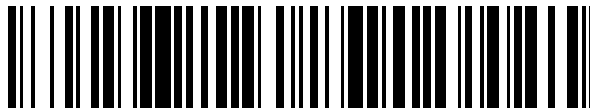


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 061**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01923894 .8**
96 Fecha de presentación: **12.03.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1274464**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.01.2003**

54 Título: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA EXPRESIÓN REGULADA DE PROTEÍNA EN EL INTESTINO.**

30 Prioridad:
13.03.2000 US 188796 P
08.12.2000 US 254464 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.02.2012

73 Titular/es:
ENGENE, INC.
100-2386 EAST MALL
VANCOUVER, BC V6T 1Z3, CA

72 Inventor/es:
KIEFFER, Timothy, J. y
CHEUNG, Anthony T.

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

ES 2 374 061 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

Composiciones y métodos para la expresión regulada de proteína en el intestino.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la producción regulable de proteínas en el intestino, y más particularmente a la producción regulada por un nutriente de factores reductores de la glucosa a partir de células endocrinas del intestino.

10

Antecedentes

Los péptidos y proteínas, en virtud de su versatilidad conformacional y especificidad funcional, se han usado para tratar un hospedante de enfermedades que incluyen diabetes, hemofilia, cáncer, trastornos cardiovasculares, enfermedades infecciosas y artritis (Russell C.S. y Clarke L.A. Clin Gent 55(6):389 (1999); Ryffel B. Biomed environ Sci 10:65(1997); Koths K. Curr Opin Biotechnol 6:681 (1995); Buckel P. Trends Pharmacol Sci 17:450 (1996)). Actualmente, más de dos tercios de las medicinas biotecnológicas aprobadas son fármacos proteicos sistémicos. Con los avances recientes en el campo de la genómica funcional, la proteómica y la ingeniería genética, un número creciente de fármacos proteicos están entrando en el mercado biofarmacéutico.

20

Originalmente, los fármacos proteicos se purificaron a partir de tejidos animales o de suero humano. Los fármacos a base de proteínas han pasado varias etapas de mejora hasta alcanzar el estado actual de la aplicación clínica. Por ejemplo, la industria biofarmacéutica ahora usa levadura y bacterias manipuladas mediante ingeniería genética para fabricar proteínas humanas recombinantes (Scopes R.K. Biotechnol Appl Biochem 23:197 (1996)). Esta tecnología innovadora ha superado el riesgo para la salud y las carencias que plagaron la primera generación de fármacos proteicos, y ha mejorado consiguientemente el valor terapéutico de las proteínas. Sin embargo, a pesar de estos avances, el amplio uso de proteínas como sustancias terapéuticas todavía está impedido por dificultades a la hora de purificar proteínas recombinantes en formas activas y por el coste elevado de los procedimientos de fabricación (Berthold W. y Walter J. Biologicals 22:135(1994); Scopes R.K. Biotechnol Appl Biochem 23:197 (1996)). Adicionalmente, los fármacos proteicos encaran barreras a su entrada en el organismo. Cuando se toman oralmente, son susceptibles de romperse por enzimas en el tubo digestivo (Wang W. J Drug Target 4:195 (1996); Woodley J.F. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 11:61 (1994)).

25

30

Otras rutas de suministro de proteínas exploradas incluyen bombas de infusión (Bremer et. al., Pharm Biotechnol 10:239 (1997)) suministro transdérmico (Burkoth T.L. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 16:331 (1999)), microencapsulamiento (Cleland J.L. Pharma Biotechnol 10:1 (1997)) e inhalación (Gonda I. J Pharm Sci 89:940 (2000)). Actualmente, la administración subcutánea e intravenosa mediante inyección con aguja es la ruta de elección para suministrar sustancias terapéuticas proteicas. Desafortunadamente, este modo de suministro es muy poco ideal debido a que las concentraciones de proteína a menudo no se mantienen dentro de un intervalo terapéutico, o no proporcionan cinéticas de suministro apropiadas. Además, el tratamiento efectivo con fármacos proteicos requiere habitualmente inyecciones frecuentes con agujas, que pueden causar reacciones locales y malestar, dando por tanto como resultado un mal cumplimiento por parte del paciente (Jorgensen J.T. J Pediatr Endocrinol 7:175(1994)). Estos y otros factores limitan la aplicación terapéutica de muchos fármacos, y finalmente impiden su potencial comercial. Por lo tanto, es axiomático identificar nuevos métodos de suministro para sustancias terapéuticas proteicas.

