecto al componente (I) o (III)), es/contiene un péptido GLP-1 (modificado) seleccionado entre GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), amida de GLP-1 (7-36), GLP-1 (7-37) o un fragmento o variante de los mismos.

La variante del péptido GLP-1 (incluyendo una variante de un péptido de fusión GLP-1 (con respecto al componente (I) o (III))), expresada y secretada por una célula incluida en la microcápsula esférica de la invención, tendrá preferentemente una secuencia central igual a la de la secuencia "nativa", por ejemplo GLP-1 (7-37) o GLP-2, o un fragmento biológicamente activo de los mismos, o cualquier isoforma de IP2 que tenga una secuencia de aminoácidos con como mínimo un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos nativa y conserve la actividad biológica de la misma. Con especial preferencia, tal secuencia presenta como mínimo un 80% de identidad, como mínimo un 90% de identidad o, con particular preferencia, como mínimo un 95% de identidad con la secuencia nativa.

El término "identidad de secuencia" tal y como se define en esta memoria significa que las secuencias se comparan de la siguiente manera. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias pueden alinearse con el fin de optimizar la comparación (por ejemplo pueden introducirse *gaps* (huecos) en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos). A continuación pueden compararse los aminoácidos en las posiciones correspondientes. Si una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo aminoácido que la posición correspondiente de la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. Por ejemplo, cuando se dice que un péptido en particular tiene un porcentaje específico de identidad con respecto a un polipéptido de referencia que presenta una longitud determinada, el porcentaje de identidad es en relación con el péptido de referencia. Así, un péptido que sea idéntico en un 50% a un polipéptido de referencia que tiene 100 aminoácidos de longitud puede ser un polipéptido de 50 aminoácidos de longitud que sea completamente idéntico a una porción de 50 aminoácidos de longitud del polipéptido de referencia. También podría ser un polipéptido de 100 aminoácidos de longitud que fuera idéntico en un 50% al polipéptido de referencia en toda su longitud. Por supuesto, habrá otros polipéptidos que cumplan los mismos criterios. Tal determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias puede efectuarse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, no limitativo, de algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y col. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Tal algoritmo está incorporado en el programa NBLAST, que puede utilizarse para identificar secuencias que tengan la identidad deseada con la secuencia de aminoácidos de la invención. Para obtener alineamientos con *gaps* con fines de comparación puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y col., (1997), Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402. Si se emplean los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo NBLAST). Las secuencias pueden alinearse además utilizando la versión 9 del GAP (Global Alignment Program) del Genetic Computing Group, utilizando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores -4 a +11), con una

penalización para la apertura de *gaps* de -12 (para el primer cero de un *gap*) y una penalización para la extensión de *gaps* de -4 (por cada cero consecutivo adicional en el *gap*). Después del alineamiento, el porcentaje de identidad se calcula expresando el número de *matches* (apareamientos) como un porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia solicitada. Los métodos descritos para la determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos pueden aplicarse correspondientemente a secuencias de ácidos nucleicos.

Los péptidos GLP-1 secretados por las células embebidas en las microcápsulas esféricas de la invención, es decir los péptidos de fusión GLP-1, pueden estar protegidos contra la escisión proteolítica tal y como se explica más arriba. Preferentemente, pueden estar protegidos contra la dipeptidil-aminopeptidasa-IV (DPP-IV). Los péptidos de fusión GLP-1, tal y como se definen en la presente memoria, así como sus fragmentos y variantes, contienen una secuencia de GLP-1(7-35, 36 ó 37) (en el caso de los péptidos de fusión GLP-1 como parte del componente (I) y/o (III)) resistente a la peptidasa plasmática (DPP-IV).

La resistencia de un péptido a la degradación por la dipeptidil-aminopeptidasa IV se determina, por ejemplo, mediante el siguiente ensayo de degradación: se incuban partes alícuotas de los péptidos a 37°C con una parte alícuota de dipeptidil-aminopeptidasa IV purificada, durante 4-22 horas, en un tampón apropiado y a pH 7-8 (no siendo el tampón albúmina). Las reacciones enzimáticas se terminan mediante la adición de ácido trifluoroacético y los productos de degradación del péptido se separan y cuantifican mediante análisis por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) o LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas). Un método para realizar este análisis es: las mezclas se aplican sobre una columna Zorbax300SB-C18 (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) de 150 x 2,1 mm y se eluyen, con un caudal de 0,5 ml/min, con un gradiente lineal de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% (0%-100% de acetonitrilo en un plazo de 30 min). Los péptidos y sus productos de degradación pueden monitorizarse por su absorbancia a 214 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos) y se cuantifican mediante integración de sus áreas de valor máximo. El patrón de degradación puede determinarse por medio de CL-MS, donde pueden determinarse los espectros MS de máximos separados. El porcentaje de compuesto intacto/degradado en un momento determinado se utiliza para estimar la estabilidad de los péptidos a la DPP-IV.

Un péptido (de fusión) GLP-1 tal y como se define en la presente memoria y tal y como es secretado por células embebidas en las microcápsulas esféricas de la invención se define como estabilizado contra DPP-IV cuando es 10 veces más estable que la secuencia peptídica no modificada del GLP-1 (7-37), en base al porcentaje de compuesto intacto en un momento determinado. Así, un péptido GLP-1 estabilizado contra DPP-IV es preferentemente como mínimo 10 y con mayor preferencia como mínimo 20 veces más estable que, por ejemplo, GLP-1 (7-37). La estabilidad puede evaluarse por cualquier método conocido por el técnico en la materia, por ejemplo añadiendo DPP-IV a una solución del péptido que se desea ensayar y determinando la degradación del péptido (véase arriba), por ejemplo durante un espacio de tiempo, mediante, por ejemplo, un método espectroscópico, análisis de transferencia western, cribado de anticuerpos, etc. Paralelamente, un péptido GLP-1 (por ejemplo un fragmento y/o una variante o un péptido de fusión GLP-1) tal y como se define más arriba, se define como un compuesto que ejerce el efecto del GLP-1 (7-37) mediante, por ejemplo, una unión a su receptor nativo (receptor GLP-1). Un péptido (de fusión) GLP-1 tal y como se define más arriba tiene preferentemente una afinidad de unión con respecto al receptor GLP-1 que corresponde a como mínimo un 10%, preferentemente como mínimo un 50%, de la afinidad de unión del péptido GLP-1 presente en la naturaleza. La afinidad de unión puede determinarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo resonancia de plasmones superficiales, etc. Además, preferentemente el péptido (de fusión) GLP-1, tal y como se define en la presente memoria, provoca la formación de AMPc mediante su unión a su receptor extracelular, que transmite la señal a la célula.

Con fines de control *in vitro*, el péptido (de fusión) GLP-1, tal y como se define en la presente memoria, puede aislarse de las células que lo expresan, por ejemplo utilizando técnicas de separación convencionales. Por ejemplo, es posible cultivar células en condiciones apropiadas, por ejemplo incluyendo soporte y nutrientes, *in vitro*, y recuperar la proteína secretada, es decir el péptido GLP-1 tal y como se define más arriba, del medio extracelular. Las secuencias introducidas por ingeniería genética en las células incluyen preferentemente secuencias (peptídicas) señal (véase más abajo) que permitan la secreción del péptido GLP-1 tal y como se define más arriba (véase más abajo). Las células expresan preferentemente una proteasa capaz de escindir las secuencias señal, bien de forma naturalmente endógena o bien después de una transfección o introducción en la célula por métodos de ingeniería genética. En una alternativa, las secuencias génicas sometidas a ingeniería genética que codifican un péptido GLP-1 no incluyen tales secuencias peptídicas señal, con lo cual normalmente el péptido GLP-1 expresado intracelularmente no será secretado y se recupera de las células mediante procesos que implican una lisis celular. En tales métodos, las secuencias codificantes pueden incluir marcadores de purificación que permitan extraer el péptido producto eficazmente del medio; los marcadores pueden eliminarse por escisión para liberar el péptido GLP-1 aislado. Sin embargo, por lo general esta alternativa es intrascendente para las células de una microcápsula de la invención, que se implantan en el paciente y requieren el suministro de un péptido GLP-1 al tejido circundante.

Los péptidos GLP-1 tal y como se definen más arriba se producen en las células tal y como se define más arriba, es decir se expresan y secretan en las células embebidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención. Con este fin, los péptidos GLP-1 tal y como se definen más arriba, o sus fragmentos o variantes, son codificados por secuencias de ácidos nucleicos contenidas en estas células. Estas secuencias de ácidos nucleicos

pueden presentarse en las células de forma natural o pueden introducirse en las células mediante técnicas de transfección celular antes de la preparación de la microcápsula esférica de la invención. Según la presente invención puede utilizarse cualquier secuencia de ácidos nucleicos adecuada que codifique para un péptido GLP-1 tal y como se define más arriba. Debido a la redundancia del código genético, existe una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos que pueden codificar para tal péptido GLP-1. Según una realización preferente de la presente invención, una secuencia de ácidos nucleicos utilizada para la transfección de células tal y como se define en la presente memoria puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifique para el o los péptidos GLP-1 tal y como se define más arriba y secuencias de nucleótidos (funcionales) adicionales. La presente invención prevé preferentemente una secuencia de ácidos nucleicos adecuada para la transfección de una célula tal y como se define en la presente memoria, que pueda codificar (a) para la secuencia de aa completa de GLP-1 (GLP-1(1-37)) o (variantes de) secuencias de GLP-1 funcionales (7-35, 36 ó 37) o cualquier otro péptido GLP-1, incluyendo péptidos de fusión GLP-1 tal y como se define más arriba, (b) opcionalmente para una secuencia de escisión por proteasa en el término N de la secuencia de GLP-1 según (a) y, opcionalmente, para una secuencia peptídica señal aguas arriba de (b). La secuencia (peptídica) señal se selecciona preferentemente de una secuencia tal y como se define más abajo.

La secuencia de ácidos nucleicos tal y como se define más arriba puede estar contenida en un vector. Este vector puede utilizarse para transfectar una célula, tal y como se define en la presente memoria, adecuada para preparar la microcápsula esférica de la invención. En general, tal vector, en particular un vector de expresión, contiene como mínimo una secuencia de ácidos nucleicos tal y como se define más arriba. Un "vector" en el sentido de la presente invención comprende ventajosamente como mínimo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido GLP-1 tal y como se define más arriba y, si es necesario, elementos adicionales adecuados para dirigir la expresión de las secuencias de péptido GLP-1 codificadas. Uno de los tipos de vectores aquí empleados utiliza elementos de ADN que proporcionan plásmidos extracromosómicos de replicación autónoma derivados de virus animales (por ejemplo virus del papiloma bovino, poliomavirus, adenovirus o SV40, etc.). Una segunda clase de vectores de la invención tal y como se utilizan aquí dependen de la integración de las secuencias génicas deseadas en el cromosoma de la célula huésped.

Los vectores, tal y como se definen más arriba, se preparan normalmente insertando en los vectores adecuados como mínimo una secuencia de ácidos nucleicos que codifique el péptido GLP-1. Tales vectores adecuados son conocidos por el técnico en la materia y pueden repasarse, por ejemplo, en "Cloning Vectors" (Eds. Pouwels P.H. y col., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Está previsto también que los vectores adecuados incluyan cualquier vector conocido por el técnico en la materia, tales como plásmidos, fagos, virus como SV40, CMV, baculovirus, adenovirus, virus Sindbis, transposones, elementos IS, fásmidos, fagómidos, cósmidos, ADN lineal o ADN circular. Para la integración en células de mamíferos se utiliza normalmente ADN lineal. El tipo de vector utilizado para la presente invención satisface preferentemente los requisitos específicos de la célula hospedadora. Entre los vectores de expresión adecuados comerciales en los que pueden insertarse los ácidos nucleicos de la invención se incluyen pSPORT, pBluescriptlISK, el vector de expresión de baculovirus pBlueBac y el vector de expresión procariótico pcDNAII, todos pueden adquirirse de Invitrogen Corp., San Diego, CA.

Un vector, tal y como se define en la presente memoria, adecuado para transfectar una célula que pueda utilizarse como constituyente de la microcápsula esférica de la invención combina normalmente las secuencias de ácidos nucleicos que codifican GLP-1 con otros elementos reguladores que, por ejemplo, controlan la expresión de las secuencias de aminoácidos (de la invención) codificadas. Tales elementos reguladores son, por ejemplo, 1) específicos de un tejido o una región del cuerpo; 2) constitutivos; 3) sensibles a la glucosa; y/o 4) inducibles/regulables. Los elementos reguladores se seleccionan aquí preferentemente entre secuencias de regulación y orígenes de replicación (si los vectores se replican de forma autónoma). Las secuencias de regulación dentro del alcance de la presente invención son cualesquiera elementos conocidos por el técnico en la materia que tengan un efecto en la expresión, la transcripción y/o la traducción de secuencias de ácidos nucleicos que codifican GLP-1. Entre las secuencias de regulación se incluyen, además de secuencias promotoras, las llamadas secuencias potenciadoras, que pueden llevar a una mayor expresión debido a la interacción potenciada entre la ARN-polimerasa y el ADN. Otras secuencias de regulación de los vectores de la invención son señales reguladoras de transcripción y señales de inicio de traducción, las llamadas "secuencias terminadoras", etc., o secuencias parciales de las mismas.

Generalmente, un vector de expresión adecuado para transfectar una célula que pueda utilizarse para preparar la microcápsula esférica de la invención puede contener cualquier promotor presente en la naturaleza. Tales promotores pueden seleccionarse de entre cualesquiera promotores eucarióticos, procarióticos, víricos, bacterianos, vegetales, humanos o animales, por ejemplo promotores de mamíferos. Entre los promotores adecuados se incluyen, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus, el promotor lacZ, el promotor gal 10 y el promotor poliédrico AcMNPV, promotores tales como los promotores cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SV40, SP6, I-PR o I-PL, que se encuentran ventajosamente en bacterias gram-negativas. Adicionalmente pueden obtenerse promotores de promotores gram-positivos tales como amy y SP02, promotores de levadura, tales como ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, o promotores de mamíferos tales como el promotor del citomegalovirus (CMV), promotores específicos de los músculos incluyendo el promotor de la creatinincinasa muscular (MCK) de los mamíferos, el promotor de la desmina de los mamíferos, el promotor de la troponina I de los mamíferos (TNNI2) o el promotor de la alfa-actina esquelética de los mamíferos (ASKA), o promotores de la piruvatoquinasa de

tipo hepáticos, en particular los fragmentos que van (de -183 a +12) o (de -96 a +12) (Thompson, y col., J. Biol Chem, (1991). 266:8679-82; Cuif, y col., Mol Cell Biol, (1992). 12:4852-61); el promotor de spot 14 (S14, -290 a +18) (Jump, y col., J. Biol Chem, (1990). 265:3474-8); acetil-CoA carboxilasa (O'Callaghan, y col., J. Biol Chem, (2001). 276:16033-9); ácido graso sintasa (-600 a +65) (Rufo, y col., J. Biol Chem, (2001). 28:28); y glucosa-6-fosfatasa (de rata y humano) (Schmoll, y col., FEBS Left, (1996). 383:63-6; Argaud, y col., Diabetes, (1996). 45:1563-71), o promotores de CaM-quinasa II, nestina, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, beta globina, GFAP, GAP43, tirosina-hidroxilasa, subunidad 1 del receptor cainato, subunidad B del receptor glutamato, o el promotor de la ubicuitina humana B (ubiB, humana), el promotor de la ferritina H humana (FerH), etc. Los promotores particularmente preferentes son de origen humano o mamífero. Por último pueden utilizarse ventajosamente promotores sintéticos. Las secuencias promotoras, tal y como están contenidas en un vector de la invención, pueden ser también inducibles con fines de control *in vitro*, para permitir la modulación de la expresión (por ejemplo mediante la presencia o ausencia de nutrientes u otros inductores en el medio de crecimiento). Un ejemplo es el operón lac obtenido del bacteriófago lambda plac5, que puede inducirse mediante IPTG. Por último, un promotor tal y como se define más arriba puede estar ligado a una secuencia de ácidos nucleicos que codifique GLP-1 de tal modo que el promotor esté situado en 5' "aguas arriba" de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica GLP-1. Preferentemente se utilizan promotores humanos, por ejemplo el promotor de la ubicuitina humana B (ubiB, humana) o el promotor de la ferritina H humana (FerH).

Otros constituyentes de un vector tal y como se define más arriba son preferentemente secuencias potenciadoras para regular al alza la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican GLP-1. Tales secuencias potenciadoras están situadas en general en la región 3' no codificante del vector. Las secuencias potenciadoras empleadas en un vector tal y como se define más arriba pueden obtenerse de cualesquiera hospedadores eucarióticos, procarióticos, víricos, bacterianos, vegetales, humanos o animales, por ejemplo hospedadores de mamíferos, preferentemente en asociación con los promotores correspondientes tal y como se definen más arriba. Los elementos potenciadores que resultarán más útiles en la presente invención son aquellos sensibles a la glucosa, sensibles a la insulina y/o específicos del hígado. Los elementos potenciadores pueden incluir el potenciador de CMV (por ejemplo ligado al promotor de ubicuitina (Cubi)); uno o más elementos sensibles a la glucosa, incluyendo el elemento sensible a la glucosa (G1 RE) del promotor de la piruvato-quinasa del hígado (L-PK) (-172 a -142); y versiones modificadas con sensibilidad potenciada (Cuif y col., supra; Lou, y col., J. Biol Chem, (1999). 274:28385-94); G1RE de L-PK con caja L3 auxiliar (-172 a -126) (Diaz Guerra, y col., Mol Cell Biol, (1993). 13:7725-33); versiones modificadas de G1RE con sensibilidad potenciada con la caja L3 auxiliar; el elemento sensible a los carbohidratos (ChoRE) de S 14 (-1448 a -1422) y modificaciones activadas a bajas concentraciones de glucosa (Shih y Towle, J Biol Chem, (1994). 269:9380-7; Shih, y col., J Biol Chem, (1995). 270:21991-7; y Kaytor, y col., J Biol Chem, (1997). 272:7525-31); ChoRE con el sitio de factor accesorio adyacente de S 14 (-1467 a -1422) [y col., supra]; aldolasa (+1916 a +2329) (Gregori y col., J Biol Chem, (1998). 273:25237-43; Sabourin, y col., J. Biol Chem, (1996). 271:3469-73); y ácido graso sintasa (-7382 a -6970) (Rufo, y col., supra.), con especial preferencia elementos sensibles a la insulina tales como el elemento sensible a la insulina de la glucosa-6-fosfatasa (-780 a -722) [Ayala y col., Diabetes, (1999). 48:1885-9]; y elementos potenciadores específicos del hígado, tales como la protrombina (940 a -860) [Chow y col., J Biol Chem, (1991). 266: 18927-33]; y alfa-1-microglobulina (-2945 a -2539) (Rouet y col., Biochem J, (1998). 334:577-84), potenciadores específicos de los músculos tales como el potenciador de MCK de los mamíferos, el potenciador de DES de los mamíferos y el potenciador de la troponina I IRE (TNI, IRE, denominado aquí en lo sucesivo FIRE) de los vertebrados. Por último, puede incluirse también una secuencia potenciadora de SV40.