35

40

45

La inserción de genes que codifican proteínas terapéuticas específicas en células del organismo se ha usado para resolver los problemas de suministro mencionados anteriormente a la hora de tratar enfermedades. Esta metodología se denomina terapia génica, y promete ser la nueva dirección en el suministro de proteínas. Mediante este enfoque, las células en el organismo se pueden transformar en "biorreactores", fabricando cantidades suficientes de proteínas terapéuticas y eliminando por tanto la necesidad de inyecciones frecuentes con agujas. Actualmente, la terapia génica se puede categorizar en dos enfoques generales (Drew J. y Martin L-A. en: Lemoine N.R. (ed) Understanding Gene Therapy. Springer-Verlag, New York, Capítulo 1: p. 1-10 (1999)).

50

55

En el primer enfoque, denominado como terapia génica *in vivo*, se introduce un gen en una forma que permite su absorción por las células situadas en el hospedante vivo. Por ejemplo, un gen terapéutico se empaqueta en el genoma de virus, tales como retrovirus, virus adenoasociado o adenovirus. El virus recombinante que contiene el gen terapéutico se introduce entonces en un organismo vivo y se deja infectar las células en el organismo. A través del proceso de infección, el virus incorpora su genoma, que contiene los genes terapéuticos, en la estructura genómica de la célula hospedante. Como resultado, la célula infectada expresa el gen terapéutico.

60

El segundo enfoque implica la transferencia *in vitro* de material genético a células retiradas del organismo hospedante. Tras la incorporación exitosa de un gen en el genoma de la célula, las células transformadas se implantan nuevamente en el hospedante. Este método de transferencia génica se denomina como terapia génica *ex vivo*.

65

Tanto la terapia génica *in vivo* como *ex vivo* ofrecen a los médicos el poder para añadir o modificar genes específicos que dan como resultado la cura de la enfermedad (Friedmann T. en: Friedmann T (ed) *The Development of Human Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Capítulo 1: p. 1-20 (1999)). Las aplicaciones clínicas de esta tecnología están siendo estudiadas en un amplio intervalo de enfermedades, incluyendo cáncer, trastornos cardiovasculares, enfermedades metabólicas, trastornos neurodegenerativos, trastornos inmunitarios y otras enfermedades genéticas o adquiridas ((Friedmann T. en: Friedmann T (ed) *The Development of Human Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Capítulo 1: p. 1-20 (1999); Drew J. y Martin L-A. en: Lemoine N.R. (ed) *Understanding Gene Therapy*. Springer-Verlag, Nueva York, Capítulo 1: p. 1-10 (1999)). Se han logrado concentraciones terapéuticas sostenidas de numerosas proteínas tras la introducción estable de genes que codifican las proteínas en células mediante metodologías de terapia génica. Sin embargo, para algunos trastornos, se requiere el suministro regulado de la proteína terapéutica. Por ejemplo, la terapia de sustitución de insulina para pacientes diabéticos requiere idealmente que se suministre la cantidad apropiada de insulina durante las comidas. Igualmente, la efectividad óptima de supresores del apetito se puede lograr mediante liberación dependiente de las comidas. Por lo tanto, para suministrar tales proteínas terapéuticas, es óptimo un sistema de liberación accionado por una señal o estímulo, tal como una comida.

Una enfermedad particular muy adecuada para el suministro en el tiempo es diabetes mellitus, una enfermedad metabólica debilitante provocada por la producción ausente (tipo 1) o insuficiente (tipo 2) de insulina a partir de células β pancreáticas (Unger, R.H. *et al.*, *Williams Textbook of Endocrinology* Saunders, Filadelfia (1998)). Las células β son células endocrinas especializadas que fabrican y almacenan insulina para la liberación tras una comida (Rhodes, *et. al.* *J. Cell Biol.* 105:145(1987)), y la insulina es una hormona que facilita la transferencia de glucosa desde la sangre a los tejidos en los que se necesita. Los pacientes con diabetes deben monitorizar frecuentemente los niveles de glucemia, y pueden requerir múltiples inyecciones diarias de insulina para sobrevivir. Sin embargo, tales pacientes raramente logran los niveles ideales de glucosa mediante inyección de insulina (Turner, R.C. *et al.* *JAMA* 281:2005(1999)). Además, la elevación prolongada de los niveles de insulina puede dar como resultado efectos secundarios perjudiciales tales como choque hipoglucémico y desensibilización de la respuesta corporal a la insulina. En consecuencia, los pacientes diabéticos todavía desarrollan complicaciones a largo plazo, tales como cardiopatías, nefropatía, ceguera, daño nervioso y trastornos de curación de heridas (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, *Lancet* 352, 837 (1998)).

La terapia génica representa un medio prometedor para lograr el suministro fisiológico de péptidos terapéuticos, tales como insulina para el tratamiento de diabetes (Leibowitz, G. y Levine, F. *Diabetes Rev.* 7:124 (1999)). Las células sustitutas que expresan el gen incorporado, procesan y almacenan la proteína codificada, y segregan insulina de manera regulada dan por lo tanto un tratamiento para la diabetes. El control de los niveles de insulina plasmáticos acoplado a la producción de insulina a las necesidades cambiantes de nutrientes del organismo también reduce los efectos secundarios asociados con la inyección de insulina. En consecuencia, existe la necesidad de una liberación controlada de proteínas para lograr un tratamiento efectivo de la diabetes y otras enfermedades en seres humanos. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

Sumario

La presente invención se basa, en parte, en la producción de células del intestino transformadas que producen insulina en respuesta a glucosa. Las células transformadas sensibles a la glucosa, presentes en el intestino de los animales, son capaces de segregarse insulina a niveles fisiológicos que restauran la homeostasis normal de la glucosa en animales diabéticos. De este modo, las células endocrinas del intestino son dianas adecuadas para la introducción terapéutica de ácido nucleico que codifica proteínas, *ex vivo* o *in vivo*, cuya producción en un animal, en respuesta a una señal o estímulo (por ejemplo, un nutriente), proporciona un beneficio terapéutico.

Por lo tanto, la invención proporciona métodos para generar una célula mucosal que produce una proteína en respuesta a un nutriente, y composiciones que incluyen una célula mucosal que produce una proteína en respuesta a un nutriente. En una realización, un método incluye poner en contacto una célula mucosal con un polinucleótido que comprende un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica una proteína en condiciones que permiten la transformación de la célula; e identificar un transformante celular que produce una proteína de una manera regulable por el nutriente, generando de este modo una célula mucosal que produce una proteína en respuesta a un nutriente. En otra realización, una composición incluye una célula mucosal aislada o cultivada que produce una proteína regulable por un nutriente, en la que la expresión de la proteína es conferida por un transgén que comprende un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína.

Por lo tanto, la invención también proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno tratable produciendo una proteína en un tejido. En una realización, un método incluye implantar en el tejido una o varias células mucosales que producen una proteína en respuesta a un nutriente, en una cantidad efectiva para tratar el trastorno. Los tejidos implantables ejemplares incluyen tejidos mucosales (por ejemplo, tubo digestivo) y no mucosales (por ejemplo, hígado, páncreas o músculo).

Las células mucosales incluidas en la invención incluyen células que responden a un nutriente, que incrementan la

expresión (por ejemplo, vía un elemento de control de la expresión regulable por un nutriente) o la secreción de la proteína (por ejemplo, segregan una proteína sintetizada en respuesta a una señal o estímulo, es decir, un "secretagogo").

5 Los nutrientes incluidos son compuestos ingeribles naturales y no naturales, tales como un azúcar, grasa, hidrato de carbono o almidón, un aminoácido o polipéptido, un triglicérido, una vitamina, un mineral, o celulosa. Los elementos regulables por un nutriente incluyen un promotor endocrino del intestino, tal como un promotor del polipéptido insulino-trópico dependiente de la glucosa (GIP). Los elementos regulables por un nutriente incluyen sus variantes funcionales (por ejemplo, mutación de punto), o una subsecuencia funcional de un elemento regulable de longitud completa (secuencia suprimida). Los elementos de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína pueden incluir además un vector (por ejemplo, un vector vírico).

15 Las células mucosales incluidas en la invención se obtienen de un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, ser humano), se obtienen de un tejido u órgano del tubo digestivo, o derivan de una estirpe celular cultivada de origen intestinal. Los tejidos ejemplares en los que se pueden obtener células mucosales incluyen el tubo digestivo, el intestino grueso o delgado (yeyuno, duodeno), estómago, esófago, tejido bucal o de la boca. Las células mucosales también incluyen las que se pueden adaptar o están adaptadas para el crecimiento en la mucosa, incluso durante períodos cortos de tiempo. Las células mucosales incluyen células endocrinas y no endocrinas, células K, células madre, células L, células S, células G, células D, células I, células Mo, células Gr y células enteroendocrinas.

20 Las composiciones y métodos de la invención incluyen proteínas terapéuticas tales como insulina, leptina, GLP-1, GLP-2, colecistocinina, un antagonista de glucagón, grelina, hormonas del crecimiento, factores de coagulación, o anticuerpos.

25 Por lo tanto, la invención también proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un trastorno tratable produciendo una proteína terapéutica en un tejido mucosal. En una realización, un método incluye poner en contacto células mucosales en el sujeto que se han transformado con un polinucleótido, por ejemplo un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica, con un nutriente que induce la producción de la proteína en una cantidad efectiva para tratar el trastorno.

30 Las afecciones y trastornos tratables con los métodos y composiciones de la invención incluyen afecciones hiperglucémicas, tales como diabetes insulino-dependiente e insulino-independiente, o en las que los niveles de glucosa plasmáticos en ayunas son superiores a 110 mg/dl, obesidad o un índice de masa corporal indeseable.