Los elementos potenciadores pueden utilizarse además junto con promotores tal y como se definen más arriba. Entre tales combinaciones promotor/potenciador se incluyen, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus (CMV) y el potenciador del CMV, el potenciador del CMV ligado al promotor de la ubicuitina (Cubi), el grupo de elementos potenciadores específicos del hígado que comprende los potenciadores de la seroalbúmina humana [HSA], los potenciadores de la protrombina humana [HPrT], los potenciadores de la alfa-1 microglobulina [A1MB] y los potenciadores intrónicos de la aldolasa utilizados en combinación con sus correspondientes promotores, o potenciadores de la HSA utilizados en combinación con un promotor seleccionado del grupo de un promotor del CMV o un promotor de HSA, elementos potenciadores seleccionados del grupo compuesto por protrombina humana [HPrT] y alfa-1 microglobulina [A1MB] utilizados en combinación con el promotor del CMV, elementos potenciadores seleccionados del grupo compuesto por protrombina humana [HPrT] y alfa-1 microglobulina [A1MB] utilizados en combinación con el promotor de la alfa-1-antitripsina, etc.

Además, un vector, tal y como se define más arriba, adecuado para transfectar una célula que pueda utilizarse como constituyente de la microcápsula esférica de la invención puede contener señales de transcripción y/o traducción, preferentemente señales de transcripción y/o traducción reconocidas por un hospedador apropiado, tales como las señales reguladoras de transcripción y las señales de inicio de traducción. Las señales de transcripción y/o traducción pueden obtenerse de cualesquiera hospedadores eucarióticos, procarióticos, víricos, bacterianos, vegetales, preferentemente humanos o animales, por ejemplo hospedadores de mamíferos, preferentemente en asociación con los promotores correspondientes tal y como se definen más arriba. Por tanto, puede emplearse una amplia variedad de secuencias reguladoras de transcripción y traducción, dependiendo de la naturaleza del hospedador. En la medida en que las células hospedadoras reconozcan las señales reguladoras de transcripción y las señales de inicio de traducción asociadas a una secuencia de ácidos nucleicos que codifique

GLP-1, la región 5' adyacente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica GLP-1 presente en la naturaleza puede conservarse y emplearse para la regulación de la transcripción y la traducción en un vector de la invención. Esta región incluirá habitualmente las secuencias implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, tales como la caja TATA, una secuencia de formación de casquete, una secuencia CAAT y similares. Por regla general, esta región tendrá como mínimo una longitud de aproximadamente 150 pares de bases, con mayor frecuencia de aproximadamente 200 pb y rara vez por encima de aproximadamente 1 a 2 kb.

Pueden seleccionarse señales reguladoras de inicio de transcripción que permitan controlar la represión o activación de tal modo que sea posible modular la expresión génica. Una técnica de modulación controlable de este tipo es la utilización de señales reguladoras que sean sensibles a la temperatura con el fin de reprimir o iniciar la expresión cambiando la temperatura. Otra técnica de modulación controlable es la utilización de señales reguladoras que sean sensibles a ciertas sustancias químicas. Entre las señales de transcripción y/o traducción se incluyen también secuencias reguladoras de terminación de transcripción, tales como una señal de parada y una región poliadenilada. Las secuencias reguladoras de terminación de transcripción están situadas preferentemente en la región 3' no codificante de un vector tal y como se define más arriba que contiene la secuencia de ácidos nucleicos que codifica GLP-1. Entre las secuencias de terminación adecuadas se incluyen, por ejemplo, la hormona de crecimiento bovino, SV40, lacZ, EF1 alfa y señales de poliadenilación poliédrica AcMNPV.

Los vectores de expresión adecuados para transfectar una célula que pueda utilizarse para preparar la microcápsula esférica de la invención pueden incluir también otras secuencias para una expresión óptima de péptidos GLP-1 tal y como se define en la presente memoria. Entre tales secuencias se incluyen secuencias que codifican secuencias (peptídicas) señal, es decir que codifican secuencias peptídicas situadas en el término N que permiten el paso de la proteína secretada a o a través de una membrana; secuencias que proporcionan estabilidad al producto de expresión; y secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, que proporcionan sitios para la escisión por endonucleasas de restricción. Todos estos materiales son ya conocidos en la técnica actual y están comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, Okayama (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3: 280).

Tal y como se define en la presente memoria, "una secuencia señal" es una secuencia (peptídica) señal que en general comprende aproximadamente entre 15 y 30 aminoácidos situados en el término N del péptido (de fusión) GLP-1 expresado y permite la secreción del péptido GLP-1, es decir que éste pase a través de una membrana celular. Tal secuencia señal puede incluir la secuencia señal asociada normalmente a la proteína precursora de GLP-1 de tipo salvaje (es decir la o las secuencias señal de la molécula precursora del proglucagón completa), así como secuencias (peptídicas) señal que no están normalmente asociadas a la misma, es decir heterólogas con respecto a la proteína precursora de GLP-1 de tipo salvaje (es decir la o las secuencias señal de la molécula precursora del proglucagón completa). Una "secuencia señal" tal y como se define en la presente memoria puede ser, por ejemplo, una secuencia peptídica señal o una secuencia líder (por ejemplo una secuencia señal (y líder) secretora). Además, las secuencias (peptídicas) señal tal y como se definen en la presente memoria permiten preferentemente la escisión del péptido precursor (de GLP-1) por una proteasa, por ejemplo una proteasa de secuencia señal. Al escindir la secuencia señal del péptido precursor (de GLP-1) mediante la proteasa, se produce un péptido GLP-1 biológicamente activo tal y como se define más arriba. En general, una secuencia señal de este tipo comprende una región que codifica un sitio de corte reconocido por una proteasa para la escisión. Como alternativa puede introducirse en la secuencia señal una región que codifique un sitio de corte reconocido por una proteasa para la escisión. Además pueden añadirse a la secuencia señal (una o más) secuencias adicionales que codifiquen un sitio de corte reconocido por una proteasa para la escisión.

Entre los ejemplos de secuencias señal que pueden ser codificadas por un vector tal y como se define más arriba se incluye una secuencia señal derivada de una proteína secretada tal como GLP-1 o distinta de GLP-1, tal como una citoquina, un factor de coagulación, una inmunoglobulina, una enzima secretora o una hormona (incluyendo el polipéptido activador de la adenilato-ciclasa de la pituitaria (PACAP)/superfamilia del glucagón) y una proteína sérica. Por ejemplo, una secuencia señal tal y como se define en la presente memoria puede derivarse de metaloproteinasas de matriz (MMP) secretadas, por ejemplo una secuencia líder de estromelina, derivarse de fosfatasa alcalina humana (SEAP) secretada, de proexendina, por ejemplo una secuencia líder de proexendina-4, de proelodermina, del polipéptido insulino-trópico dependiente de la proglucosa (GIP), del factor de crecimiento análogo a la proinsulina (IGF1), del preproglucagón, de la alfa-1 antitripsina, del factor de crecimiento análogo a la insulina 1, del factor IX humano, de la linfotoxina A humana (nº de acceso en Genbank BAA00064) o de la clusterina humana (nº de acceso en Genbank AAP88927). Ejemplos concretos de secuencias señal tal y como se definen en la presente memoria son secuencias que incluyen una región codificante para una señal para la escisión del precursor por peptidasa señal, furina u otras prohormona convertasas (por ejemplo PC3). Por ejemplo puede introducirse en la secuencia señal tal y como se define en la presente memoria una señal escindida por furina (también conocida como PACE, véase el documento US Nº 5.460.950), otras subtilisinas (incluyendo PC2, PC7/PC3, PACE4, PC4, PC5/PC6, LPC/PC71PC8/SPC7 y SKI-1; Nakayama, *Biochem. J.*, 327:625-635 (1997)); enteroquinasa (véase el documento US Nº 5.270.181) o quimotripsina. La descripción de cada uno de los documentos anteriores se incorpora aquí como referencia. La furina es una proteasa expresada de forma ubicua que reside en el trans-golgi y procesa precursores de proteína antes de su secreción. La furina escinde en el término COOH de su secuencia de reconocimiento consensual, Arg-X-Lys-Arg o Arg-X-Arg-Arg, (Lys/Arg)-Arg-X-(Lys/Arg)-Arg y Arg-X-X-Arg, tal como una Arg-Gln-Lys-Arg. Estas secuencias de aminoácidos son una señal para la escisión del precursor por la proteasa furina. Así, una

secuencia señal heteróloga puede derivarse también sintéticamente de una secuencia consenso compilada a partir de secuencias señal (por ejemplo una secuencia consenso compilada a partir de proteínas secretadas escindidas por una peptidasa señal).

5 Adicionalmente a las secuencias de regulación tal y como se definen más arriba, un vector de replicación autónoma tal y como se define más arriba comprende normalmente un origen de replicación. Entre los orígenes de replicación adecuados se incluyen, sin limitarse a éstos, por ejemplo orígenes de replicación ColE1, pSC101, SV40, pMPI (ori pMPI) y M13, etc.

10 Un vector tal y como se define más arriba puede contener preferentemente de forma adicional un gen suicida. En el contexto de la presente invención, "un gen suicida" es preferentemente capaz de detener la terapia con microcápsulas esféricas de la invención matando la célula que aloja el gen suicida contenida en el núcleo de la microcápsula de la invención al administrarse una sustancia específica. Un gen suicida adecuado para la presente invención puede activarse, por ejemplo, administrando un activador exógeno, que normalmente no esté presente en el cuerpo humano o animal. En este caso, en general, el gen suicida inicia una cascada que hace que la célula sufra un evento apoptótico. Como alternativa, un gen suicida adecuado para la presente invención puede metabolizar un profármaco no tóxico exógeno administrado que normalmente no esté presente en el cuerpo humano o animal. La metabolización del profármaco no tóxico exógeno convierte preferentemente el profármaco en una toxina celular. El gen suicida puede estar contenido en el mismo vector que codifica el péptido GLP-1 tal y como se define más arriba o, como alternativa, en un segundo vector. Además, el gen suicida puede regularse mediante elementos de control y reguladores de cualquier tipo, por ejemplo elementos de control y reguladores tales como promotores, potenciadores, etc. tal y como se mencionan en la presente memoria como constituyentes de los vectores de expresión, o mediante sus elementos de control y reguladores presentes de forma natural. Según la presente invención se seleccionan preferentemente genes suicidas que permitan cualquiera de los mecanismos de control arriba mencionados, por ejemplo genes suicidas seleccionados entre citosina-desaminasa (CD), uracilo-fosforribosil-transferasa (UPRTasa), timidin-quinasa de HSV (HSV. Tk), genes suicidas que puedan inducirse mediante la adición de tetraciclina tales como la proteína represora de Tet bacteriana (TetR), etc. Como ejemplo concreto puede utilizarse la citosina-desaminasa (CD). La citosina-desaminasa (CD) se presenta normalmente en diversos organismos y es capaz de transformar la 5-fluorocitosina (5-FC) en 5-fluorouracilo (5-FU), que constituye un agente quimioterapéutico común. El 5-fluorouracilo (5-FU) es altamente tóxico para el organismo, mientras que su profármaco 5-fluorocitosina (5-FC) no es tóxico para las células. El 5-fluorouracilo (5-FU) es fosforilado posteriormente por las quinasas celulares y es capaz de abrogar la síntesis de ARN de las células. Así, el profármaco 5-fluorocitosina (5-FC) constituye una excelente herramienta para inducir el suicidio de una célula específica. Además, el 5-fluoro-dUMP actúa como agente antifolato e inhibe la enzima timidilato-sintasa, que cataliza la metilación de dUMP a dTMP en la vía de síntesis *de novo* de los desoxirribonucleótidos. De este modo es posible inhibir la inhibición de la síntesis de ADN en la célula. También puede utilizarse preferentemente la timidin-quinasa de HSV-1 (ATP:timidin-5-fosfotransferasa) y su profármaco correspondiente ganciclovir (GCV). El GCV análogo a la guanosina se fosforila de forma específica e inhibe la elongación de la síntesis de ADN y lleva así al suicidio de la célula.

40 La transfección de los vectores tal y como se definen más arriba o, como alternativa, de ácidos nucleicos que codifican péptido GLP-1 desnudo en células adecuadas utilizadas para la preparación de microcápsulas de la invención puede realizarse por cualquier método conocido por el técnico en la materia (véase por ejemplo Maniatis y col. (2001), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Si se transfectan vectores en células adecuadas tal y como se define más arriba, el vector está presente preferentemente en forma de un ADN plasmídico que porta un ácido nucleico que codifica el péptido GLP-1. El ADN plasmídico es preferentemente un ADN plasmídico circular. Entre los métodos de transfección adecuados se incluyen, sin limitarse a éstos, por ejemplo técnicas de electroporación, incluyendo técnicas de electroporación modificadas (por ejemplo nucleofección), técnicas de fosfato cálcico, por ejemplo el método de coprecipitación de fosfato cálcico, el método de DEAE dextrano, el método de lipofección, por ejemplo el método de lipofección mediado por transferencia, etc. La transfección se realiza preferentemente con ADN plasmídico que lleve un vector tal y como se define más arriba, utilizando una técnica de electroporación modificada (por ejemplo nucleofección).

50 En una realización alternativa de la invención, el péptido (de fusión) GLP-1 tal y como se define en la presente memoria y tal y como es secretado por las células embebidas en las microcápsulas esféricas de la invención contiene como componente (I) y/o (III) un péptido GLP-1 modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula II siguiente:

55 Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20- Glu- Xaa22- Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

60 donde Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, 3-hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico, siendo particularmente preferente Gly; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Lys o Arg;

Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa27 es Glu o Leu; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa33 es Val o Lys; Xaa34 es Lys, Glu, Asn o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente.

- 5 En aún otra realización de la invención, el componente (I) y/o (III) del péptido (de fusión) GLP-1 tal y como se utiliza para las microcápsulas de la invención contiene un péptido GLP-1 modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula III siguiente:

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

- 10 donde Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, 3-hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa34 es Lys, Glu o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg o Lys, amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente.

- 20 En una realización preferente concreta, la microcápsula esférica de la invención contiene un péptido (de fusión) GLP-1, cuyo componente (I) y/o (III) contiene un péptido GLP-1 (modificado) seleccionado entre GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), GLP-1 (7-36)-amida, GLP-1 (7-37) o una variante, un análogo o un derivado de los mismos. También son preferentes los péptidos (de fusión) GLP-1 que comprenden en sus componentes (I) y/o (III) un péptido GLP-1 modificado que presenta un residuo de Aib en la posición 8 o un residuo de aminoácido en la posición 7 de dicho péptido GLP-1 seleccionado del grupo consistente en D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina y 4-piridilalanina.

- 25 Ambas realizaciones de los componentes (I) y/o (III) del péptido (de fusión) GLP-1 tal y como se definen más arriba mediante las fórmulas II y III y a utilizar para la presente invención pueden combinarse con la descripción hecha anteriormente para el péptido (de fusión) GLP-1. En otras palabras, las fórmulas generales II y III pueden combinarse, por ejemplo, con la descripción anterior para el componente (II), los conectores, el proceso de fabricación, etc.

- 30 Además, el péptido (de fusión) GLP-1 expresado y secretado por las células embebidas en el núcleo de la microcápsula de la invención puede contener preferentemente como mínimo un polímero sintético o un polímero natural, por ejemplo poliaminoácidos. El como mínimo un constituyente polimérico está normalmente acoplado de forma covalente a la subunidad del péptido de fusión. En el sentido de la presente invención, "conjugado" quiere decir "acoplado químicamente". "Acoplado químicamente" quiere decir acoplado mediante enlaces covalentes o no covalentes. Aunque es preferente el enlace covalente, el constituyente polimérico puede estar ligado al péptido de fusión también mediante una complejación sin enlace covalente, por ejemplo por un enlace de hidrógeno o una interacción electrostática, hidrofóbica, etc. El complejo en su totalidad que contiene el péptido de fusión y el polímero se denomina en lo que sigue "complejo conjugado de GLP-1" o "molécula conjugada de GLP-1".

- 40 De este modo, la molécula conjugada de GLP-1 está aun más protegida contra la degradación proteolítica *in vivo*, principalmente debida a la actividad proteolítica de la endopeptidasa IV. El complejo conjugado que tiene o comprende un péptido (de fusión) GLP-1 de como mínimo dos componentes (I) y (II) y el polímero sintético presenta la actividad biológica del GLP-1 y, al mismo tiempo, confiere estabilidad al GLP-1 como su componente (I) mediante una elongación C-terminal. Por consiguiente, conjugando el péptido de fusión con un polímero se aumenta considerablemente su estabilización *in vivo*.

- 45 El polímero aquí utilizado puede ser un polímero fisiológicamente aceptable, lo que incluye polímeros que sean solubles en solución o suspensión acuosa y no tengan efectos negativos, tales como efectos colaterales, en los mamíferos cuando se administra el péptido de fusión en una cantidad farmacéuticamente eficaz. No existen limitaciones especiales en cuanto al polímero fisiológicamente aceptable utilizado según la presente invención. El polímero puede ser sintético o puede presentarse en la naturaleza (polímero natural, por ejemplo una proteína).

- 50 La subunidad del péptido de fusión puede tener enlazados de forma covalente uno, dos o tres constituyentes poliméricos, prefiriéndose un constituyente polimérico, para formar la molécula conjugada de GLP-1. Sin embargo, en realizaciones específicas pueden preverse más de tres constituyentes poliméricos por subunidad de péptido de fusión. Los constituyentes pueden estar acoplados de forma covalente bien al componente (I), bien al componente (II) del péptido de fusión o bien a ambos. Se prefiere acoplar como mínimo uno de los constituyentes poliméricos al componente (II). Si uno o más constituyentes poliméricos están acoplados al componente (I), preferentemente están acoplados al término N o a las cadenas laterales de residuos de serina, treonina, tirosina, aspartato, glutamato, lisina o arginina. Con fines de acoplamiento se utilizan preferentemente las cadenas laterales de uno o más de los residuos Thr 11, Thr 13, Asp15, Ser 17, Ser 18, Tyr 19, Glu 21, Lys 26, Glu 27, Lys 34, Arg 36

del componente (I). Si se utiliza como componente (II) la secuencia de IP2 presente en la naturaleza, uno o más de sus residuos Arg, Glu y Asp estarán modificados en sus cadenas laterales por uno o más constituyentes poliméricos.

El enlace N-terminal de un polímero, en particular PEG, puede ofrecer ventajas en la purificación de la molécula conjugada. También se cree que el enlace N-terminal de un polímero puede preservar mejor la bioactividad que un enlace aleatorio del polímero a cualquier otro residuo, por ejemplo cualquier otro residuo de lisina. Por tanto, en una realización preferente, como mínimo un constituyente polimérico está situado en el término N del péptido de fusión. Si se emplea una PEGilación, la PEGilación de grupos carboxilo terminales o de cadena lateral, o el grupo épsilon-amino de lisina presente en el péptido de la invención, confiere resistencia a la oxidación y se incluye también en el alcance de la presente invención.

Más en general, el polímero sintético de un péptido (de fusión) GLP-1 tal y como se utiliza en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención está seleccionado preferentemente entre alquilenglicoles, tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxiethylado, alcohol poliolefinico, polivinilpirrolidona, metacrilamida de polihidroxiálquilo, metacrilato de polihidroxiálquilo, tal como metacrilato de polihidroxiethyleno, poliácrlato, polisacáridos, poly([alfa]hidroxiácidos), alcohol polivinílico, polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilolmorfolina), polivinil etil éter, acetato de polivinilo, ácido poliláctidoglicólico, ácido poliláctico, polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico, poliuretano, ácido polisialico, triacetato de celulosa, nitrato de celulosa y combinaciones de cualesquiera de los anteriores. Los polímeros naturales son preferentemente péptidos o proteínas ligados por medio de cadenas laterales al péptido (de fusión) GLP-1 o por medio de grupos terminales (amino y/o carboxi), preferentemente albúmina y transferrina.

Las microcápsulas esféricas de la invención tal y como se definen más arriba se preparan preferentemente según dos o más pasos de procedimiento. Según un paso de procedimiento 1) se prepara un núcleo tal y como se describe más arriba. Según un paso de procedimiento 2) el núcleo, tal y como se prepara según el paso de procedimiento 1), se reviste con un revestimiento superficial. Otros pasos opcionales comprenden la preparación de revestimientos superficiales adicionales. Preferentemente se realiza un paso idéntico al paso de procedimiento 2) para cada revestimiento superficial adicional. Entre otros pasos opcionales pueden incluirse pasos de lavado.

En general, un núcleo tal y como se ha descrito anteriormente se prepara según el paso de procedimiento 1) para preparar microcápsulas esféricas de la invención. Tal núcleo está compuesto de un polímero reticulado y células que expresan y secretan GLP-1 y que han sido transfectadas según un método tal y como se ha descrito más arriba. Según el paso de procedimiento 1), normalmente se prepara una mezcla (suspensión) de la forma soluble del polímero, por ejemplo la forma soluble de un alginato (por ejemplo alginato de calcio o de sodio en solución salina fisiológica), y células que expresan y secretan péptido GLP-1, preferentemente en una concentración de hasta $5 \cdot 10^7$ células por ml de solución de polímero.

Típicamente, la suspensión homogénea de células/polímero (por ejemplo suspensión de células/alginato) se somete a presión por medio de una boquilla pulverizadora de inyección de aire, que consta de tres canales que están dispuestos concéntricamente como tres anillos concéntricos alrededor de un centro común: un canal interior, un canal intermedio y un canal exterior (anillo de aire). Preferentemente se utilizan agujas huecas para el canal interior con un diámetro interior de 50 μm a 2.000 μm . El canal intermedio tiene generalmente un diámetro interior de 60 μm a 4.000 μm y el canal exterior (anillo de aire) tiene preferentemente un diámetro interior de 100 μm a 5.000 μm . En el paso de procedimiento 1) para preparar el núcleo de la microcápsula de la invención se utilizan exclusivamente el canal interior y el canal exterior (anillo de aire). Así pues, en el paso de procedimiento 1) puede utilizarse también una boquilla pulverizadora que conste sólo de dos canales (un canal interior y otro exterior). Normalmente no fluye material a través del canal intermedio cuando se utiliza una boquilla pulverizadora de inyección de aire con tres canales. En general, la suspensión de la solución de células/polímero se somete a presión a una velocidad de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 5 ml/min a través del canal interior, lo que hace que se formen gotitas en la salida del canal, que salen disparadas debido al flujo de aire proporcionado por el canal exterior (anillo de aire) con una velocidad de, normalmente, 0,5 l/min a 10 l/min . Las gotitas que contienen células y solución de polímero no reticulado caen en una solución que contiene un reticulante (baño de precipitación) y que generalmente está situada a una distancia de aproximadamente 4 cm a aproximadamente 60 cm bajo la salida de la boquilla pulverizadora de inyección de aire. La gotita se redondea preferentemente durante su caída, adquiriendo así una forma geométrica sustancialmente esférica. El reticulante produce una reticulación iónica de los polímeros y el núcleo de la microcápsula esférica (insoluble en agua) de la invención se forma inicialmente con un diámetro de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 4.000 μm . El diámetro del núcleo de la microcápsula esférica de la invención depende del tamaño y la geometría de los canales utilizados en el paso de procedimiento 1) elegidos. La solución que contiene reticulante (baño de precipitación) se compone preferentemente de cationes bivalentes, por ejemplo iones calcio o bario (5-100 mM) u otros cationes bivalentes o multivalentes cuando se utilizan alginatos como polímeros. Además, el baño de precipitación contiene preferentemente una sustancia tampón (por ejemplo histidina 1 mM - 10 mM) y cloruro sódico (por ejemplo 290 mOsmol \pm 50 mOsmol). Pueden emplearse otros reticulantes y tampones adecuados conocidos en la técnica actual cuando se utilizan polímeros distintos a los alginatos.

El paso de procedimiento 1) proporciona el núcleo de la microcápsula de la invención compuesto de polímeros reticulados y células. Posteriormente al paso de procedimiento 1), el o los pasos de procedimiento opcionales pueden incluir un paso de lavado. El núcleo de la microcápsula esférica de la invención se lava, por ejemplo, con una solución salina fisiológica o con cualquier otra solución de lavado adecuada y, si es aplicable, el núcleo se incuba en una solución de sulfato sódico, preferentemente en una solución de sulfato sódico según el documento US 6.592.886, cuya descripción se incorpora aquí como referencia. Normalmente, los núcleos de las microcápsulas esféricas de la invención se separan del baño de precipitación y/o del baño de lavado utilizando una centrifugadora o cualquier otro método adecuado.

Según el paso de procedimiento 2), el núcleo de la microcápsula esférica de la invención preparado mediante el paso de procedimiento 1) se reviste con un revestimiento superficial compuesto sustancialmente de un polímero reticulado. Por tanto, el núcleo de la microcápsula esférica de la invención preparado mediante el paso 1) se añade a una solución polimérica que contiene polímeros no reticulados, tal y como se ha descrito más arriba, pero no comprende células. Los polímeros están previstos en su forma no reticulada preferentemente en una concentración tal y como se define más arriba. Por regla general, esta mezcla, que contiene la solución de polímeros y el núcleo de la microcápsula esférica de la invención, se somete a presión a través del canal interior de la boquilla pulverizadora de inyección de aire arriba descrita, por ejemplo a una velocidad de 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 2 ml/min , preferentemente de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 5 ml/min . Simultáneamente se somete a presión a través del canal intermedio, a una velocidad de, normalmente, 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 2 ml/min , preferentemente de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 5 ml/min , una solución de polímeros no reticulados pura, sin células, preferentemente una solución que comprende entre aproximadamente un 0,1% y aproximadamente un 4% (p/v) de polímero, por ejemplo una solución de alginato sin ninguna célula. De este modo se forman gotitas en el extremo del canal intermedio, que contienen el núcleo y una superficie de polímero no polimerizado. Estas gotitas salen disparadas debido al flujo de aire proporcionado mediante el canal exterior (anillo de aire) con una velocidad de, normalmente, 0,5 l/min a 10 l/min . La concentración de polímeros del núcleo de la microcápsula esférica de la invención, la solución de polímeros, a la que se añade el núcleo de las microcápsulas de la invención, y la concentración de polímeros del revestimiento superficial pueden diferir (véase más arriba). Las gotitas que contienen el núcleo de las microcápsulas esféricas de la invención (preparadas según el paso de procedimiento 2)) caen en una solución que contiene el reticulante (baño de precipitación) tal y como se define más arriba. Durante su caída, la gotita se redondea preferentemente adquiriendo una forma geométrica aproximadamente esférica. El reticulante produce una reticulación iónica de los polímeros análoga al paso de procedimiento 1). De este modo se forman microcápsulas esféricas insolubles en agua que presentan un diámetro de 60 μm a 4.000 μm . Los diámetros de las microcápsulas esféricas de la invención obtenibles por el paso de procedimiento 2) dependen del tamaño y la geometría de los canales elegidos, tal y como se utilizan aquí. Con el fin de preparar microcápsulas de la invención con más de un revestimiento superficial, es decir microcápsulas esféricas de la invención que contienen el núcleo tal y como se define más arriba y 2, 3, 4, 5, 5-10 o más revestimientos superficiales, puede repetirse el paso de procedimiento 2) tantas veces como sea necesario.

Después del paso de procedimiento 2) pueden seguir uno o más pasos de lavado opcionales tal y como se define más arriba.

Según otro aspecto de la invención se proporciona un método para el tratamiento de un animal, preferentemente un ser humano, mediante la administración de una microcápsula esférica de la invención. La invención abarca el uso de tales microcápsulas esféricas de la invención para la fabricación de un producto, por ejemplo para la preparación de una composición farmacéutica o un kit. Una microcápsula esférica de la invención se utiliza preferentemente (para la preparación de una composición farmacéutica) para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un estado asociado(a) al metabolismo de la glucosa. Como ejemplos no restrictivos de trastornos relacionados con la glucosa pueden mencionarse, por ejemplo: diabetes mellitus tipo I o tipo II (NIDDM), o resistencia a la insulina, trastornos de peso y enfermedades o estados asociados(as) a los mismos, incluyendo tales trastornos de peso o estados asociados la obesidad, estados asociados al sobrepeso, desregulación de la saciedad, niveles reducidos de insulina plasmática, niveles elevados de glucemia o masa de células beta pancreáticas reducida. Preferentemente se describe con la presente memoria el uso de microcápsulas esféricas de la invención (para la preparación de una composición farmacéutica) para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (NIDDM). Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de las microcápsulas esféricas de la invención (para la preparación de una composición farmacéutica) por ejemplo para reducir el peso de un sujeto, para reducir la saciedad de un sujeto, para aumentar de forma posprandial los niveles de insulina plasmática en un sujeto, para reducir el nivel de glucemia en ayunas de un sujeto, para aumentar la masa de células beta pancreáticas en un sujeto o para tratar la diabetes tipo I o II en un sujeto.

Con las microcápsulas esféricas de la invención pueden tratarse también pacientes con otras enfermedades u otros trastornos. Las microcápsulas esféricas de la invención pueden utilizarse (para la preparación de una composición farmacéutica) para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y enfermedades o estados asociados(as) a los mismos y (para la preparación de una composición farmacéutica) para el tratamiento de trastornos y enfermedades o estados asociados(as) a la apoptosis. El uso de las microcápsulas esféricas de la invención que tienen células embebidas en su núcleo, que expresan y secretan GLP-1 (para la preparación de una composición farmacéutica), para tratar estos trastornos resulta de lo siguiente: los receptores GLP-1, que están acoplados a la vía del mensajero secundario de AMP cíclico, se expresan en la totalidad de los cerebros de roedores

y humanos. La quimioarquitectura de la distribución del receptor en el cerebro no sólo tiene correlación con un papel fundamental del GLP-1 en la regulación de la ingesta de comida y la respuesta al estrés aversivo. También se ha demostrado que el enlace del GLP-1 a su receptor GLP-1 ejerce propiedades neurotróficas y ofrece protección contra la apoptosis inducida por glutamato y la lesión oxidativa en células neuronales cultivadas. Además, se ha demostrado que el GLP-1 modifica el procesamiento del precursor de la proteína β amiloide en cultivo celular y reduce, de forma dosis-dependiente, los niveles de péptido β amiloide en el cerebro *in vivo*. Por tanto, el GLP-1 se conoce también como regulador del sistema nervioso central. Los péptidos GLP-1 que imitan la actividad biológica del GLP-1 fisiológicamente activo tienen relevancia terapéutica para el tratamiento de, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA) y otros estados neurodegenerativos centrales y periféricos, por ejemplo esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia, enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Pick, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Schilder y enfermedad de Parkinson, así como apoplejía, hemorragia intracerebral (HIC), hemorragia subaracnoidea, adenoleucodistrofia (x-ALD) u otras leucodistrofias, etc.

Además, se ha demostrado que el GLP-1 fisiológicamente activo ejerce una acción antiapoptótica en diversas células, por ejemplo el GLP-1 es beneficioso para la preservación de la masa y función de islotes humanos recién aislados u otros tipos de células. Así pues, las microcápsulas esféricas de la invención (que expresan y secretan péptido GLP-1 biológicamente activo) pueden utilizarse para tratar trastornos causados por una apoptosis celular o tisular.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene las microcápsulas esféricas de la invención, que puede administrarse de forma exógena. Tal composición farmacéutica puede aplicarse a un paciente que padezca los trastornos arriba mencionados.

En general, la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen microcápsulas esféricas de la invención como "ingrediente activo" es bien conocida en la técnica actual, tal y como ilustran, por ejemplo, las patentes US 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770, todas ellas citadas aquí como referencia.

La composición farmacéutica de la invención (o las microcápsulas esféricas de la invención) puede(n) administrarse de forma exógena a un paciente. Entre las formas de administración típicas se incluyen, sin limitarse a éstas, la administración parenteral, por ejemplo por inyección, por ejemplo de forma subcutánea, intradérmica, subdérmica, intramuscular, o mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea en el sitio de la afección. Entre otros modos de administración que pueden resultar adecuados para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades o de los trastornos arriba mencionados(as) se incluye el trasplante de la composición farmacéutica de la invención o de las microcápsulas esféricas de la invención (formuladas preferentemente en una forma adecuada, por ejemplo mediante la adición de excipientes farmacéuticos adecuados, por ejemplo en forma de geles, cápsulas, tabletas, etc.). Una composición farmacéutica de la invención para la administración parenteral puede prepararse, por ejemplo, como se describe en el documento WO 03/002136, cuya descripción se cita aquí como referencia.

Entre los sitios de administración adecuados para la presente invención se incluyen tejidos del paciente a tratar, por ejemplo tejido adiposo, cerebro, hígado, músculos, etc., así como líquidos corporales, por ejemplo sangre, linfa, líquido cerebral, etc. Entre los dispositivos adecuados para la administración de la composición farmacéutica de la invención se incluyen cualesquiera dispositivos adecuados para el modo de administración elegido, que pueden ser seleccionados por un técnico en la materia. Sin limitarse a estas opciones, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por ejemplo mediante inyección, aplicando una aguja de inyección apropiada, por ejemplo agujas de inyección de un tamaño entre 12 y 26 G, preferentemente entre 18 y 22 G, o por ejemplo trasplantando la composición farmacéutica de la invención, preferentemente formulada en una forma adecuada, por medio de dispositivos quirúrgicos, por ejemplo escalpelos, agujas de inyección tal y como se definen más arriba, etc. Según un ejemplo concreto, que no debe considerarse restrictivo para la presente realización, un paciente que lo necesite, que padezca diabetes tipo 2 o cualquier enfermedad asociada a la misma o descrita en la presente memoria, puede recibir una inyección subcutánea o un implante subcutáneo de la composición farmacéutica de la invención (que contiene microcápsulas esféricas de la invención) en su tejido adiposo, etc. Tal composición farmacéutica de la invención que contiene microcápsulas esféricas de la invención puede contener células tal y como se define más arriba, por ejemplo seleccionadas de células madre mesenquimales humanas que se diferencien *in vivo* o *in vitro* en adipocitos. Además, un paciente que padezca una enfermedad neurodegenerativa tal y como se define en la presente memoria puede recibir un implante de la composición farmacéutica de la invención en su tejido cerebral, por ejemplo en el parénquima cerebral, etc.

Normalmente las composiciones farmacéuticas se preparan como inyectables en forma de soluciones o suspensiones líquidas, que preferentemente contienen agua (formulación acuosa) o pueden emulsionarse. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende como mínimo un 50% p/p de agua. Asimismo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende como mínimo un 50% p/p de agua y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende como mínimo un 50% p/p de agua.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o para la inyección en el sitio de la aflicción, las composiciones farmacéuticas de la invención tendrán forma de solución acuosa aceptable para la administración parenteral, que esté libre de pirógenos y tenga un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen en general un vehículo líquido, por ejemplo agua. El vehículo líquido incluirá preferentemente una solución salina fisiológica, pudiendo incluirse dextrosa, etanol u otra solución de

5

Cuando la composición farmacéutica de la invención comprende una solución acuosa de una microcápsula esférica de la invención y, por ejemplo, un tampón, en general dicha microcápsula esférica de la invención está presente en la composición farmacéutica en una concentración de 0,1 mg/ml o superior y dicha composición farmacéutica tiene normalmente un pH entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 10,0, con preferencia entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,5.

10

Es posible que haya otros ingredientes presentes en la composición farmacéutica de la invención. Entre tales ingredientes adicionales pueden incluirse agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, agentes tampón de pH (por ejemplo tampones fosfato o citrato o maleato), conservantes, agentes tensioactivos, estabilizadores, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo proteínas, gelatina o seroalbúmina humana) y/o zwitteriones (por ejemplo un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes son seleccionados por un técnico en la materia de acuerdo con los requisitos específicos de las células embebidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención, es decir que los ingredientes no son citotóxicos y además aseguran la viabilidad de las células. Además, tales ingredientes pueden estabilizar los péptidos GLP-1 ya expresados y secretados por las células embebidas en el núcleo de la microcápsula esférica de la invención.

15

20

Con respecto a los tampones, éstos se seleccionan preferentemente del grupo consistente en: acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógenofosfato de sodio, hidrógenofosfato disódico, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)aminometano, hepes, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

25

El uso de todos los aditivos arriba mencionados en las composiciones farmacéuticas que contienen la microcápsula esférica de la invención es ya bien conocido por el técnico en la materia, en particular con respecto a los rangos de concentración de los mismos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

30

Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen las microcápsulas esféricas de la invención se administran preferentemente de forma manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. La cantidad de microcápsulas esféricas de la invención que se debe administrar con una composición farmacéutica de la invención (o, si es necesario, solas) depende del sujeto y la enfermedad a tratar, incluyendo, por ejemplo, la gravedad de la enfermedad del paciente. Los rangos de dosificación adecuados dependen de la cantidad de péptido GLP-1 biológicamente activo secretado por las microcápsulas esféricas de la invención (tal y como están contenidas en la composición farmacéutica de la invención) durante un espacio de tiempo predeterminado y normalmente oscilan entre uno y varios cientos de microgramos al día. Normalmente, las microcápsulas esféricas de la invención, tal y como están contenidas en la composición farmacéutica de la invención, secretan aproximadamente 0,5 µg de GLP-1 al día por ml de microcápsulas esféricas de la invención. Así pues, el rango de dosificación puede oscilar, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 µg y 20 mg de péptido GLP-1 biológicamente activo secretado al día (aunque también se contemplan cantidades mayores, del orden de 1-100 mg), por ejemplo estar entre aproximadamente 0,01 µg y 10 mg al día, preferentemente entre 0,01 µg y 5 mg al día, con aun mayor preferencia entre aproximadamente 0,01 µg y 1 mg al día y con la máxima preferencia entre aproximadamente 0,01 µg y 500 µg al día.

35

40

45

Descripción de las figuras:

Figura 1: muestra, a modo de ejemplo, una sinopsis no restrictiva de constructos a - m (véase también el ejemplo 1), que pueden estar contenidos en células utilizadas para la preparación de las microcápsulas esféricas de la invención.

50

Figura 2: representa los resultados de la expresión transitoria de distintos constructos de GLP-1 en células hTERT-MSK y HEK293 y de GLP-1 activo después de una transfección transitoria (véase también el ejemplo 2). Los constructos de GLP-1 monoméricos #103 y #317 (que tienen sólo una copia de GLP-1(7-37)) presentan sólo un nivel mínimo de GLP-1 activo. Se observó una enorme ganancia en expresión en el constructo de GLP-1 dimérico #217 (que tiene GLP-1(7-37) como componente (I) y como componente (III)), tanto en células hTERT-MSK como en células HEK293.