35 Por lo tanto, la invención también proporciona modelos animales y genéticos. En una realización, se proporciona un animal transgénico no humano que produce una proteína terapéutica (por ejemplo, insulina) en un tejido mucosal. En un aspecto, la producción de proteína terapéutica no se produce de forma natural en el tejido mucosal del animal, es conferida por un transgén presente en el tejido mucosal, y el transgén incluye un polinucleótido que incluye un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína, en el que la producción de la proteína en el tejido mucosal del animal es sensible al nutriente. En un aspecto, la proteína comprende insulina. Por lo tanto, el animal transgénico se puede hacer resistente a desarrollar una afección hiperglucémica. Por lo tanto, se puede obtener un animal transgénico que tenga o que esté en riesgo de tener una afección hiperglucémica para que tenga menos glucosa o menos probabilidad de desarrollar hiperglucemia. En otro aspecto, el animal es un ratón (por ejemplo, un ratón diabético o hiperglucémico u obeso). En todavía otro aspecto, el elemento de control de la expresión que confiere expresión comprende un elemento regulable por un nutriente, una variante funcional del mismo, o una subsecuencia funcional del mismo. En todavía otro aspecto, el elemento de control de la expresión incluye un promotor inducible por glucosa, por ejemplo un promotor de polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP). La expresión de la proteína en el animal se puede conferir en el tubo digestivo, intestino/duodeno, estómago. Las células o tejidos del animal transgénico que producen insulina en respuesta al nutriente se pueden aislar. Las células que expresan proteína y también se pueden aislar incluyen células K, células madre y células endocrinas o no endocrinas.

55 Los detalles de una o varias realizaciones de la invención se exponen en los dibujos que se acompañan y en la descripción más abajo. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán manifiestos a partir de la descripción y dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

60 La figura 1 muestra una visualización de la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) dirigida por el promotor de GIP en células endocrinas intestinales derivadas de tumor, STC-1. El panel izquierdo muestra una población de campo brillante de muestras de células. El mismo campo se observa en el panel derecho bajo fluorescencia, permitiendo la identificación de las células que expresan GFP. Los racimos de células fluorescentes se seleccionaron y expandieron en cultivo para generar la estirpe de células K, GTC-1.

65 La figura 2 es un análisis de transferencia Northern representativo de ARNm de GIP en células STC-1 y GTC-1, que muestra que GTC-1 es una población muy enriquecida en células K que producen GIP.

- 5 La figura 3 es una vista esquemática del constructo plasmídico GIP/Ins usado para llevar a cabo la expresión de insulina humana en células K. Contiene la secuencia genómica del gen de insulina humana operativamente enlazado al promotor de GIP (~2,5 kb de la secuencia reguladora de 5' del gen de GIP. Los tres exones se representan mediante cajas negras (E1, 2 y 3). Se indican las posiciones de los cebadores usados para la detección mediante RT-PCR de ARNm de proinsulina. Se muestran los sitios Hind III (H), Pvu II (P) y Xho I (X). Se indican las posiciones de los codones de partida (ATG) y parada.
- 10 La figura 4 muestra la expresión de enzimas procesadoras de proinsulina e insulina humanas en células K derivadas de tumor. El panel superior muestra el análisis mediante RT-PCR de ADNc procedente de islotes humanos (H) y células GTC-1 transfectadas (T) o no transfectadas (UT) con el plásmido GIP/Ins. Las muestras se prepararon con (+) o sin (-) transcriptasa inversa. El panel inferior muestra el análisis de inmunotransferencia de la expresión de proproteína convertasas PC1/3 y PC2 en células GTC-1 y una estirpe de células β (INS-1). La flecha indica el tamaño predicho del producto para las isoformas de PC1/3 (64 y 82 kD) y las isoformas de PC2 (66 y 75 kD).
- 15 La figura 5 muestra los niveles de insulina humana y de péptido C detectados en medios de cultivo procedentes de células GTC-1 transfectadas (T) o no transfectadas (UT) con el constructo de GIP/Ins. La insulina y el péptido C están indicados, respectivamente, por barras en blanco y en negro.
- 20 La figura 6 es una gráfica que muestra el efecto estimulante de la glucosa sobre la secreción de insulina a partir de células GTC-1 transfectadas de forma estable con el plásmido de GIP/Ins.
- La figura 7 muestra la coexpresión de glucocinasa (GK, rojo) y GIP (verde) en secciones duodenales de ratón.
- 25 La figura 8 muestra la transferencia Southern genómica y la identificación mediante PCR de líneas fundadoras transgénicas. Los números de los ratones se indican en la parte superior.
- La figura 9 muestra la expresión de insulina humana en células K en ratones transgénicos que poseen el constructo de GIP/Ins. El panel superior muestra un análisis de transferencia Northern representativo para la expresión del gen de insulina humana en islotes humanos, duodeno de control (ratón) y tejidos de ratón transgénico. El panel inferior muestra el análisis mediante RT-PCR de ADNc procedente de islotes humanos (H), islotes de ratón (M) y muestras de duodeno (D) procedentes de dos ratones transgénicos, usando cebadores de proinsulina específicos humanos o de ratón. Las muestras se prepararon en presencia (+) o ausencia (-) de transcriptasa inversa. \emptyset indica que no hay ADN, y M indica marcadores.
- 30 La figura 10 muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica para insulina humana en secciones de estómago (panel izquierdo) y duodeno (panel central) de un ratón transgénico. Las flechas indican células inmunorreactivas a insulina humana. El panel derecho muestra secciones duodenales del mismo animal examinadas mediante microscopía de inmunofluorescencia tras la cotinción con antisueros específicos para insulina (INS, verde), y GIP (rojo).
- 35 La figura 11A es una gráfica que muestra que la producción de insulina humana procedente de células K del intestino de ratones transgénicos está regulada por las comidas.
- 40 La figura 11B es una gráfica que muestra la cinética de liberación de insulina humana a partir de células K del intestino de animales transgénicos en respuesta a un ensayo de comida y exposición a glucosa oral mixtos.
- La figura 12 es una gráfica que muestra los cambios de concentración de glucosa en sangre en ratones de control normales, ratones de control tratados con estreptozotocina (STZ) y ratones transgénicos tratados con STZ tras una exposición a glucosa oral (1,5 g de glucosa/kg de peso corporal).
- 45 La figura 13 es una serie de micrografías que muestran la tinción inmunohistoquímica para insulina de ratón en secciones pancreáticas procedentes de ratones de control y ratones transgénicos tratados con STZ. Las flechas indican los islotes.
- 50 La figura 14 son secuencias nucleotídicas de regiones del promotor de GIP de rata y del promotor del gen de cromagranina A de ratón.
- 55 La figura 15 son secuencias nucleotídicas del promotor y del exón 1 de secretogranina II de ratón (nº de acceso AF037451) y una porción de 5' del promotor del gen de glucocinasa de ratón (nº de acceso U93275).
- 60 La figura 16 son secuencias nucleotídicas de una porción de 3' del promotor del gen de glucocinasa de ratón (nº de acceso U93275), de la región del promotor del gen de adenosina desaminasa humana (nº de acceso X02189); y la secuencia de aminoácidos de pre-proinsulina humana, y 60 pb de una región de 5' de pre-proinsulina.
- 65 La figura 17 son secuencias nucleotídicas de la porción de 3' restante de pre-proinsulina humana y una porción de 5'