55

- Figura 3: muestra un análisis por Western-Blot del sobrenadante de un cultivo celular de células que secretan GLP-1 (véase también el ejemplo 3). Banda 1: 100 ng de GLP-1(7-37) sintético disueltos en sobrenadante de células hTERT-MSC sometidas a transfección simulada; banda 2: sobrenadante de células hTERT-MSC (clon 79TM217/13) que secretan GLP-1 dimérico del constructo #217; banda 3: sobrenadante de células AtT20 (clon 81-A-217/3) que secretan GLP-1 dimérico del constructo #217; banda M: marcador de proteínas preteñido [kDa]. Los resultados muestran que los péptidos, tal y como se definen en la presente memoria, que contienen GLP-1(7-37) y un apéndice C-terminal (2 y 3 en la figura 3) son secretados por las líneas celulares transfectadas y pueden detectarse utilizando un anticuerpo anti-GLP-1 que se enlaza a los epítomos moleculares centrales de GLP-1 (7-37).
- Figuras 4, 5: describen ensayos de estabilidad en plasma (*in vitro*) realizados con péptidos GLP-1 tal y como se utilizan según la presente invención. Con este fin se transfectaron células HEK293 y hTERT-MSC de forma transitoria con los constructos GLP-1 (7-37) (1), GLP-1(7-37)-IP2 prolongado con 11 AA (2) y GLP-1(7-37)-IP2-GLP1(7-37) (3). Los resultados se muestran en la figura 4 (células HEK293) y la figura 5 (células hTERT-MSC). Las células HEK293 y hTERT-MSC son ambos hospedadores eficaces para el constructo génico (véase también el ejemplo 4).
- Figura 6: muestra un Western-Blot para los péptidos abajo indicados. Se proporcionan los siguientes valores: SEQ ID NO 1 (ID1syn) corresponde a GLP-1(7-37), 31 aa, 3,3 kD; SEQ ID NO 8 (ID8 syn, CM3) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2, 46 aa, 5,1 kD; SEQ ID NO 7 (ID7rec, CM2) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2-RR-GLP2, 83 aa, 9,4 kD; SEQ ID NO 6 (ID6syn, CM1) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2-RR-GLP1(7-37), 79 aa, 8,7 kD (véase también el ejemplo 5).
- Figura 7: ilustra ensayos de estabilidad en plasma de péptidos GLP-1 *in vitro*. A diferencia del GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO 1), los péptidos GLP-1 con una elongación C-terminal SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8 están considerablemente estabilizados en plasma humano *in vitro*. Como control (en la parte derecha) se muestran los resultados obtenidos en experimentos con adición de inhibidor de DPP-IV. En estos experimentos de control se mantiene por completo la actividad de GLP-1 (véase también el ejemplo 6).
- Figura 8: muestra los resultados de un bioensayo *in vitro* con producción de AMP cíclico (AMPc): como puede verse en la figura 8, el 100% de la producción de AMPc corresponde a la producción basal en ausencia de GLP-1. El GLP-1 se enlaza a receptores acoplados a proteína G y estimula la producción de AMPc. Todas las moléculas de GLP-1 ensayadas (ID1syn, ID6syn, ID6rec, ID7rec, ID8syn) aumentan la producción de AMPc celular (véase también el ejemplo 7).
- Figura 9: ilustra los resultados de ensayos de bioactividad *in vivo* con constructos de GLP-1, tal y como se definen en la presente memoria, con ratones de 11 semanas de edad con diabetes tipo II (C57BL/Ks-lepr^{db/db}, Harlan). Todos los péptidos GLP-1 ensayados (SEQ ID NO 6 (sintético o recombinante) y SEQ ID NO 7 (sintético o recombinante)) tienen un efecto antihiper glucémico. Los mejores resultados se obtuvieron con SEQ ID NO 6 (CM1) recombinante y SEQ ID NO 8 (CM3) sintético (véase también el ejemplo 8).
- Figura 10: representa, a modo de ejemplo, un vector utilizado para la expresión génica transitoria y estable. El vector consta de dos unidades de transcripción separadas, una para el gen de interés (GOI) y otra para la fusión del gen suicida timidin-quinasa de HSV y el gen de resistencia blasticidina. Para la primera unidad de transcripción se utilizó el promotor de la ubiquitina humana B y para la segunda unidad de transcripción se utilizó el promotor de la ferritina humana (véase también el ejemplo 9).
- Figuras 11, 12: ilustran la caracterización de células utilizadas para las microcápsulas esféricas de la invención, después de immortalizar previamente las células. Como puede verse en la figura 11, las células immortalizadas son aún capaces de diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos como sus equivalentes no immortalizadas (véase la figura 11). Las células immortalizadas tienen una morfología fibroblástica y son más homogéneas en lo que se refiere al tamaño y la granularidad que las MSC mortales, según se comprobó por citometría de flujo, por ejemplo empleando marcadores de epítipo CD 44 y CD166 que son característicos de las células primarias aquí utilizadas. Las células immortalizadas expresan los mismos marcadores CD que sus equivalentes no immortalizadas (véase la figura 12).
- Figuras 13, 14, 15: muestran un análisis Western-Blot de la secreción de GLP-1 con distintos tipos de células (células hTERT-MSC: figura 13; células AtT20: figura 14; o células HEK293: figura 15) y el número de clon. Los resultados muestran que los constructos de péptido GLP-1/C-terminal son secretados por las líneas celulares transfectadas, es decir que la proteína tiene el peso molecular esperado. Adicionalmente, se enlaza a un anticuerpo anti-GLP-1 que se enlaza al extremo N-terminal de GLP-1 (7-37).

Figura 13A: secreción de GLP-1 de líneas celulares hTERT-MSC (1: 100 ng de GLP-1₇₋₃₇ sintético disuelto en sobrenadante de células hTERT-MSC sometidas a transfección simulada, 2: sobrenadante de células hTERT-MSC que secretan GLP^{CM1} (clon 79TM217/13), M: marcador de proteínas preteñido [kDa])

5 Figura 13B: secreción de GLP-1 de líneas celulares hTERT-MSC (M: marcador de proteínas preteñido [kDa], 1: 100 ng de GLP1₇₋₃₇ sintético disueltos en medio hTERT-MSC, 2: sobrenadante de células hTERT-MSC que secretan GLP^{CM1(C8)} análogo (clon 78TM216/2), 3: sobrenadante de células hTERT-MSC que secretan GLP^{CM1} (clon 79TM217/13))

10 Figura 14: GLP1 secretado de líneas celulares AtT20 (1: sobrenadante de células AtT20 que secretan GLP^{CM1(G8)} análogo (clon 80-A-216/1), 2: sobrenadante de células AtT20 que secretan GLP^{CM1} de tipo salvaje (clon 81-A-217/3))

15 Figura 15: GLP1 secretado de células HEK293 transfectadas de forma transitoria (1: sobrenadante de células HEK293 transfectadas de forma transitoria con un constructo de estromelisin-GLP1₇₋₃₇ (#103), 2: sobrenadante de células HEK293 transfectadas de forma transitoria con un constructo de estromelisin-GLP1₇₋₃₇-IP2 prolongado con 11 AA (#317), 3: sobrenadante de células HEK293 transfectadas de forma transitoria con un constructo de estromelisin-GLP1^{CM1} (#217), 4: sobrenadante de células HEK293 transfectadas de forma transitoria con un constructo de estromelisin-GLP1₇₋₃₇-IP2 (4x) (#159))

20 Figura 16: muestra una inmunoprecipitación de péptidos GLP1^{CM}. La inmunoprecipitación de péptido GLP^{CM1} de sobrenadante de cultivo celular empleando un anticuerpo de captura anti-GLP1 HYB 147-12 ó HYB 147-12 (Antibodyshop) tiene como resultado una acumulación del péptido GLP^{CM1} y una eliminación de proteínas causantes de una contaminación cruzada. 1: sobrenadante de células hTERT-MSC que secretan GLP^{CM1} (clon 79TM217/13), 2: inmunoprecipitación con proteína G pero sin anticuerpo GLP1, 3: inmunoprecipitación con proteína G y anticuerpo GLP1 sc- 7782 (Santa Cruz), 4: inmunoprecipitación con proteína G y anticuerpo GLP1 sc-26637 (Santa Cruz), 5: inmunoprecipitación con proteína G y anticuerpo GLP1 HYB147-12 (Antibodyshop), 6: inmunoprecipitación con proteína G y anticuerpo GLP1 HYB147-08 (Antibodyshop), 7: 10 ng de GLP1₇₋₃₇ sintético, 8: 31 ng de GLP1₇₋₃₇ sintético, 9: 100 ng de GLP1₇₋₃₇ sintético, la inmunoprecipitación con los anticuerpos GLP1 HYB147-08 y HYB147-12 tiene como resultado una acumulación del péptido GLP^{CM1}, eliminando así las proteínas que causan una contaminación cruzada del sobrenadante (véase banda 1 tinción de Coomassie).

25 Figura 17: ilustra una prueba animal con microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) en ratones db/db. El modelo de ratón utilizado fue el ratón con diabetes tipo II C57/Ks-RJ db/db (mutación recesiva en el receptor de leptina) con CellBeads que secretaban GLP/CM1 murino (SEQ ID NO 6) implantadas. La línea celular que secretaba GLP era AtT20. El GLP activo se midió en el suero de los ratones diabéticos el día 2 y el día 22 después del implante de las microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) empleando el ELISA de GLP-1 (activo) (#EGLP-35K, Biotrend): Las columnas representan:

30 animal 7-10: ratones db/db, tratados con implantes de CellBead que secretan GLP1^{CM1},
 40 animal 13, 15: ratones db/db, tratados con un implante de CellBead (sin secreción de GLP1),
 animal db/-: ratones control no diabéticos, sin tratar.

45 Figura 18: muestra niveles de glucemia en ayunas en ratones diabéticos C57/Ks-RJ db/db (db/db n = 3), un compañero de camada heterocigótico no diabético (db/- n = 1) y ratones diabéticos C57/Ks-RJ db/db tratados con microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads de GLP-1) que secretaban GLPCMI(G8) (SEQ ID NO 6 pero sin segundo residuo G) (n = 3) o GLPCMI (SEQ ID NO 6) (n = 3), medidos 2, 9 y 22 días después del implante.

50 Figura 19: representa niveles de glucemia en ayunas en ratones diabéticos C57/Ks-RJ db/db (db/db n = 3), un compañero de camada heterocigótico no diabético (db/- n = 1) y ratones diabéticos C57/Ks-RJ db/db tratados con microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) que secretaban GLP^{CM1(G8)} implantadas en la almohadilla grasa del cuello (n = 2) o en músculo (n = 2), medidos 2, 9 y 22 días después del implante.

55 Figura 20: ilustra PTGIP (pruebas de tolerancia a la glucosa i.p.). Unos ratones que habían ayunado a lo largo de la noche recibieron una inyección i.p. de una solución de glucosa al 20% (1 mg de glucosa por gramo de peso corporal). La medición de la glucemia se realizó antes de la inyección y en las 2 h siguientes. La figura 20 muestra PTGIP para ratones diabéticos C57/Ks-RJ db/db (db/db n = 3) de 14 semanas de edad, un compañero de camada heterocigótico no diabético (db/- n = 1) y ratones

diabéticos C57/Ks-RJ db/db tratados con microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) que secretaban GLP^{CM1(G8)} implantadas en la almohadilla grasa del cuello (n = 2) o músculo (n = 2), 9 días antes del implante.

5 En los ejemplos adjuntos se explica la invención más detalladamente. Sin embargo, no se pretende limitar el alcance de la invención al contenido de los ejemplos mostrados a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Creación de constructos genéticos

10 La secuencia codificante para ADNc de GLP-1(7-37) se sintetizó sintéticamente, en una secuencia que incluía sitios HincII y EcoRI como se indica en la figura 1a. Por separado se sintetizó el ADNc mostrado en la figura 1b, incluyendo las secuencias codificantes para GLP-1(7-37), IP2 y sitios de restricción para SfoI, EcoRI y XbaI como se muestra en la figura 1b. Para dirigir el GLP-1 a la vía secretora se empleó la secuencia señal heteróloga de estromelina 3 (nº de acc. NM_005940). Con este fin, la secuencia líder y señal de la estromelina que codificaba el ADNc se amplificó por PCR de transcriptasa inversa a partir de ARN humano y se utilizó con el constructo de las figuras 1a ó 1b para formar el constructo mostrado en las figuras 1c y 1d respectivamente.

15 El fragmento HincII/EcoRI del constructo de la figura 1a se clona en el sitio SfoI de la secuencia de la figura 1d para formar el constructo de la figura 1e. De forma similar, el fragmento EcoRI de la figura 1d se clona en el sitio EcoRI de un plásmido de expresión eucariótico para producir el constructo mostrado en la figura 1f. Para formar el constructo mostrado en la figura 1g se clona el fragmento HincII/XbaI del constructo mostrado en la figura 1b repetidas veces en el sitio SfoI/XbaI del constructo mostrado en la figura 1d. La figura 1h muestra una secuencia sintetizada de codón optimizado, que codifica las secuencias líder y señal de la estromelina, interrumpida por una secuencia intrónica endógena acortada, fusionada con secuencias que codifican GLP-1(7-37), IP2 y GLP-2(1-35) humano. La secuencia de ADN del constructo de la figura 1h es SEQ ID NO 16, mientras que SEQ ID NO 15 muestra también la secuencia del péptido traducido.

25 Las secuencias de las figuras 1i y 1j también son sintetizadas. Éstas se utilizan a continuación para formar el constructo de la figura 1k, clonando el fragmento NaeI/BssHII de la figura 1j en la secuencia NaeI/BssHII linealizada de la figura 1h. La secuencia de ADN del constructo de la figura 1k es la SEQ ID NO 14, mientras que SEQ ID NO 13 muestra también la secuencia del péptido traducido. El constructo de la figura 1 se forma mediante digestión con BssHII y una religadura de la secuencia de la figura 1h. La secuencia de ADN del constructo de la figura 1l es SEQ ID NO 18, mientras que SEQ ID NO 17 muestra también la secuencia del péptido traducido. El constructo de la figura 1m se forma clonando el fragmento Afel/BssHII de la secuencia de la figura 1i en la secuencia Afel/BssHII linealizada de la figura 1h. La secuencia de ADN del constructo de la figura 1m es SEQ ID NO 20, mientras que SEQ ID NO 19 muestra también la secuencia del péptido traducido.

Los constructos anteriores pueden ser obtenidos por el técnico en la materia empleando técnicas rutinarias.

Ejemplo 2: Transfección, selección clonal y expresión de GLP-1 de células de mamífero

35 Procedencia de las células: HEK293 (línea celular de riñón embrionario humano, #ACC 305, colección de cultivos celulares DSMZ, Alemania), AtT20 (línea celular de tumor hipofisario de ratón LAF1, #87021902, colección europea de cultivos celulares, RU), las células hTERT-MSC han sido generadas por el Prof. Kassem, Hospital Universitario de Odense, Dinamarca.

40 Para la transfección de 10^6 células se utilizaron 0,5-2 µg de ADN plasmídico con distintos constructos de GLP-1. Los constructos se generaron tal y como se describe en el Ejemplo 1. Las células HEK293 se transfectaron por el método de coprecipitación de fosfato cálcico estándar, tal y como se describe en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col. 1994 y sigs., Harvard Medical School Vol. 2, unidad 9.1). Las células AtT20 se transfectaron empleando FuGene (Roche) tal y como se describe en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col. 1994 y sigs., Harvard Medical School Vol. 2, unidad 9.4). La transfección de las células hTERT-MSC se realizó utilizando la tecnología Nucleofector (Amaxa), un método no vírico basado en la combinación de parámetros eléctricos y soluciones específicas del tipo de célula. Utilizando el dispositivo Nucleofector (programa C17) y la solución Nucleofector VPE-1001 se han alcanzado rendimientos de transfección >60%. 48 horas después de la transfección se realizó una selección de clones celulares con una integración estable del ADN en el cromosoma añadiendo el agente selectivo blasticidina (2 µg/ml) al medio de cultivo. 12-15 días después, los clones celulares transfectados estables pudieron aislarse y expandirse para la caracterización.

55 La expresión transitoria de distintos constructos de GLP-1 se midió en células hTERT-MSC y HEK293. Mientras que los constructos de GLP-1 monoméricos #103 y #317 (que tienen sólo una copia de GLP-1(7-37)) presentan sólo un nivel mínimo de GLP-1 activo, en el constructo de GLP-1 dimérico #217 (que tiene GLP-1(7-37) como componente (I) y como componente (III)) se observa una enorme ganancia en expresión, tanto en células hTERT-MSC como en células HEK293. Los resultados están resumidos en la figura 2. Una elongación del constructo para obtener el constructo de GLP-1 #159 (que tiene cuatro copias de IP2 como componente (II)) no

conduce a un aumento adicional significativo (no mostrado). Después de una transfección de células hTERT-MSK con distintos constructos, se seleccionaron clones que expresaban GLP-1 de forma estable. Los niveles de expresión se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

constructo	clon celular	GLP activo por 10 ⁶ células y hora [pmoles]
#103 GLP1 ₍₇₋₃₇₎	49TM113/13	0,4
#317 GLP1 ₍₇₋₃₇₎ -IP2-11aa	71TM169/1	0,6
#217 GLP1 ₍₇₋₃₇₎ -IP2-GLP ₍₇₋₃₇₎	79TM217/13	2,7

5

Ejemplo 3: Análisis Western-Blot de péptidos GLP-1 secretados de células de mamífero

El sobrenadante de un cultivo celular de células que secretaban GLP-1 se separó mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) con un gradiente del 10%-20% (120V, 90 minutos) y se transfirió a una membrana de PVDF (membrana Immobilon-P 0,45 µm Millipore IPVH 00010) mediante una transferencia semiseca (2,0 mA/cm², 60 minutos). Después de fijación con metanol y bloqueo (BSA al 3% (p:v), Tween-20 al 0,1% (v:v) en TBS), la membrana se sometió a inmunotransferencia con 1 µg/ml de anticuerpo anti-GLP-1 (HYB 147-12, Antibodyshop) a 4°C a lo largo de la noche. Después de lavado e incubación con 0,02 µg/ml de anticuerpo de detección (IgG antirratón, conjugada con HRP, Perkin Elmer PC 2855-1197) a TA durante 4 horas, la detección por quimioluminiscencia revela la localización de la proteína.

En la figura 3 se muestra el análisis Western-Blot (1: 100 ng de GLP-1(7-37) sintético disueltos en sobrenadante de células hTERT-MSK sometidas a una transfección simulada, 2: sobrenadante de células hTERT-MSK (clon 79TM217/13) que secretan GLP-1 dimérico del constructo #217, 3: sobrenadante de células AtT20 (clon 81-A-21713) que secretan GLP-1 dimérico del constructo #217; M: marcador de proteínas preteñido [kDa]). Los resultados muestran que los péptidos que contienen GLP-1(7-37) y un apéndice C-terminal (2 y 3 en la figura 3) son secretados por las líneas celulares transfectadas y pueden detectarse utilizando un anticuerpo anti-GLP-1, que se enlaza a los epítomos moleculares centrales de GLP-1 (7-37).

Ejemplo 4: Estabilidad en plasma *in vitro* de péptidos GLP-1 secretados de células humanas.

Se transfectaron células HEK293 y hTERT-MSK de forma transitoria con constructos que codificaban la secuencia señal de estromelina heteróloga, ligada a variantes de GLP-1 que codifican los péptidos siguientes:

- 1: GLP-1(7-37)
- 2: GLP-1 (7-37)-IP2 prolongado con 11 AA
- 3: GLP1(7-37)-IP2-GLP1(7-37)

Se incubó sobrenadante de cultivo celular que contenía péptidos GLP-1 secretados de células o GLP-1(7-37) sintético (Bachem) con plasma humano enriquecido con linfocitos que contenía actividad de dipeptidilpeptidasa, a 37°C y con CO₂ al 5%, durante 3 ó 4 horas. El GLP-1 (7-37) sintético del sobrenadante de células sometidas a una transfección simulada se utilizó como control positivo para la actividad de la DPP-IV, que según se comprobó era inhibida por la adición de un inhibidor de DPP-IV (#DPP4, Biotrend). El GLP activo se midió utilizando ELISA de GLP-1 (activo) (#EGLP-35K, Biotrend), utilizando un anticuerpo que se enlaza al epítomo N-terminal de GLP-1(7-37), discriminando el péptido CLP-1(9-37) inactivo degradado por la DPP-IV.

Los resultados se muestran en las figuras 4 (células HEK293) y 5 (hTERT-MSK). Las células HEK293 y hTERT-MSK son ambos hospedadores eficaces para el constructo génico. La numeración de los resultados para las células transfectadas de los tipos 1 a 3 es como en el Ejemplo 3 (1: 100 ng de GLP-1(7-37) sintético disueltos en sobrenadante de células hTERT-MSK sometidas a una transfección simulada, 2: sobrenadante de células hTERT-MSK (clon 79TM217/13) que secretan GLP-1 dimérico del constructo #217, 3: sobrenadante de células AtT20 (clon 81-A-217/3) que secretan GLP-1 dimérico del constructo #217). Mientras que el constructo 1 produce GLP-1 de tipo salvaje que es inactivado por la DPP-IV de un modo similar al GLP-1 sintético, las formas de GLP-1 con una elongación C-terminal (2 y 3 en la figura 4, 3 en la figura 5) son más resistentes a la degradación y conservan como mínimo un 40% de la actividad. Los péptidos GLP-1 prolongados en el término C están considerablemente estabilizados en plasma humano *in vitro*. El péptido con la secuencia de GLP-1 dimérico (3) está casi completamente estabilizado con respecto a la degradación por DPP-IV *in vitro*.

Ejemplo 5: Análisis Western-Blot de péptidos GLP-1

Se produjeron sintéticamente diversos péptidos GLP-1 mediante fase sólida (*syn*) o de forma recombinante empleando *E. coli* (*rec*). Se separaron los péptidos GLP-1 (31 ng de SEQ ID NO 1 y 10 ng en cada caso de SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8) mediante SDS-PAGE con un gradiente del 10%-20% (120V, 90 minutos) y se transfirieron a una membrana de PVDF (membrana Immobilon-P 0,45 μ m Millipore IPVH 00010) mediante transferencia semiseca (2,0 mA/cm², 60 minutos). Después de fijación con metanol y bloqueo (BSA al 3% (p:v), Tween-20 al 0,1% (v:v) en TBS), la membrana se sometió a inmunotransferencia con 1 μ g/ml de anticuerpo anti-GLP-1 (HYB 147-12, Antibodyshop) a 4°C a lo largo de la noche. Después de lavado e incubación con 0,02 μ g/ml de anticuerpo de detección (IgG antirratón, conjugada con HRP, Perkin Elmer PC 2855-1197) a TA durante 4 horas, la detección por quimioluminiscencia revela la localización de la proteína. La figura 6 muestra el Western-Blot para los péptidos indicados. Pueden proporcionarse los siguientes valores: SEQ ID NO 1 (ID1syn) corresponde a GLP-1(7-37), 31 aa, 3,3 kD; SEQ ID NO 8 (ID8 syn, CM3) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2, 46 aa, 5,1 kD; SEQ ID NO 7 (ID7rec, CM2) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2-RR-GLP2, 83 aa, 9,4 kD; SEQ ID NO 6 (ID6syn, CM1) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2-RR-GLP1(7-37), 79 aa, 8,7 kD.

Ejemplo 6: Estabilidad en plasma humano *in vitro* de péptidos GLP-1^{CM}

Se incubaron péptidos GLP-1 sintéticos (SEQ ID NO 1_{syn}, SEQ ID NO 6_{syn}, SEQ ID NO 7_{rec}, SEQ ID NO 8_{syn}) en concentraciones de 20 ng/ml con plasma humano a 37°C y CO₂ al 5% durante 3 horas. La actividad de dipeptidilpeptidasa del plasma se inhibió mediante un inhibidor de DPP-IV (#DPP4, Biotrend). El GLP activo se midió empleando el ELISA de GLP-1 (activo) (#EGLP-35K, Biotrend).

A diferencia del GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO 1), los péptidos GLP-1 con una elongación C-terminal SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8 están considerablemente estabilizados en plasma humano *in vitro* (figura 7). Como control (en la parte derecha) se muestran los resultados obtenidos en experimentos con adición de inhibidor de DPP-IV. En estos experimentos de control se mantiene por completo la actividad de GLP-1.

Ejemplo 7: Bioensayo *in vitro*

Producción de AMP cíclico

Se cultivaron células RIN-5F (tumor de células de los islotes de rata; n° ECACC 95090402) en placas de 24 pocillos durante 4 días, alcanzando un 70% de confluencia. Las células se lavaron dos veces con DMEM (E15-009, PAA) antes de añadir 0,5 ml de DMEM (E15-009, PAA) complementado con HSA al 1% (Aventis), IBMX 0,2 mM (858455, Sigma) y los péptidos del ensayo. Después de 20 minutos de incubación a 25°C, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Se extrajo el AMPc celular mediante la adición de HCl 0,1N que contenía Triton X-100 al 0,5%. Se cuantificó el AMP cíclico mediante el EIA (cat. DE0355, R&D) de AMPc (bajo pH). Para la estimulación se utilizaron las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 6_{syn}, SEQ ID NO 6_{rec}, SEQ ID NO 7_{rec} y SEQ ID NO 8_{syn} a 3·10⁻⁸ M.

Los resultados se muestran en la figura 8. El 100% de la producción de AMPc corresponde a la producción basal en ausencia de GLP-1. El GLP-1 se enlaza a los receptores acoplados a la proteína G y estimula la producción de AMPc. Todas las moléculas ensayadas aumentan la producción de AMPc celular.

Ejemplo 8: Bioactividad *in vivo*

Se trataron ratones de 11 semanas de edad con diabetes tipo II (C57BL/Ks-Lepr^{db/db}, Harlan) con 5 μ g de péptido mediante inyección subcutánea dos veces al día a las 9 a.m. y las 5 p.m. (n = 5 por grupo). La glucemia se midió antes (día 0) y después del tratamiento con péptidos GLP^{CM} (día 2, 4, 7, 10) a las 10 a.m. después de un período de ayuno durante la noche. Los datos se presentaron en relación con los niveles de glucemia medidos el día 0.

Todos los péptidos GLP-1 ensayados (SEQ ID NO 6 (sintético o recombinante) y SEQ ID NO 7 (sintético o recombinante)) tienen un efecto antihiper glucémico. Los mejores resultados se obtuvieron con la SEQ ID NO 6 (CM1) recombinante y la SEQ ID NO 8 (CM3) sintético. En la figura 9 (eje Y) se muestra el efecto relativo del tratamiento. La glucemia del día = 0 se estableció como 1. Los animales no tratados experimentan un aumento continuo del nivel de glucemia con el paso del tiempo, mientras que los animales tratados con los péptidos GLP-1 tal y como se definen en la presente memoria muestran, *grosso modo*, una disminución continua del nivel de glucemia con el paso del tiempo.

Ejemplo 9: Creación de un plásmido

El vector para la expresión génica transitoria y estable consta de dos unidades de transcripción separadas, una para el gen de interés (GOI) y otra para la fusión del gen suicida timidinaquinasa de HSV y el gen de resistencia blasticidina. Para la primera unidad de transcripción se utilizó el promotor de la ubicuitina humana B y para la segunda unidad de transcripción se utilizó el promotor de la ferritina humana. El plásmido está basado en pCM4 plasmídico, con 7.919 pares de bases, mostrado esquemáticamente en la figura 10.

Como se muestra en la figura 10, la unidad de transcripción 1 comprende los siguientes componentes:

- CMVenh: potenciador precoz inmediato citomegalovirus humano.
- ubiB human: promotor de la ubiquitina B.
- Stro-GLP: gen de fusión, que codifica para la secuencia peptídica señal y la secuencia líder de estromelina y constructos de GLPI.
- 5 ori pMB1: origen mínimo de replicación de *E.coli*.
- Hygro: gen de resistencia a la higromicina B.
- Unidad de transcripción 2:
- SV 40 enh: potenciador de SV40.
- FerH: promotor de la ferritina humana H combinado con 5'UTR del gen EFI murino.
- 10 Tk-bla: gen de fusión que codifica para el gen de resistencia a la la blasticidina y la timidinaquinasa del virus de herpes simple tipo 1.

Para la expresión transitoria se empleó el plásmido circular. Para la selección de clones celulares de expresión estable se linealizó el plásmido y se eliminaron las secuencias bacterianas (origen pMB1 y gen de higromicina).

15 **Ejemplo 10: Producción de línea de células madre mesenquimales**

La *línea de células madre mesenquimales* fue generada por el Prof. Kassem, Hospital Universitario de Odense, Dinamarca (publicado en Simonsen y col., 2002, Nature Biotechnology 20m, 592-596) de acuerdo con los criterios siguientes:

- 20 Origen: La línea celular de producción consiste en células madre mesenquimales (MSC) aisladas de aspirados de médula ósea de un donante varón sano (33 años de edad).

- 25 Inmortalización: Las células se inmortalizaron mediante una introducción de la secuencia codificante de la telomerasa transcriptasa inversa. Se realizó una transducción retroviral mediante encapsidación del vector retroviral GCsam en el que la expresión del transgen está conducida por la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney en PG13. La transducción se realizó el día 9 (PDL 12) de cultivo. La línea celular se cultivó hasta el nivel de duplicación de población (PDL) de 260.

- 30 El locus de inserción se ensayó mediante hibridación *in situ* con fluorescencia y Southern-Blot. Sólo hay un locus de inserción de hTERT ecotópica en el cromosoma 5 (5q23-31). Los análisis se realizaron en PDL 186. Un bandeo de Giemsa y una hibridación genómica comparativa revelaron que hMSC-TERT no había desarrollado ninguna anomalía cromosómica numérica o estructural en PDL 96 y conservaba un cariotipo masculino diploide normal. La tumorigenicidad se ensayó en ratones inmunodeficientes después de un implante subcutáneo durante seis meses y se halló negativa para PDL 80.

- 35 Análisis por citometría de flujo (FACS): Se cultivaron células en un medio de crecimiento estándar hasta el 80% de confluencia. Las células se tripsinizaron y se ensayaron en cuanto a tamaño y granularidad mediante un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson). Para los estudios de marcador de superficie se tiñeron células con anticuerpos directamente conjugados en un tinte fluorescente (anticuerpo monoclonal de ratón anti CD44 humano conjugado con FITC, #CBL154F, Cymbus Biotechnology; anticuerpo monoclonal de ratón anti CD166 humano conjugado con ficoeritrina, #559263, BD Pharmingen) durante 30 minutos en hielo. Las muestras se lavaron y se fijaron con un 1% de paraformaldehído bajo análisis con FACScan (Becton-Dickinson).

- 40 Caracterización: Las células inmortalizadas son aún capaces de diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos como sus equivalentes no inmortalizadas (véase la figura 11). Las células inmortalizadas tienen una morfología fibroblástica y son más homogéneas en lo que se refiere al tamaño y la granularidad que las MSC mortales según se comprobó por citometría de flujo, por ejemplo empleando marcadores de epítipo CD 44 y CD166 que son característicos de las células primarias aquí utilizadas. Las células inmortalizadas expresan los mismos marcadores CD que sus equivalentes no inmortalizadas (véase la figura 12).

- 45 Cultivo: Medio que contiene suero:

MEM Earle al 7%

FCS al 10%

L-glutamina 2 mM

piruvato de sodio 1 mM

100 U/ml penicilina

0,1 mg/ml estreptomicina

La duplicación de población se produce entre 26 y 30 horas.

- 5 Transfección y selección de clones: Para la transfección de 10^6 células se utilizaron 0,5-2 μ g de ADN plasmídico con distintos constructos de GLP-1. Las células HEK293 se transfectaron por el método de coprecipitación de fosfato cálcico estándar. Las células AtT20 se transfectaron empleando FuGene (Roche).

- 10 La transfección de las células hTERT-MSK se realizó utilizando la tecnología Nucleofector (amaxa), un método no vírico basado en la combinación de parámetros eléctricos y soluciones específicas del tipo de célula. Utilizando el dispositivo Nucleofector (programa C17) y la solución Nucleofector VPE-1001 se alcanzaron rendimientos de transfección >60%.

48 horas después de la transfección se realizó una selección de clones celulares con una integración estable del ADN en el cromosoma añadiendo el agente selectivo blasticidina (2 μ g/ml) al medio de cultivo. 12-15 días después, los clones celulares transfectados estables pudieron aislarse y expandirse para la caracterización.

- 15 Expresión: La expresión transitoria de distintos constructos de GLP se midió en células hTERT-MSK y HEK293. En los constructos de GLP1 monoméricos #103 (Stro-GLP1₍₇₋₃₇₎) y #317 (Stro-GLP1₍₇₋₃₇₎-IP2-prolongado con 11 aa) se observa un nivel de GLP-1 activo y en el constructo de GLP1 dimérico #217 (Stro-GLP1₍₇₋₃₇₎-IP2-GLP1₍₇₋₃₇₎) se observa una enorme ganancia en expresión, tanto en células hTERT-MSK como en células HEK293. Una elongación del constructo #317 para obtener el constructo de GLP1 tetramérico #159 (Stro-GLP1₍₇₋₃₇₎IP2(4x)-11 aa) tiene como resultado una actividad similar (véase también más arriba la figura 2). Después de transfección de células hTERT-MSK con distintos constructos, se seleccionaron los clones que expresaban GLP1 de forma estable (véanse más arriba las figuras 4 y 5, ejemplo 4).
- 20

Ejemplo 11: Encapsulación

- 25 Las células cultivadas a encapsular se lavaron con PBS (PAA, Austria) y se separaron utilizando tripsina/EDTA (PAA, Austria). Se detuvo la reacción rápidamente empleando medio (en función del tipo de célula, por ejemplo RPMI, PAA, Austria) y se centrifugó la suspensión celular (8 minutos a 1.200 rpm). Se resuspendió la pella en PBS y se determinó el recuento celular. Se centrifugó de nuevo (8 minutos a 1.200 rpm) la cantidad deseada de $1,4 \cdot 10^7$ células. A continuación se eliminó completamente el PBS mediante aspiración y se resuspendieron 60 μ l de pella sin burbujas de aire en 80 μ l de PBS. Esta suspensión celular se absorbió en 560 μ l de una solución de alginato de potasio al 0,8% (p/v) (se utilizó un alginato con una viscosidad de aproximadamente 40 mPa·s de una solución acuosa al 0,1% (p/v) a temperatura ambiente).
- 30

- Para mezclar con la solución de alginato las células resuspendidas, la solución se aspiró en una jeringa de 1 ml con cánulas y se mezcló homogéneamente con las células bombeando con la jeringa lentamente repetidas veces. Resultó una concentración celular de $2 \cdot 10^7$ células/ml. Correspondientemente, puede obtenerse una cantidad de $2 \cdot 10^7$ células/ml.
- 35

- Para producir las microcápsulas con un diámetro de aproximadamente 400 μ m, se utilizó una cánula con un diámetro interior de 400 μ m para el canal interior de una boquilla pulverizadora de tres canales cargada con aire. La cánula se fijó en una boquilla exterior con un diámetro interior de 700 μ m. Sobre las dos cánulas interiores se enroscó un anillo de aire con una abertura de 1,5 mm. El dispositivo es una versión adaptada del dispositivo descrito en el documento WO 00/09566. Se hizo pasar la mezcla homogénea de células/solución de alginato a través de la boquilla pulverizadora descrita. Con este fin, la jeringa de 1 ml que contenía la mezcla se colocó en el canal interior por medio de un conector luer. Se presionó la mezcla de células/solución de alginato a través del canal interior a una velocidad de 300 μ l/min. El flujo de aire se condujo a través del anillo de aire exterior a una velocidad de 2,5 l/min. Las microcápsulas resultantes precipitaron en un baño de precipitación que contenía bario (BaCl 20 mM, L-histidina 5 mM, NaCl 124 mM, pH 7,0 \pm 0,1, 290 mOsmol \pm 3), que estaba dispuesto a una distancia de aproximadamente 10 cm bajo la boquilla pulverizadora. Después de un tiempo de permanencia de 5 minutos en el baño de precipitación con contenido en bario, las microcápsulas se lavaron cinco veces con 20 ml de PBS en cada caso.
- 40
- 45

- 500 μ l de las microcápsulas monocapa se absorbieron en 500 μ l de una solución de alginato al 0,8% (p/v) igual que la arriba empleada para el núcleo y se mezclaron homogéneamente. Esta suspensión se aspiró en una jeringa de 1 ml, se conectó por medio de un conector luer al canal interior (diámetro interior: 400 μ m) de la boquilla pulverizadora y se presionó a través del mismo a una velocidad de 50 μ l/min. Al segundo canal interior (diámetro interior: 700 μ m) se le conectó, mediante un conector luer, una jeringa de 5 ml con una solución de alginato al 0,8%, que se presionó a través de este canal a una velocidad de 250 μ l/min. El flujo de aire se condujo a través del anillo de aire exterior a una velocidad de 2,9 l/min. Las microcápsulas resultantes se precipitaron en un baño de precipitación que contenía bario (BaCl 20 mM, L-histidina 5 mM, NaCl 124 mM, pH 7,0 \pm 0,1, 290 mOsmol \pm 3), que
- 55

estaba dispuesto a una distancia de aproximadamente 10 cm bajo la boquilla pulverizadora. Después de un tiempo de permanencia de 5 minutos en el baño de precipitación con contenido en bario, las microcápsulas se lavaron cuatro veces con 20 ml de PBS en cada caso y una vez con medio. Mediante este proceso se produjeron microcápsulas de dos capas con un diámetro total de aproximadamente $600 \mu\text{m} \pm 100 \mu\text{m}$ (incluyendo la capa de alginato), siendo el diámetro del núcleo interior, que contiene células, de $380 \mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$. La concentración de células en el núcleo es de aproximadamente $2\text{-}3 \cdot 10^7$ células/ml de alginato. El resultado son microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) que presentan un volumen de perla de 0,065 - 0,180 μl y un contenido de aproximadamente 1.000 células por perla. Una CellBead con células que secretan GLP-1 produce una media de 5 fmoles de GLP activo por hora.

Después del encapsulado, las microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) pueden cultivarse en un medio de cultivo (LP02 con Lipumin al 10%) libre de suero de ternera fetal (FCS), producido según las directrices GMP durante como mínimo seis días sin ninguna disminución de viabilidad.

Para el implante en tejido adiposo, las células hTERT-MSC encapsuladas se diferenciaron en adipocitos (véase el ejemplo 12).

15 **Ejemplo 12: Diferenciación en adipocitos (perla)**

La diferenciación de células madre mesenquimales en adipocitos mediante medios basados en MEM que incluyen insulina, dexametasona e isobutilxantina ha sido descrita por Gimble y col. (1995, J.Cell Biochem. 58, 393-402) y Simonsen y col. (*ob.cit.*). En estos experimentos, el proceso de diferenciación en adipocitos se realiza en medios de cultivo libres de componentes animales. El proceso de diferenciación tarda dos semanas y produce > 90% de adipocitos. Los componentes empleados normalmente para medios de cultivo libres de componentes animales son los siguientes: DMEM/HAM's F12, HEPES, hidrocortisona, insulina, triyodotironina biotina, ácido DL-pantoténico hemicálcico, troglitazona, ácido octanoico (AO), dexametasona, una mezcla de lípidos libre de componentes animales, isobutilmetilxantina.

La acumulación de triglicéridos intracelulares, que es un marcador de la diferenciación en adipocitos (Greenberger JS., Corticosteroid-dependent differentiation of human marrow preadipocytes *in vitro*, In vitro. 1979 Oct, 15(10):823-8), puede monitorizarse mediante el tinte AdipoRed, que es una solución del tinte hidrófilo Nile Red (Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, J Cell Biol. 1985 Mar, 100(3):965-73). La monitorización se llevó a cabo según el manual de instrucciones AdipoRed Assay Reagent (#PT-7009, Cambrex).

La glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPDH) se expresa altamente en adipocitos maduros (Sottile V, Seuwen K. A high-capacity screen for adipogenic differentiation, Anal. Biochem. 2001 Jun 1; 293(1):124-8). Se midió la actividad de esta enzima para evaluar la diferenciación adipogénica de las células según el manual de instrucciones del kit de ensayo de actividad de la glicerol-3-fosfato- deshidrogenasa (GPDH) (#MK426, Takara).

La FABP4 / aP2 es una proteína de enlace lipídico intracelular que se expresa específicamente en adipocitos maduros (Graves RA, Tontonoz P, Platt KA, Ross SR, Spiegelman BM, Identification of a fat cell enhancer analysis of requirements for adipose tissue-specific gene expression. J Cell Biochem. 1992 Jul, 49(3):219-24). Por tanto, las células positivas para FABP4 pueden clasificarse como adipocitos maduros. Después de fijación con metanol y bloqueo, se realizó una inmunotinción con anticuerpo policlonal anti-FABP4 de conejo (#10004944, IBL Hamburg) e IgG anticonejo conjugada con Cy-3 (#111-166-066 Dianova). La viabilidad de los adipocitos diferenciados es similar a la de las células no diferenciadas. Sin embargo, la proliferación que se observa en cultivos de las microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) no diferenciados no tiene lugar en cultivos de las microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) diferenciados.

Ejemplo 13: Análisis Western-Blot de GLP-1

Se cultivan en un medio (véase más arriba) los adipocitos transfectados diferenciados encapsulados u otros tipos de células. El sobrenadante del cultivo celular se separó mediante SDS-PAGE con un gradiente del 10%-20% (120 V, 90 minutos) y se transfirió a una membrana de PVDF (membrana Immobilon-P 0,45 μm Millipore IPVH 00010) mediante transferencia semiseca (2,0 mA/cm², 60 minutos). Después de fijación con metanol y bloqueo (BSA al 3% (p/v), Tween-20 al 0,1% (v/v) en TBS), la membrana se sometió a inmunotransferencia con 1 pg/ml de anticuerpo anti-GLPI (HYB 147-12, Antibodyshop) a 4°C a lo largo de la noche. Después de lavado e incubación con 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo de detección (IgG antirratón, conjugada con HRP, Perkin Elmer PC 2855-1197) a temperatura ambiente durante 4 horas, la detección por quimioluminiscencia revela la localización de la proteína. Los resultados se muestran en las figuras 13, 14 y 15, que indican el tipo de células (células hTERT-MSC, AtT20 ó HEK293) y el número de clon. Los resultados demuestran que los constructos de péptido GLP-1/C terminal se secretan de las líneas celulares transfectadas, es decir que la proteína tiene el peso molecular esperado. Adicionalmente, se enlaza a anticuerpo anti-GLP-1, que se enlaza al extremo N-terminal de GLP-1(7-37).

Ejemplo 14: Inmunoprecipitación de los péptidos

Para la inmunoprecipitación de los péptidos GLP1^{CM1} se preincubó sobrenadante de cultivo a 4°C durante una noche con proteína G-agarosa (20 µl de agarosa/ml de sobrenadante). La proteína enlazada de forma no específica se eliminó mediante filtrado a través de un filtro de 0,2 µm. Después de incubación con 1 µg/ml de anticuerpo de captura anti-GLP1 (HYB 147-12, Antibodyshop) durante 12 h a 4°C, se añadió 1 µl/ml de proteína G-agarosa durante 2 h a TA. La precipitación se realizó mediante centrifugación seguida de repetidos pasos de lavado con PBS. El inmunoprecipitado se hirvió en tampón de carga Lämmli, se separó en un gel SDS PAGE 10%-20% y se inmunotransfirió como ya se ha descrito.

La inmunoprecipitación del péptido GLP^{CM1} del sobrenadante de cultivo celular puede realizarse empleando el anticuerpo de captura anti GLP1 HYB 147-12 ó HYB 147-12 (Antibodyshop), lo que tiene como resultado una acumulación del péptido GLP^{CM1} y una eliminación de proteínas causantes de la contaminación cruzada. Los resultados se muestran en las figuras 16 A y B.

Ejemplo 15: Prueba animal*Ensayo de las microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) en ratones db/db*

El modelo de ratón aquí utilizado fue el ratón con diabetes tipo II C57/Ks-RJ db/db (mutación recesiva en el receptor de leptina). Para las pruebas animales se implantaron microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) que secretaban GLP/CM1 murino (SEQ ID N°: 6) en ratones C57/KS-RJ db de 12 semanas de edad. La línea celular que secretaba GLP era AtT20, una línea celular de tumor hipofisario murino transfectada tal y como se indica más arriba. Las microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) se inyectaron a través de una aguja 19G. Se ensayaron distintos sitios de implante (músculo, grasa) y volúmenes de implante (10 µl, 100 µl). El GLP activo se midió en el suero de los ratones diabéticos el día 2 y el día 22 después del implante de las microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) empleando el ELISA de GLP-1 (activo) (#EGLP-35K, Biotrend). Como indicación de la eficacia, se midió el nivel de glucemia de los animales en ayunas y se realizaron PTGIP (pruebas de tolerancia a la glucosa i.p.: inyección i.p. de glucosa en ratones que han ayunado a lo largo de la noche, seguida de una medición de la glucemia en las 2 h siguientes). En el suero de los animales trasplantados se halló GLP-1 activo en una concentración media de 15 pM el día 2 y 14 pM el día 22 después del trasplante de microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) que secretaban GLP1CM1 (n = 4) de tipo salvaje (véase la figura 17).

En los ratones diabéticos puede lograrse una normalización considerable de los niveles de glucosa en ayunas mediante el implante de microcápsulas esféricas de la invención (CellBeads) que secretan GLP1CM1 de tipo salvaje (SEQ ID NO 6) o el GLP1CM1 análogo (G8) (SEQ ID NO 6 pero con el segundo residuo sustituido por G) tanto en músculos (pata posterior) como en grasa (almohadilla grasa del cuello) (figuras 18 y 19). Los resultados de las PTGIP (figura 20) confirmaron la eficacia en la metabolización de la glucosa por el hecho de que el nivel de glucosa en el momento de la inyección (+O) es aproximadamente igual al de los ratones normales (a diferencia de los niveles elevados de los ratones diabéticos). También por el hecho de que, aunque el nivel aumenta más en los ratones tratados que en los ratones normales, este nivel vuelve con relativa rapidez al valor normal.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biocompatibles UK Limited

<120> Microcápsulas esféricas que comprenden péptidos GLP-1, su producción y su uso

<130> BI07P002WO

<140>

5 <141>

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 31

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: péptido sintético correspondiente a GLP-1(7-37)

<400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de IP-2 completa con todos los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 presente en la naturaleza, humana;

<400> 2

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly
1 5 10 15

25 <210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de IP-2 completa con todos los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 presente en la naturaleza, murina;

<400> 3

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 35

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: isoforma murina de GLP-2

<400> 4

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 20 25 30

Asp Arg Lys
 35

10

<210> 5

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia: isoforma humana de GLP-2

<400> 5

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Ser Thr Ile Leu Asp Asn
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 20 25 30

Asp Lys Lys
 35

<210> 6

20 <211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 363 810 T3

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No 6 (ID6syn, CM1) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2-RR-GLP1(7-37), 79 aa, 8,7 kD

<400> 6

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly Arg Arg
35 40 45

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
50 55 60

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
65 70 75

5 <210> 7

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No 7 (ID7rec, CM2) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2-RR-GLP2, 83 aa, 9,4 kD

<400> 7

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly Arg Arg
35 40 45

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Ser Thr Ile Leu Asp Asn
50 55 60

Leu Ala Thr Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
65 70 75 80

Asp Lys Lys

<210> 8

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO 8 (ID8 syn, CM3) corresponde a GLP-1(7-37)-IP2, 46 aa, 5,1 kD;

<400> 8

```
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1                5                10                15
```

```
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
                20                25                30
```

```
Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly
            35                40                45
```

10 <210> 9

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia: artificial

<400> 9

Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu Leu Ala Arg
 20 25 30

Ala Leu Pro Pro Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro
 35 40 45

Gln Pro Trp His Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala
 50 55 60

Thr Gln Glu Ala Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys
 85 90 95

Arg

<210> 10

<211> 79

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO 10 (N-GLP-1(7-37)-IP2(humano)-RR-GLP-1(7-37)-C, también denominado CM1 humano)

<400> 10

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
 20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg
 35 40 45

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 50 55 60

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 65 70 75

<210> 11

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO 11 (N-GLP-1(7-37)-IP2(humano)-RR-GLP-2-C), también denominado aquí CM2 humano)

<400> 11

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg
35 40 45

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
50 55 60

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
65 70 75 80

Asp Arg Lys

10 <210> 12

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO 12, GLP-1(7-37) ligado, sin ninguna secuencia conectora, a través de su término C a IP2 humano

<400> 12

ES 2 363 810 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly
35 40 45

<210> 13

<211> 815

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: (SEQ ID NO 13) representa la secuencia peptídica traducida del constructo según la figura 1k (SEQ ID NO 14)

<220>

10 <221> CDS

<222> (11)..(118)

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(809)

15 <400> 13

ES 2 363 810 T3

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49
Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97
Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactcgcc gtccgctcct 148
Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
30 35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gcccagcggc gtatccggac gccaaagaac 208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt cctctccat 268

ttgccctgcc acacagtggg ctggggttgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtgggcc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttcctc cttcccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac 434
Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat 530
Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
70 75 80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 626
Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc 674
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc cgg cga cac gcc gag 722
Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Glu
135 140 145

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 770
Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
150 155 160

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc tga gcgcgc 815
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
165 170 175

<210> 14

<211> 815

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo según la figura 1k

<400> 14

gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg cctgctgcc	60
acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgccccgggt	120
gagtgccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc	180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc	240
catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac	300
gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggctgacca	360
gacctcatg tcttctctct tcccaggacg tgaccacct gcacgccgag agggcggcc	420
ctcagccctg gcacgccgc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg	480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg	540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgagg caccttcacc tccgacgtga	600
gcagctacct ggagggccag gccccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg	660
gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggccgg cgacacgccg	720
agggcacctt cacctccgac gtgagcagct acctggaggg ccaggccgcc aaggagtca	780
tcgcctggct ggtgaagggc aggggctgag cgcgc	815

<210> 15

<211> 834

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducido según el constructo de la figura 1h

10 <220>

<221> CDS

<222> (11)..(118)

<220>

<221> CDS

15 <222> (387)..(821)

<400> 15

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49
Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97
Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactcgcc gtccgctcct 148
Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
30 35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gccagcggc gtatccggac gccaaagaac 208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268

ttgccctgcc acacagtggg ctggggttgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtggggc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttctc cttcccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac 434
Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat 530
Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
70 75 80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 626
Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc 674
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc cgg cga cac gcc gac 722
Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Asp
135 140 145

ggc agc ttc agc gac gag atg aac acc atc ctg gac aac ctg gcc gcg 770
Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Ala
150 155 160

cgc gac ttc atc aac tgg ctg atc cag acc aag atc acc gat cgg aag 818
Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr Asp Arg Lys
165 170 175 180

tga gcgcgctgat atc 834

<210> 16

<211> 834

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo según la figura 1h

<400> 16

```

gatatccacc atggccccg cgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg cctgctgcc      60
accatgctg ctgctgctg tgcagcccc acctctgctg gccggggccc tgccccggg      120
gagtgcccg cactcgccg cgcctcctg ctgagggggc gccgggcacg cgggctggg      180
ccagcggcg atccggacg caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggcctgc      240
catgtgccg tgcccttcc ctctcattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac      300
gtgtgtttg tgacaggcca catctctaac tgtggggccat gtggacctta ggccctgacca      360
gacctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggc      420
ctcagccctg gcacgccgc ctgccaaagc gccctgccc tgccccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgcg cgtgcctgat cctccgatg      540
gcctgagcgc tcggaatcg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggaggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcagg      660
gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggccgg cgacacgcc      720
acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcctggacaa cctggcccg cgcgacttca      780
tcaactggct gatccagacc aagatcaccg atcggaagtg agcgcgctga tate      834
    
```

<210> 17

5 <211> 780

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia peptídica traducida del constructo según la figura 11,

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(118)

<220>

15 <221> CDS

<222> (387)..(776)

<400> 17

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49
 Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
 1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97
 Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
 15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc cgg gtgagtgcc gccactcgcc gtccgctcct 148
 Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
 30 35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gccagcggc gtatccggac gccaaagaac 208

cagagagcca gccagatgcc aaagggcct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268

ttgccctgcc acacagtggg ctgggggtgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtgggccc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttcctc cttcccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac 434
 Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
 40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
 Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
 55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat 530
 Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
 70 75 80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
 Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
 85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 626
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
 105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc 674
 Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
 120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc cgg cga cac gcc gac 722
 Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Asp
 135 140 145

ggc agc ttc agc gac gag atg aac acc atc ctg gac aac ctg gcc gcg 770
 Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Ala
 150 155 160

cgc tga tacc 780
 Arg
 165

<210> 18

<211> 720

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo según la figura 11

<400> 18

```

gatatccacc atggcccccg cgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc      60
accatgctg ctgctgctgc tgcagccccc acctctgctg gcccgggccc tgccccgggt      120
gagtgcccg cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc      180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcca agggccctgc      240
catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgcac      300
gtgtgtttg tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca      360
gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgaccacct gcacgccgag aggcgcggcc      420
ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgagg cgtgcctgat ccctccgatg      540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg      660
acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcttgacaaa cctggccgcg cgctgatatc      720
    
```

<210> 19

5 <211> 716

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducido según la figura 1m

10 <220>

<221> CDS

<222> (11)..(118)

<220>

<221> CDS

15 <222> (387)..(710)

<400> 19

```

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg      49
              Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
                1                5                10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg      97
Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
  15                20                25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgccc gccactcgcc gtccgctcct      148
Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
  30                35
    
```

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gcccagcggc gtatccggac gccaagaaac 208
 cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268
 ttgccctgcc acacagtggg ctgggggttg acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328
 actgtggggc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttctc cttcccag 386
 gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac 434
 Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
 40 45 50
 gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
 Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
 55 60 65
 ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat 530
 Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
 70 75 80
 ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
 Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
 85 90 95 100
 ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 626
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
 105 110 115
 aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc 674
 Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
 120 125 130
 cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc tga gcgcgc 716
 Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly
 135 140

<210> 20

<211> 716

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo según la figura 1m

<400> 20

gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcggc gccgccaggg ccctgctgcc 60
 acccatgctg ctgctgctgc tgcagccccc acctctgctg gcccgggccc tgccccgggt 120
 gagtgcccg cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcaag cgggctgggc 180
 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc 240
 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac 300
 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggctgacca 360
 gacctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc 420
 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg 480
 cccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg 540

10

```
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga    600
gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg    660
gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggctga gcgcgc      716
```

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial

<400> 21

```
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1           5           10           15
```

```
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
           20           25           30
```

10 <210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia: artificial

<400> 22

```
Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile
 1           5           10
```

<210> 23

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial

<400> 23

```
Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu
 1           5           10
```

25

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial

<400> 24

5 Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu
 1 5 10

<210> 25

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia según la fórmula (I)

<220>

<221> Elementos diversos (misc feature)

<222> (31)..(31)

15 <223> Xaa = NH2, si la secuencia es amida de GLP-1(7-36), o Xaa = Gly-OH, si la secuencia es amida de GLP-1(7-37),

<400> 25

 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
 20 25 30

<210> 26

20 <211> 584

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: péptido de fusión GLP-1 correspondiente a la figura 1e #217

25 <220>

<221> CDS

<222> (31)..(561)

<400> 26

ES 2 363 810 T3

aattcagata attcgaatagc cccgggcacc	atg gct ccc gct gca tgg ctg aga	54
	Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg	
	1 5	
tct gcg gcc gcg cgc gcc ctc ctg ccc ccg atg ctg ctg ctg ctg ctc		102
Ser Ala Ala Ala Arg Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu		
10 15 20		
cag ccg ccg ccg ctg ctg gcc cgg gct ctg ccg ccg gac gtc cac cac		150
Gln Pro Pro Pro Leu Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro Asp Val His His		
25 30 35 40		
ctc cat gcc gag agg agg ggg cca cag ccc tgg cat gca gcc ctg ccc		198
Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His Ala Ala Leu Pro		
45 50 55		
agt agc ccg gca cct gcc cct gcc acg cag gaa gcc ccc ccg cct gcc		246
Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala Pro Arg Pro Ala		
60 65 70		
agc agc ctc agg cct ccc cgc tgt ggc gtg ccc gac cca tct gat ggg		294
Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Pro Ser Asp Gly		
75 80 85		
ctg agt gcc cgc aac cga cag aag agg cat gcc gaa ggg acc ttt acc		342
Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr		
90 95 100		
agc gat gtg agc tct tat ctg gaa ggc cag gct gcc aag gag ttc att		390
Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile		
105 110 115 120		
gct tgg ctg gtg aaa ggc cgg gga agg cgg gat ttc cca gag gag gtg		438
Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val		
125 130 135		
gcc atc gtg gag gag ctg ggc cgg cga cat gcc gaa ggg acc ttt acc		486
Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr		
140 145 150		
agc gat gtg agc tct tat ctg gaa ggc cag gct gcc aag gag ttc att		534
Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile		
155 160 165		
gct tgg ctg gtg aaa ggc cgg gga tga attgcccaagg gcgaattatc agg		584
Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly		
170 175		

REIVINDICACIONES

1. Microcápsula esférica que comprende como mínimo un revestimiento superficial y un núcleo, en la que el como mínimo un revestimiento superficial comprende polímeros reticulados, donde el núcleo comprende polímeros reticulados y células transfectadas con y capaces de expresar y secretar un péptido de fusión que comprende GLP-1, o un fragmento o una variante del mismo, seleccionados de un péptido de fusión que comprende como componente (I) en el extremo N-terminal una secuencia de GLP-1(7-35, 7-36 ó 7-37), o un fragmento funcional o una variante de la misma, y como componente (II) en el extremo C-terminal una secuencia peptídica de al menos 9 aminoácidos y donde el péptido de fusión, sus fragmentos o variantes conservan la actividad biológica del GLP-1 nativo.
2. Microcápsula esférica según la reivindicación 1, caracterizada porque el polímero reticulado del núcleo y/o del como mínimo un revestimiento superficial comprende biopolímeros.
3. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque el polímero reticulado del núcleo y/o el como mínimo un revestimiento superficial comprende un alginato.
4. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el polímero reticulado del núcleo y/o el como mínimo un revestimiento superficial comprende un polímero químicamente idéntico en concentraciones idénticas o diferentes, pudiendo los polímeros tener además pesos moleculares diferentes y/o estar reticulados de maneras diferentes.
5. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el núcleo tiene un diámetro de aproximadamente 20 a aproximadamente 2.000 μm y en la que el como mínimo un revestimiento superficial tiene un espesor de aproximadamente 10 a aproximadamente 2.000 μm .
6. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la microcápsula comprende 1, 2, 3, 4, 5, 5-10 o más revestimientos superficiales.
7. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizada porque la microcápsula comprende un revestimiento superficial externo adicional consistente en policationes.
8. Microcápsula esférica según la reivindicación 7, caracterizada porque el revestimiento superficial externo adicional consiste en poli-L-lisina.
9. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizada porque el componente (I) del péptido de fusión contiene una secuencia que tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 1.
10. Microcápsula esférica según la reivindicación 9, caracterizada porque el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia según la SEQ ID NO 22 (RRDFPEEVAI) o una secuencia que tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 22.
11. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, caracterizada porque el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia según la SEQ ID NO 23 (RRDFPEEVAIVEEL) o la SEQ ID NO 24 (RRDFPEEVAIAEEL) o una secuencia que tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs 23 ó 24.
12. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada porque el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia según la SEQ ID NO 2 (RRDFPEEVAIVEELG) o la SEQ ID NO 3 (RRDFPEEVAIAEELG) o una secuencia que tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs 2 ó 3.
13. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizada porque el componente (I) y el componente (II) están ligados directamente o a través de una secuencia conectora.
14. Microcápsula esférica según la reivindicación 13, caracterizada porque la secuencia conectora tiene una longitud de 1 a 10 aminoácidos.
15. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizada porque el péptido de fusión contiene una secuencia según la SEQ ID NO 8 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRRDF-PEEVAIAEELG) o la SEQ ID NO 12 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK-EFIAWLVKGRGRRDFPEEVAIVEELG) o una secuencia que tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs 8 ó 12.
16. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, caracterizada porque el péptido de fusión contiene, alternativa o adicionalmente al componente (II), un componente (III), pudiendo el componente (III) estar ligado al término C del componente (I) y/o al término N del componente (I), si los

componentes (I) y (III) están presentes en la proteína de fusión, o pudiendo el componente (III) estar ligado al término C del componente (II) y/o al término N del componente (I), si los componentes (I), (II) y (III) están presentes en la proteína de fusión.