del ADNc del gen de leptina humana.

La figura 18 son secuencias nucleotídicas de la porción de 3' restante de leptina humana, secuencias de aminoácidos y nucleotídica de CCK humana y 60 pb del promotor de CCK de rata.

La figura 19 son secuencias nucleotídicas de la porción de 3' restante del promotor de CCK de rata y secuencias de aminoácidos y nucleotídica de la hormona del crecimiento humana.

La figura 20 es la secuencia para el promotor de GIP de rata desde -1 hasta -1894 pb.

Descripción detallada

La invención se basa, en parte, en la producción seleccionada de una proteína en un tejido de animales a niveles suficientes para proporcionar terapia. Más específicamente, la invención incluye métodos para llevar a cabo selectivamente la expresión de cualquier proteína de interés en células endocrinas en el tubo digestivo de un sujeto de manera que la proteína se libera en el torrente sanguíneo del sujeto de manera regular. Se pueden usar constructos genéticos incluyen un elemento de control de la expresión (por ejemplo, un promotor) que dirige la expresión génica a las células endocrinas del intestino, enlazado operativamente a ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica. Cuando el constructo génico se incorpora en las células endocrinas, la proteína codificada se expresará y segregará de manera regulada. Las células endocrinas transformadas, que expresan la proteína codificada por el ácido nucleico de interés, pueden segregar una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína en el torrente sanguíneo del sujeto al alimentar una sustancia (por ejemplo, un nutriente) que incrementa la producción de la proteína.

El suministro de un constructo genético compuesto de un promotor de GIP enlazado operativamente a un gen de insulina humana en ratones dirige con éxito la expresión y secreción de insulina humana mediante células K en el tubo digestivo de la progenie transgénica. Además, la producción de insulina humana en los animales transgénicos estuvo regulada por las comidas. La cantidad de insulina segregada por las células fue suficiente para proteger a los animales transgénicos del desarrollo de diabetes tras la destrucción de las células β pancreáticas. La producción de insulina también fue suficiente para proporcionar una homeostasis normal de la glucosa. De este modo, la introducción de un gen que codifica proteínas terapéuticas, tales como insulina, en células endocrinas reguladas por las comidas en el intestino de un animal, ya sea mediante métodos *in vivo* o *ex vivo* (por ejemplo, transplantando *in vitro* en un animal células transformadas que segregan insulina), se puede usar para tratar trastornos tratables mediante la producción de una proteína.

Según la invención, se proporcionan métodos para generar una célula mucosal que produce una proteína regulable mediante un nutriente. Un método de la invención incluye poner en contacto una célula mucosal con un polinucleótido que comprende un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica una proteína en condiciones que permitan la transformación, e identificar una célula transformada que produce la proteína de una manera regulable por un nutriente. En una realización, la célula mucosal se pone en contacto con el polinucleótido *in vivo*. En otra realización, la célula mucosal se pone en contacto con el polinucleótido *in vitro*. En todavía otra realización, la célula mucosal puesta en contacto con el polinucleótido *in vitro* es adecuada para el trasplante en un animal. En realizaciones adicionales, la célula mucosal es una célula endocrina (por ejemplo, una célula K), o una célula no endocrina. En todavía realizaciones adicionales, la célula mucosal es una célula madre o una célula progenitora pluripotente o multipotente.

En otra realización, un constructo de expresión de ácido nucleico usado en la invención se diseña para la producción selectiva de proteínas en células endocrinas gastrointestinales. El constructo contiene un elemento de control de la expresión enlazado operativamente a secuencias de ácido nucleico deseadas. Los elementos de control de la expresión incluyen promotores capaces de dirigir la expresión de un ácido nucleico enlazado de interés hacia células endocrinas en el intestino. La introducción de constructos en células diana se puede llevar a cabo por métodos convencionales bien conocidos en la técnica (choque osmótico (por ejemplo, fosfato de calcio), electroporación, vectores víricos, vesículas o vehículos lipídicos (por ejemplo, lipofección), microinyección directa, etc.).

Típicamente, la transformación celular emplea un vector. El término "vector" se refiere a, por ejemplo, un plásmido, virus, tal como un vector vírico, u otro vehículo conocido en la técnica que se puede manipular mediante inserción o incorporación de un polinucleótido, para manipulación genética (es decir, "vectores de clonación"), o que se puede usar para transcribir o traducir el polinucleótido insertado (es decir, "vectores de expresión"). Tales vectores son útiles para introducir polinucleótidos, incluyendo un elemento de control de la expresión regulable mediante un nutriente en enlace operativo con un ácido nucleico, y expresar en células *in vitro* o *in vivo* la proteína antisentido o codificada transcrita o codificada.

Un vector contiene generalmente al menos un origen de replicación para la propagación en una célula. Se incluyen elementos de control, incluyendo elementos de control de la expresión (por ejemplo, regulables por un nutriente) tal como se expone en la presente memoria, presentes en un vector, para facilitar la transcripción y la traducción. La expresión "elemento de control" pretende incluir, como mínimo, uno o varios componentes cuya presencia puede

influir en la expresión, y puede incluir componentes distintos de o además de promotores o potenciadores, por ejemplo secuencias líder y secuencias de parejas de fusión, sitios de unión al ribosoma internos (IRES), elementos para la creación de mensajes multigénicos o policistrónicos, una señal de corte y empalme para intrones, el mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción en el marco de ARNm, una señal de poliadenilación para proporcionar una poliadenilación apropiada del transcrito de un gen de interés, codones de parada, entre otros.

Los vectores pueden incluir un marcador de selección. Como se sabe en la técnica, "marcador de selección" o equivalentes significa genes que permiten la selección de células que contienen el gen. "Selección positiva" se refiere a un proceso mediante el cual sólo las células que contienen el marcador de selección positiva sobrevivirán al exponerlas al agente de selección positiva, o se marcarán. Por ejemplo, la resistencia a fármacos es un marcador de selección positiva habitual; las células que contienen el marcador de selección positiva sobrevivirán en medio de cultivo que contenga el fármaco de selección, y las que no contengan el gen de resistencia morirán.

Los genes de resistencia a fármacos adecuados son *neo*, que confiere resistencia a G418, o *hygr*, que confiere resistencia a higromicina, o *puro*, que confiere resistencia a puromicina, entre otros. Otros genes marcadores de selección positiva incluyen genes que permiten la clasificación o el cribado de células. Estos genes incluyen genes para proteínas fluorescentes, el gen lacZ, el gen de fosfatasa alcalina, y marcadores de superficie tales como CD8, entre otros.

Los vectores incluidos en la invención pueden contener marcadores de selección negativa. La "selección negativa" se refiere a un proceso mediante el cual las células que contienen un marcador de selección negativa son exterminadas al exponerlas a un agente de selección negativa apropiado que extermina las células que contienen el marcador de selección negativa. Por ejemplo, las células que contienen el gen de timidina cinasa del virus del herpes simple (*HSV-tk*) son sensibles al fármaco ganciclovir (GANC). De forma similar, el gen *gpt* hace a las células sensibles a 6-tioxantina.