- 5 17. Microcápsula esférica según la reivindicación 16, caracterizada porque el componente (III) comprende como mínimo cuatro residuos de aminoácidos, preferentemente como mínimo 10 residuos de aminoácidos adicionales y con mayor preferencia como mínimo 20 o como mínimo 30.
- 10 18. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, caracterizada porque el componente (III) comprende como mínimo 4, preferentemente como mínimo 10 y con mayor preferencia como mínimo 20 residuos de aminoácido adicionales de la secuencia N-terminal de GLP-2 como en el proglucagón o de GLP-1 (7-37).
19. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, caracterizada porque el componente (III) contiene la secuencia de SEQ ID NOs 4 ó 5 o una secuencia que tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs 4 ó 5.
- 15 20. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizada porque el péptido de fusión contiene una secuencia peptídica seleccionada de un grupo consistente en SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 26, o una secuencia que tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs 6, 7, 10, 11 ó 26.
- 20 21. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20, caracterizada porque el péptido de fusión comprende una proteína portadora, en particular transferrina o albúmina, como componente (IV).
22. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 caracterizada porque las células contenidas en el núcleo de la microcápsula esférica se seleccionan entre células madre mesenquimales humanas, células diferenciadas derivadas de células madre mesenquimales humanas, incluyendo osteoblastos, condrocitos, células grasas (adipocitos) o células de tipo neurona, incluyendo células cerebrales.
- 25 23. Microcápsula esférica según la reivindicación 22, caracterizada porque las células contenidas en el núcleo de la microcápsula esférica están seleccionadas (*in vitro*) entre células madre mesenquimales humanas, diferenciándose las células *in vitro* o *in vivo* en células grasas (adipocitos) adecuadas para el trasplante en tejido adiposo.
- 30 24. Composición farmacéutica que comprende una microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 25. Procedimiento para producir una microcápsula esférica tal y como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende como mínimo un revestimiento superficial y un núcleo y en la que el como mínimo un revestimiento superficial comprende un polímero reticulado y el núcleo comprende un polímero reticulado y células biológicas capaces de expresar y secretar GLP-1, un fragmento o una variante del mismo, o un péptido de fusión que comprende GLP-1, o un fragmento o una variante del mismo, comprendiendo el procedimiento los pasos siguientes:
- (a) preparar un núcleo que comprende un polímero reticulado y células biológicas capaces de expresar y secretar GLP-1, un fragmento o una variante del mismo, o un péptido de fusión que comprende GLP-1, o un fragmento o una variante del mismo;
- 40 (b) preparar como mínimo un revestimiento superficial que comprende un polímero reticulado.
- 45 26. Utilización de la microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I o tipo II, la resistencia a la insulina, trastornos de peso y enfermedades o estados asociados(as) a los mismos, incluyendo los trastornos de peso o estados asociados la obesidad, estados asociados al sobrepeso, desregulación de la saciedad, niveles reducidos de insulina plasmática, niveles elevados de glucemia o masa de células beta pancreáticas reducida,
- o
- 50 para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y enfermedades o estados asociados(as) a los mismos, estando los trastornos neurodegenerativos y las enfermedades o los estados asociados(as) a los mismos seleccionados del grupo compuesto por la enfermedad de Alzheimer (EA) y otros estados neurodegenerativos centrales y periféricos seleccionados entre esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia, enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Pick, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Schilder y enfermedad de Parkinson, o apoplejía,

hemorragia intracerebral (HIC), hemorragia subaracnoidea, adenoleucodistrofia (x-ALD) u otras leucodistrofias,

o

para el tratamiento de trastornos y enfermedades o estados asociados a la apoptosis.

- 5 27. Microcápsula esférica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para el uso en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I o tipo II, la resistencia a la insulina, trastornos de peso y enfermedades o estados asociados(as) a los mismos, incluyendo los trastornos de peso o estados asociados la obesidad, estados asociados al sobrepeso, desregulación de la saciedad, niveles reducidos de insulina plasmática, niveles elevados de glucemia o masa de células beta pancreáticas reducida,

10 o

15 en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y enfermedades o estados asociados(as) a los mismos, estando los trastornos neurodegenerativos y las enfermedades o los estados asociados(as) a los mismos seleccionados del grupo compuesto por la enfermedad de Alzheimer (EA) y otros estados neurodegenerativos centrales y periféricos seleccionados entre esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia, enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Pick, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Schilder y enfermedad de Parkinson, o apoplejía, hemorragia intracerebral (HIC), hemorragia subaracnoidea, adenoleucodistrofia (x-ALD) u otras leucodistrofias,

20 o

en el tratamiento de trastornos y enfermedades o estados asociados a la apoptosis.

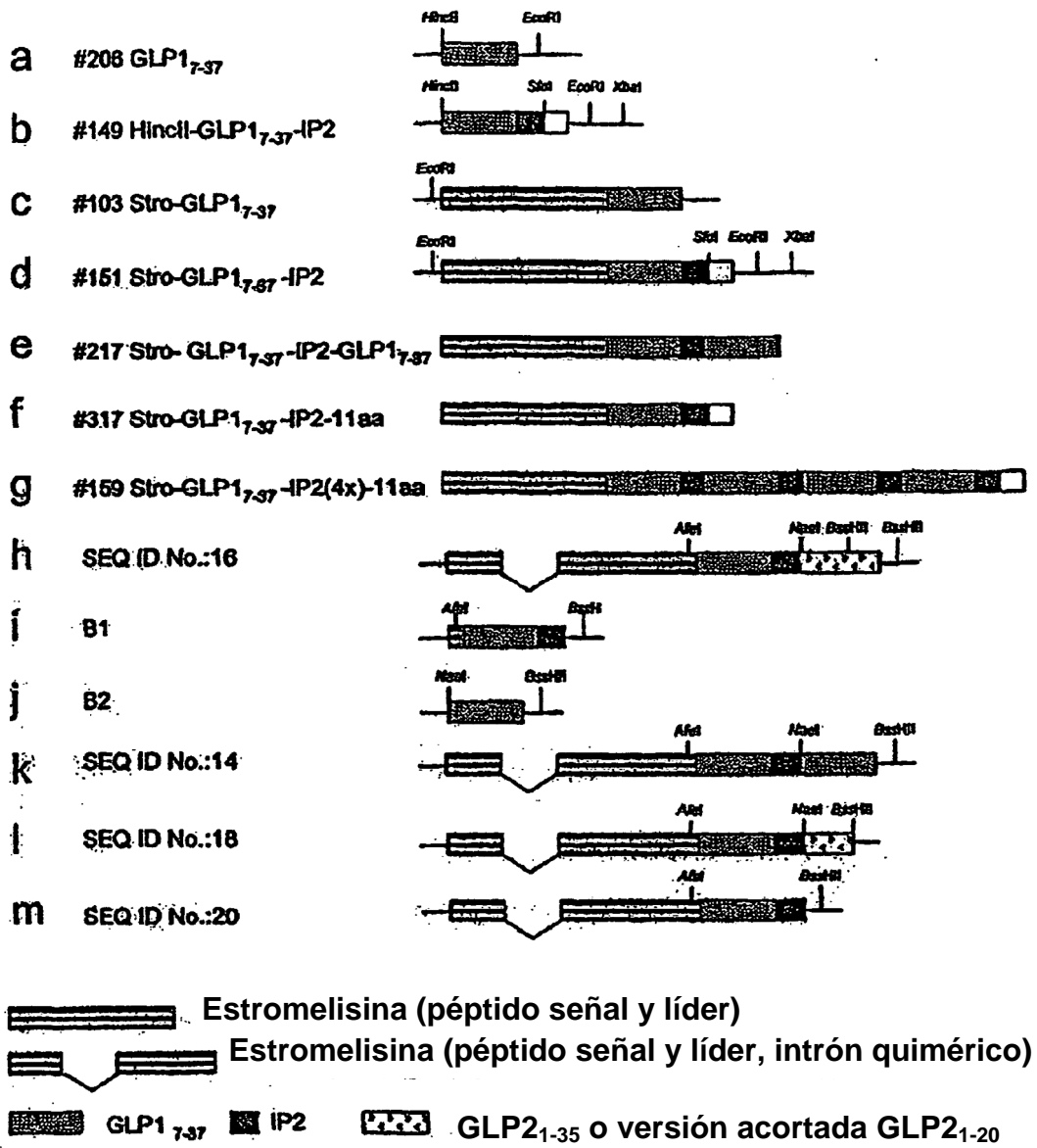


Figura 1

**GLP1 activo después de transfección transitoria
de células hTERT-MSC y HEK293**

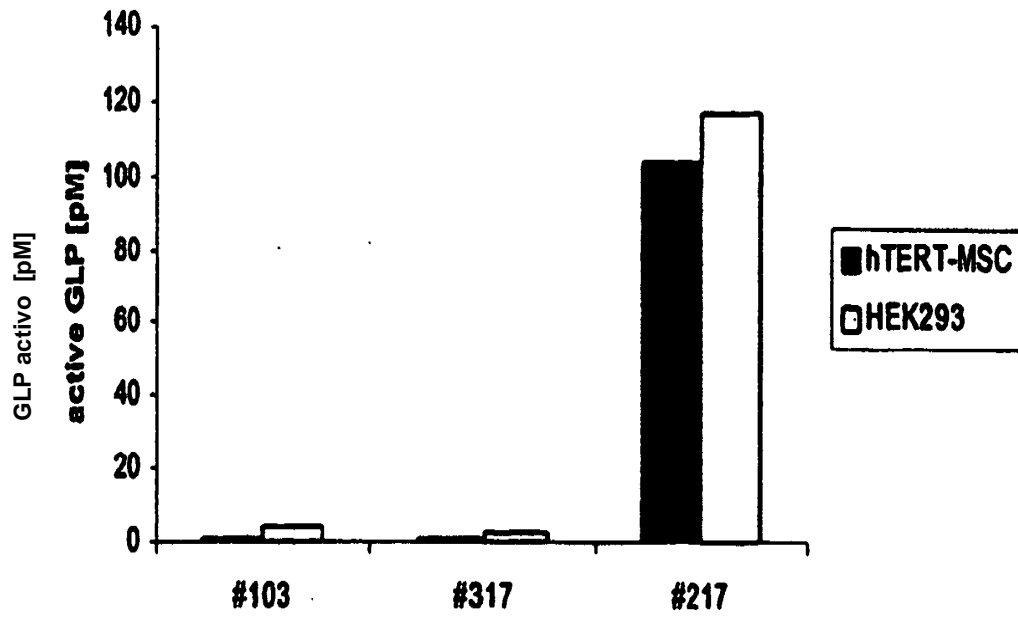


Figura 2

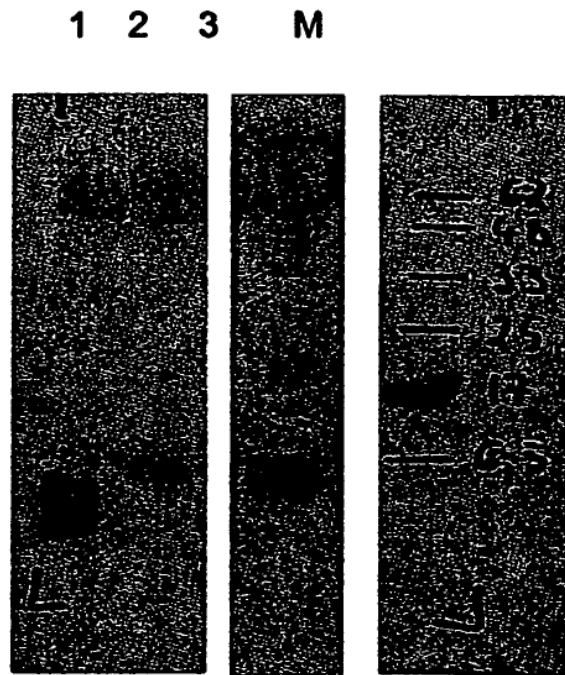


Figura 3

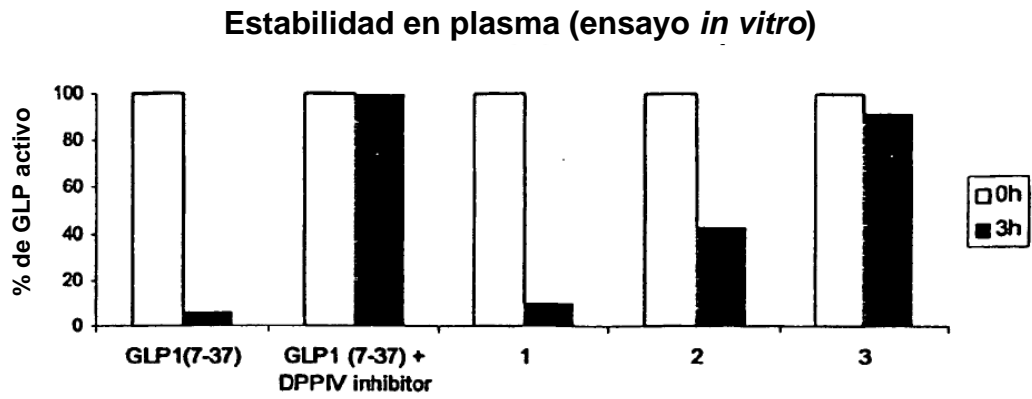


Figura 4

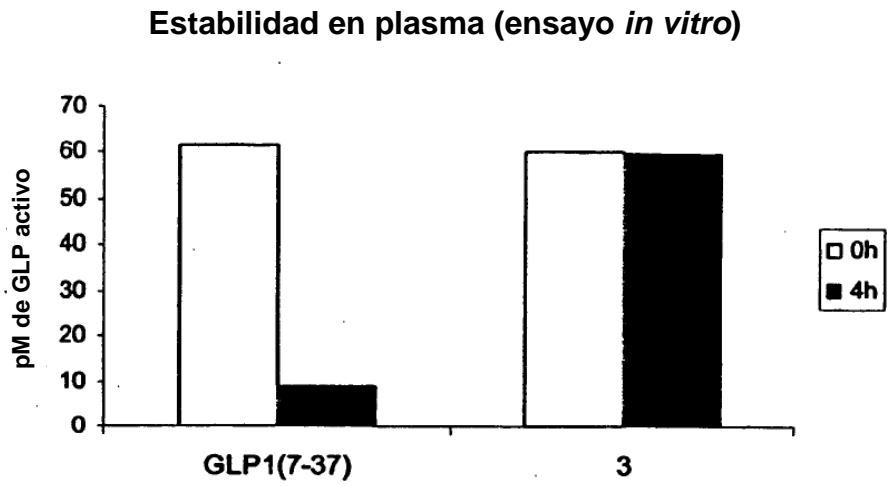


Figura 5

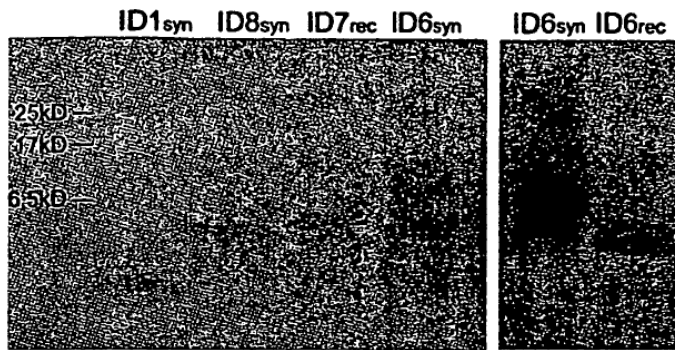


Figura 6

Estabilidad en plasma de péptidos GLP1 (ensayo *in vitro*)