Los vectores incluidos son los basados en vectores víricos, tales como el virus 40 de simios (SV40) o el virus del papiloma bovino (BPV), que tiene la capacidad de replicarse como elementos extracromosómicos (Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982; Sarver *et al.*, Mol. Cell. Biol. 1:486 (1981)). Los vectores víricos incluyen genomas retrovíricos, virus adenoasociados, adenovirus, reovirus, lentivirus, rotavirus, etc., modificados para introducir y dirigir la expresión de un polinucleótido o transgén en células mucosales (Cone *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349 (1984)).

Los "elementos de control de la expresión" incluyen polinucleótidos, tales como promotores y potenciadores, que influyen en la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente. Los elementos de control de la expresión y los promotores incluyen los activos en un tejido o tipo celular particular, denominados en este caso como "elementos de control de la expresión/promotores específicos de tejidos". Los elementos de control de la expresión específicos de tejidos son típicamente activos en célula o tejido específico, debido a que son reconocidos por proteínas activadoras transcripcionales, u otros reguladores de la transcripción, que son únicos para una célula específica o tipo de tejido.

Una clase particular de un promotor específico de tejidos es un "promotor específico de células endocrinas del intestino", un promotor que lleva a cabo la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente en una célula endocrina del intestino. El promotor de GIP es un ejemplo específico de un promotor de célula endocrina del intestino. El promotor de GIP incluye múltiples secuencias reguladoras que confieren expresión específica en el tubo digestivo (Tseng, C.C. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1992 (1993); Yeng, C.M., *et al.* Mol. Cell. Endocrinol. 154:161 (1999)). Un promotor de GIP, de tamaño de aproximadamente 2,5 Kb (-1 a ~ -2500 pb) de longitud, dirigió la expresión del transgén hacia el estómago y el duodeno (figura 9 y 10). Un promotor de GIP más corto (-1 a ~ -1200 pb) confirió expresión del transgén en el estómago, pero no en el duodeno, y no pudo dirigir la expresión del transgén hacia el páncreas (Yeng, C.M., *et al.* Mol. Cell. Endocrinol. 154:161 (1999)). La secuencia reguladora entre -1200 a -2500 pb parece por lo tanto necesaria para dirigir la expresión del transgén hacia células en el intestino productoras de GIP.

La caracterización de elementos transcripcionales en el promotor de GIP reveló dos cajas TATA (-27 a -23 y -115 a -111) y dos cajas similares a CCAAT (-158 a -154 y -170 a -167), sitios potenciales de AP-1 y AP-2, elementos de respuesta a AMPc (CRE), y un elemento de respuesta a insulina (IRE) potencial en dirección 5' del sitio de partida de la transcripción putativo. También se han identificado dos motivos de unión de GATA putativos en el promotor de GIP (-178 a -172 (GATA proximal); CAGATAC y -190 a -184 (GATA distal); CAGATAA) que conforman la secuencia del motivo de unión de GATA de consenso, (A/T)GATA(A/G). Las mutaciones específicas en los motivos de GATA distal y proximal del promotor de GIP dieron como resultado aproximadamente 90% y 35% de reducción en la actividad del promotor de GIP respectivamente, como se evalúa mediante la expresión del informador de luciferasa (Boylan *et al.*, J. Biol. Chem. 273:17438 (1997)). Sin embargo, un promotor de GIP con ambos motivos de GATA mutados se comportó de la misma manera que el promotor con sólo el motivo de GATA distal alterado. De este modo, un promotor de GIP que contiene una o varias de las secuencias nucleotídicas mencionadas anteriormente, o variantes, es un ejemplo de una subsecuencia que puede retener la expresión regulable por glucosa o específica de

tejidos (intestino) de un ácido nucleico enlazado operativamente. Tales subsecuencias y variantes se pueden usar para conferir *in vitro* o *in vivo* la expresión regulable por glucosa o específica de la célula de un ácido nucleico enlazado operativamente.

5 Un ejemplo adicional de un elemento de control específico de tejidos es el promotor del gen de proglucagón. Similar al promotor de GIP, el promotor de proglucagón tiene múltiples secuencias de control que confieren expresión en el tubo digestivo o el cerebro y el páncreas (Lee, Y.C., *et al.* J. Biol. Chem. 267:10705 (1992); Gajic y Drucker, Endocrinol. 132:1055 (1993)). Una porción de 1300 pb de la secuencia del promotor de proglucagón de rata en dirección 5' dirigió la expresión de un transgén en el cerebro y en el páncreas, pero no en el tubo digestivo (Efrat S., et. al. Neuron 1:605 (1988)). Un promotor del gen de proglucagón más largo (-1 a ~ -2000 pb) dirigió la expresión del transgén en el intestino, además de en el cerebro y el páncreas (Lee, Y.C., *et al.* J. Biol. Chem. 267:10705 (1992)). De este modo, la porción que confiere expresión en el intestino parece estar en una región de 700 pb del promotor localizada entre 1300 y 2000 pb en dirección 5' del gen de proglucagón.