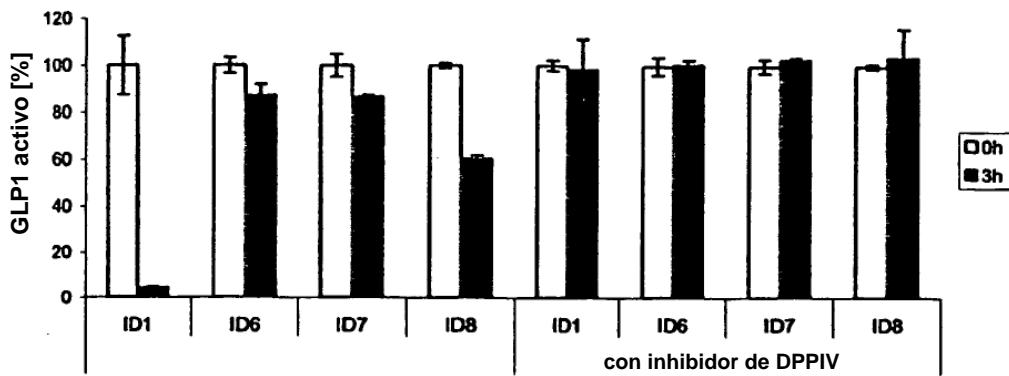


Figura 7

Bioensayo *in vitro*: producción de AMP cíclico

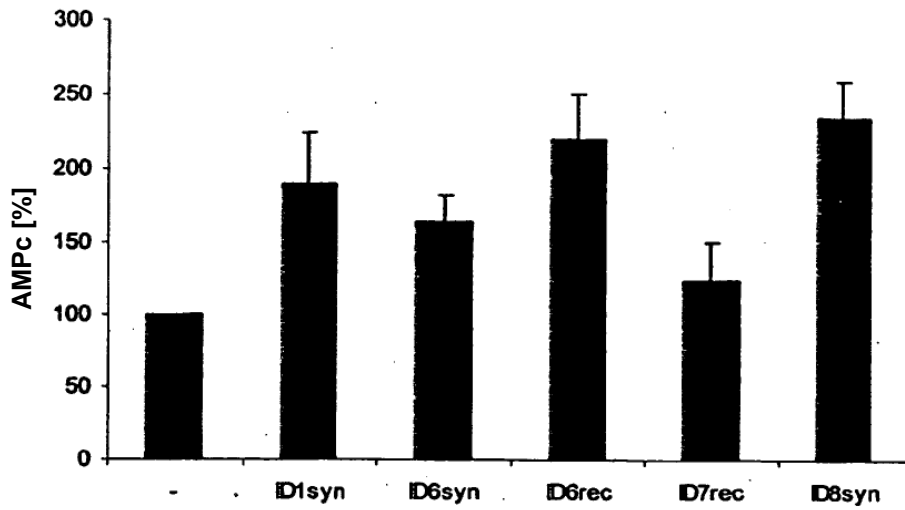


Figura 8

Niveles relativos de glucosa en ayunas de ratones db/db

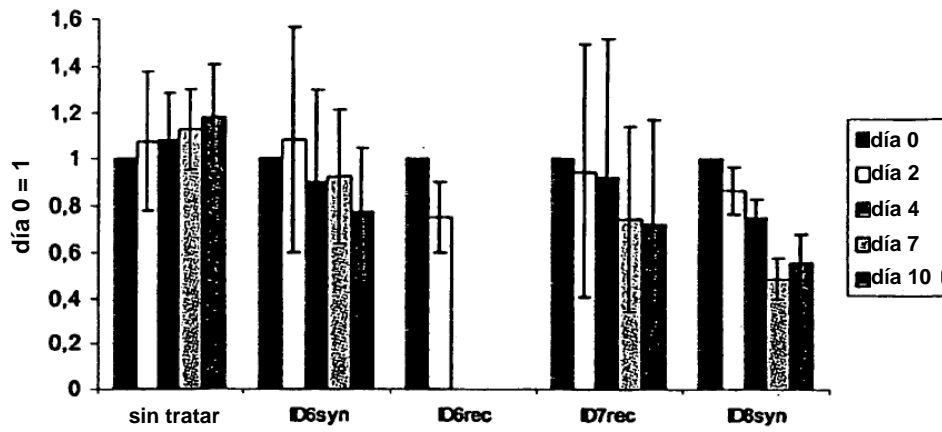


Figura 9

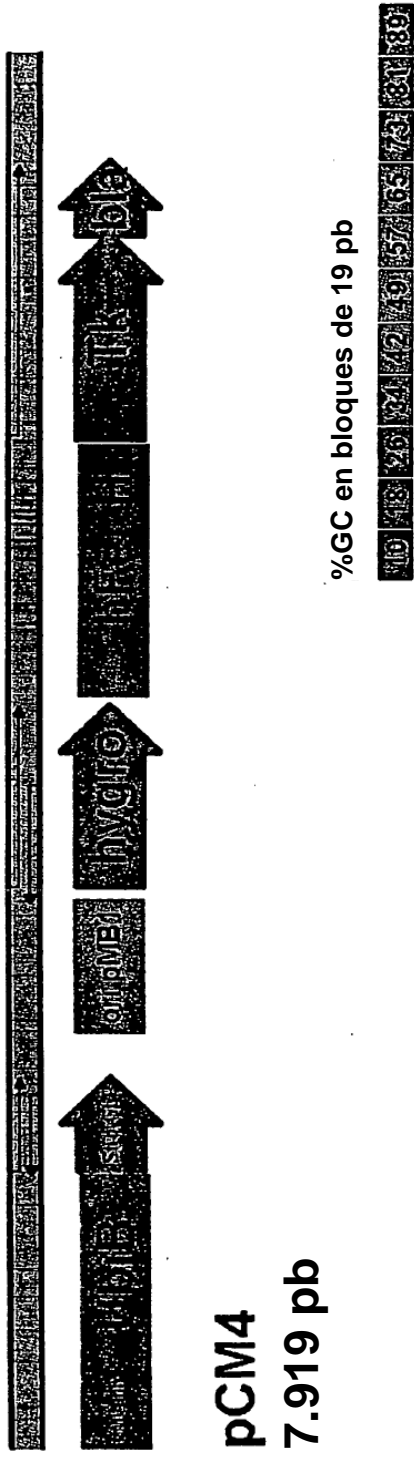


Figura 10

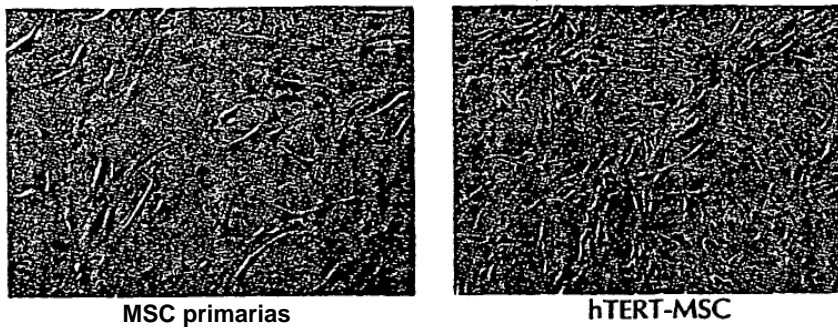


Figura 11

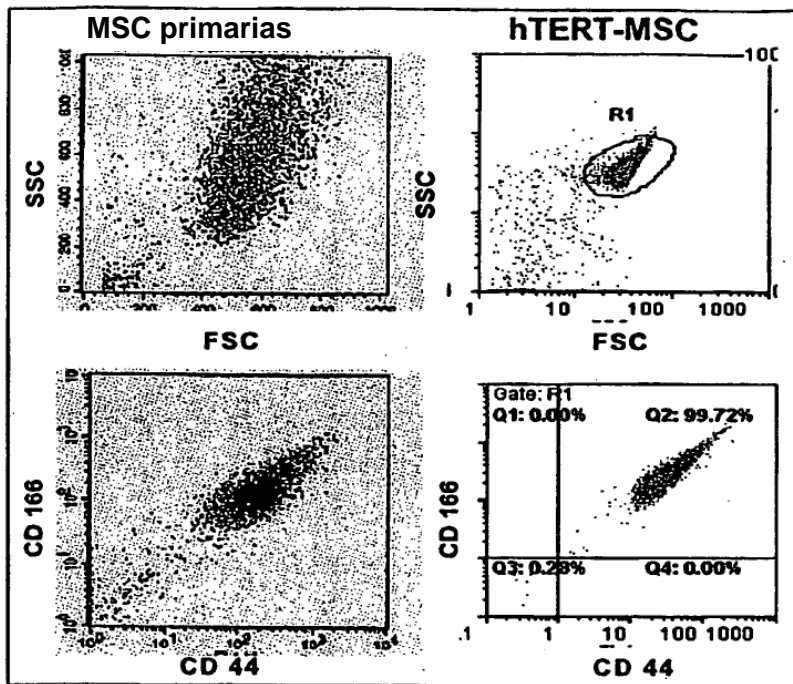


Figura 12

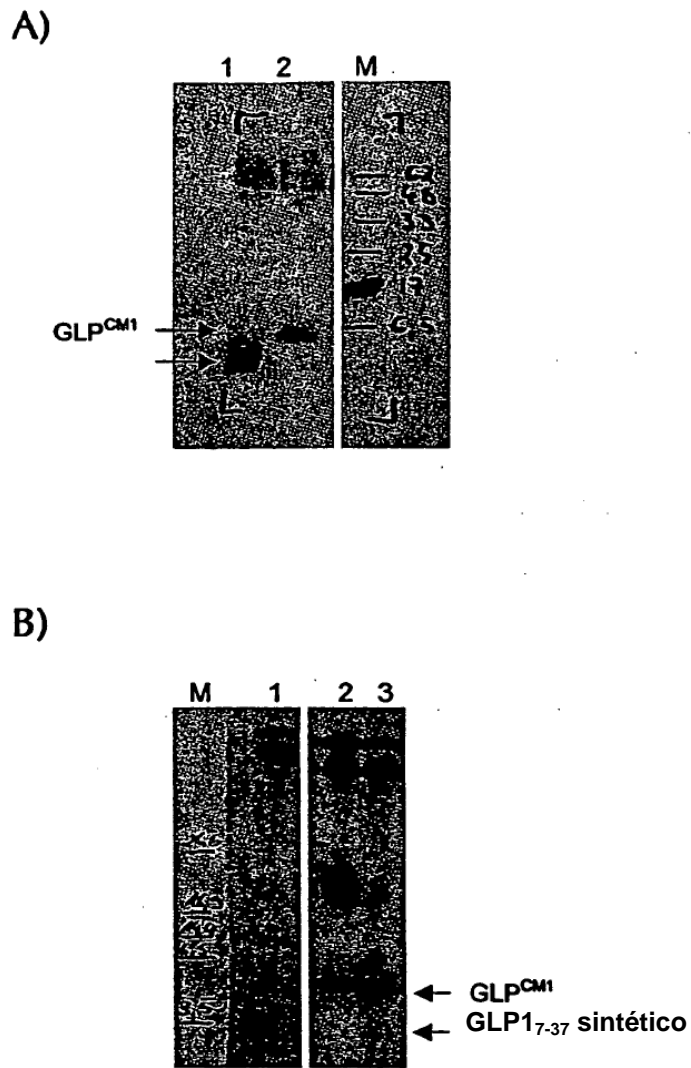


Figura 13

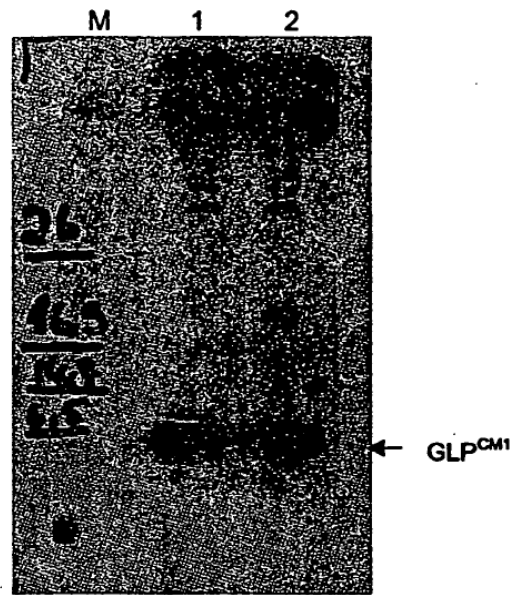


Figura 14

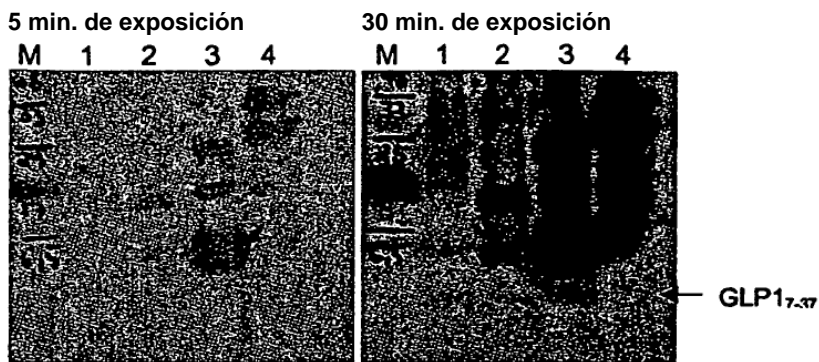


Figura 15

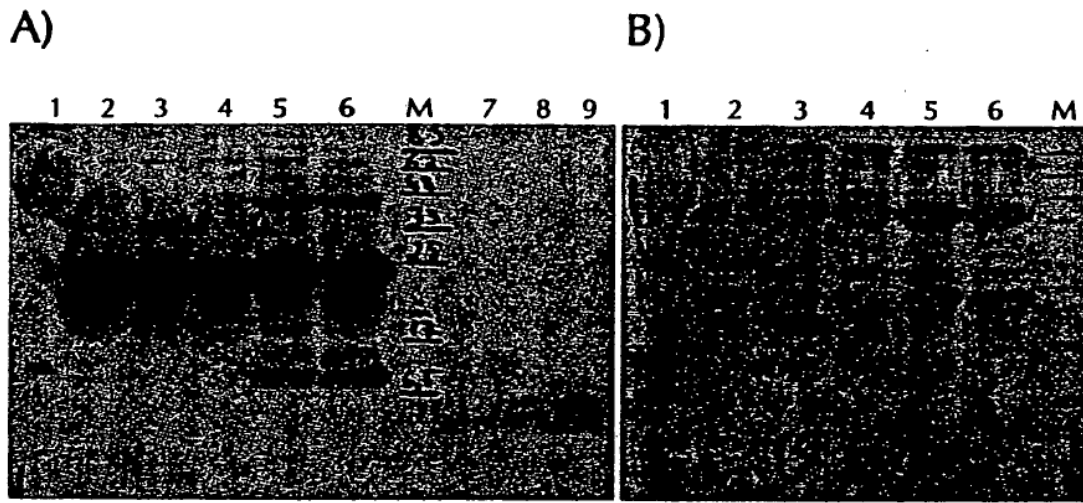


Figura 16

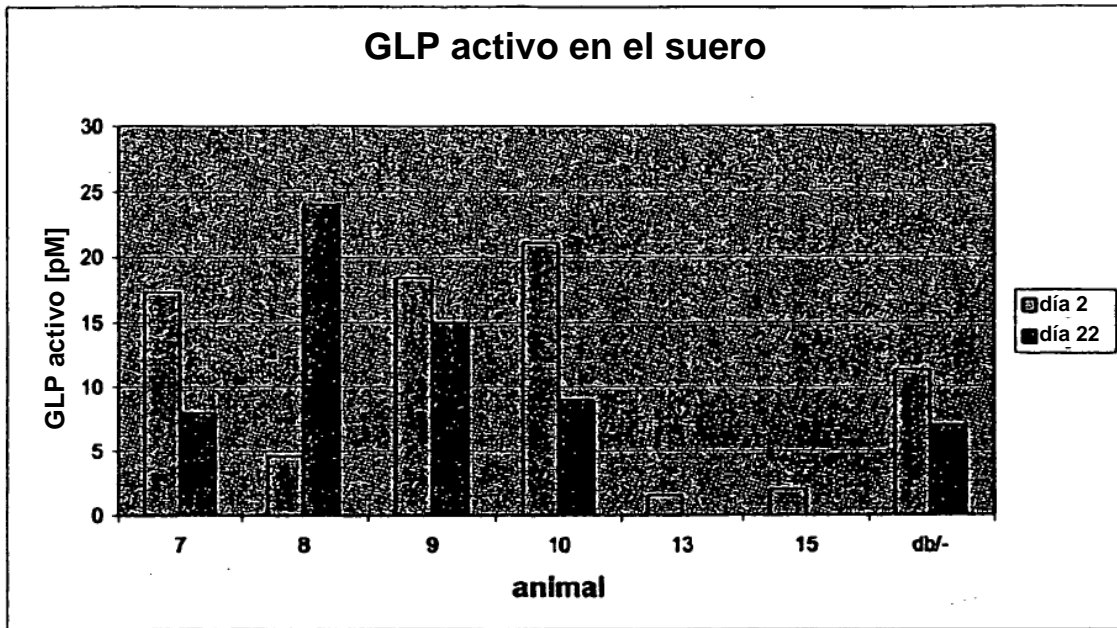


Figura 17

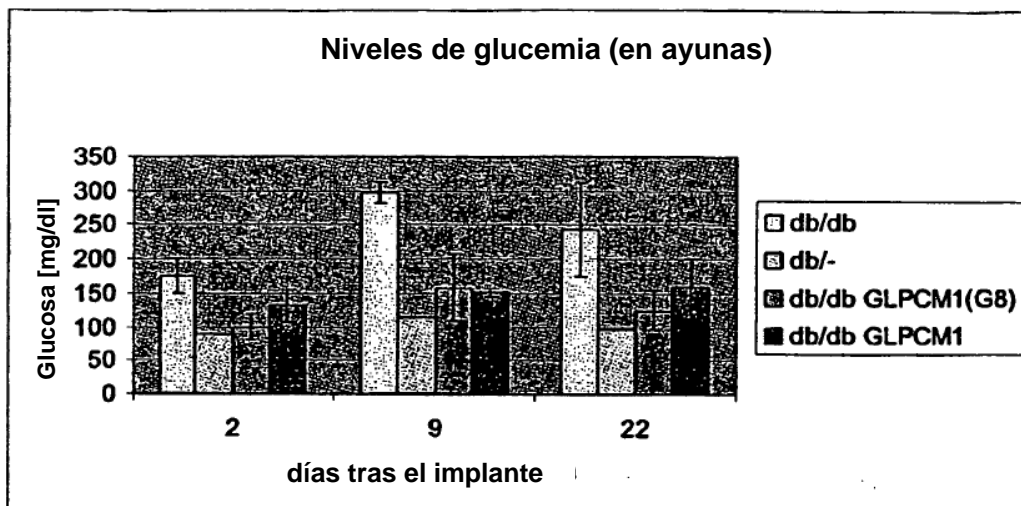


Figura 18

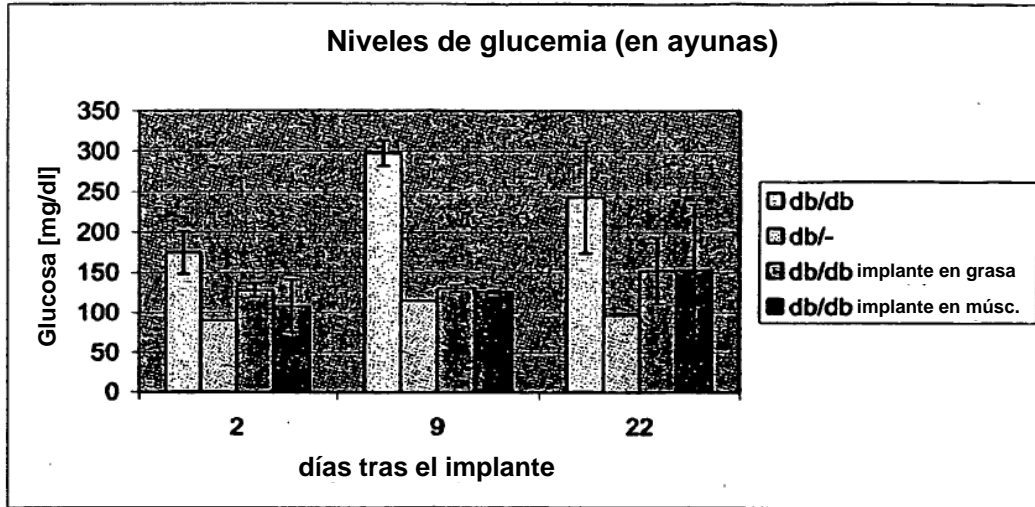


Figura 19

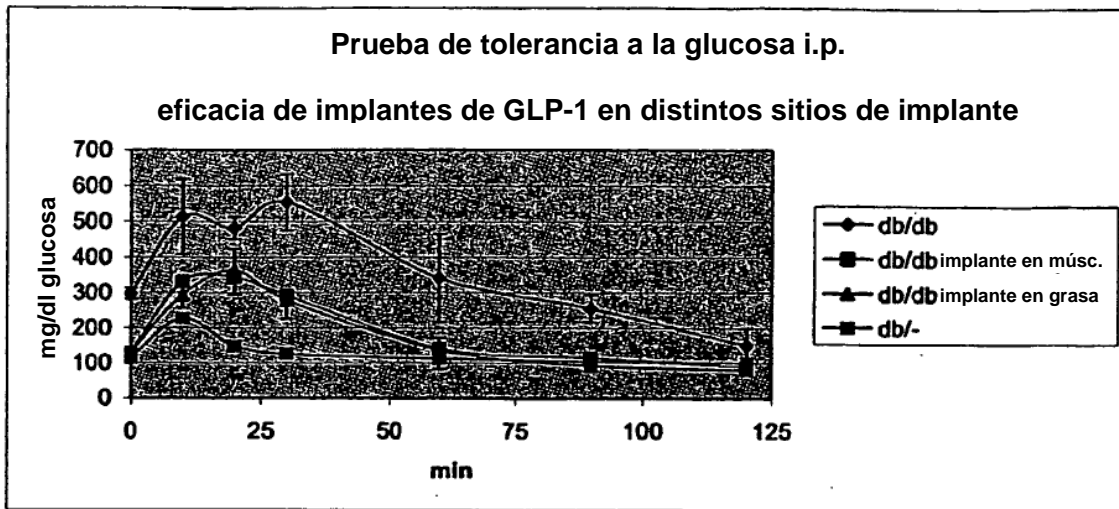


Figura 20