15 En la Tabla 1 se enumeran elementos de control de la expresión adicionales específicos de tejidos que se pueden emplear para dirigir la expresión del ácido nucleico de interés en células endocrinas del intestino. Muchos de estos promotores también son elementos regulables por un nutriente. Por ejemplo, el promotor de GIP incluye una secuencia reguladora múltiple que confiere expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente en respuesta a nutrientes.

20 Esta lista no pretende ser exhaustiva de todos los elementos de control de la expresión posibles útiles para dirigir la expresión génica en células endocrinas del intestino, sino simplemente pretende ser ejemplar.

25 Aunque los elementos de control de la expresión específicos de tejidos pueden ser activos en otro tejido, por ejemplo un elemento de control de la expresión específico del intestino puede ser activo en un tejido no intestinal, la expresión es significativamente inferior a aquella en el tejido del intestino (por ejemplo, para tejido no intestinal es 6-10 veces menor que en un tejido intestinal). El suministro dirigido de un vector a tejido intestinal puede limitar la posibilidad de la expresión en cualquier otra parte en el cuerpo (por ejemplo, en tejidos no diana). En consecuencia, los elementos específicos de tejidos incluidos en este caso no necesitan tener una especificidad absoluta de la expresión por el tejido.

TABLA 1

Promotores y potenciadores ejemplares para dirigir la expresión de proteínas a células endocrinas en el intestino

Glucocinasa
 Cromogranina A y B
 Colecistocinina
 Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
 Proglucagón
 Adenosina desaminasa
 Secretina
 Gastrina
 Somatostatina
 Motilina
 Grelina

35 Los elementos adicionales de control de la expresión pueden conferir expresión de una manera que sea regulable, esto es, una señal o estímulo incrementa o disminuye la expresión del ácido nucleico enlazado operativamente. Un elemento regulable que incrementa la expresión del ácido nucleico enlazado operativamente en respuesta a una señal o estímulo también se denomina como un "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal, por ejemplo, un nutriente). Un elemento regulable que disminuye la expresión del ácido nucleico enlazado operativamente en respuesta a una señal o estímulo se denomina "elemento reprimible" (es decir, la señal disminuye la expresión, de manera que cuando la señal se elimina o está ausente, se incrementa la expresión). Típicamente, la cantidad de incremento o disminución conferida por tales elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulo presente; cuanto mayor es la cantidad de señal o estímulo, mayor es el incremento o disminución en la expresión.

45 Un ejemplo particular de un elemento de control de la expresión regulable es un elemento que incrementa o disminuye la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente en respuesta a o con la retirada de un nutriente, en cuyo caso el elemento se denomina "elemento regulable por un nutriente". Un elemento inducible o reprimible por un nutriente generalmente proporciona niveles iniciales de transcripción (es decir, niveles de expresión en ausencia de un estímulo o señal). Típicamente, los niveles iniciales de transcripción son mayores para un elemento reprimible que para un elemento inducible.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "nutriente" significa cualquier material ingerible o consumible tal como el presente en el alimento o bebida. Puesto que hay muchas, quizá miles de millones de diferentes

sustancias orgánicas e inorgánicas presentes en el alimento o bebida, el término se usa ampliamente en la presente memoria. Los ejemplos particulares de nutrientes incluyen azúcares (por ejemplo, glucosa, lactosa, sacarosa, fructosa, manosa, etc.), hidratos de carbono, almidones, grasas (saturadas o insaturadas), lípidos, ácidos grasos, triglicéridos, polipéptidos, aminoácidos, celulosa, hormonas, vitaminas, y minerales.

5 Los nutrientes también pueden modular la traducción o estabilidad de una proteína. Por lo tanto, “regulable por un nutriente” incluye situaciones en las que el nutriente modula la transcripción, traducción del transcrito en proteína, o estabilidad de la proteína, incrementando o disminuyendo de este modo la cantidad de transcrito o de proteína.

10 Un elemento de control de la expresión puede ser “constitutivo”, de manera que la transcripción del ácido nucleico enlazado operativamente se produce sin la presencia de una señal o estímulo. Adicionalmente, los elementos de control de la expresión también incluyen elementos que confieren expresión en una etapa particular del ciclo o diferenciación celular. En consecuencia, la invención incluye además elementos de control de la expresión que confieren una expresión constitutiva, regulable (por ejemplo, regulable por un nutriente), específica de tejidos, específica del ciclo celular, y específica de la etapa de diferenciación.

15 Los elementos de control de la expresión incluyen secuencias de longitud completa, tales como elementos promotores y potenciadores nativos, así como subsecuencias o variantes polinucleotídicas que retienen toda o parte de la función de longitud completa o no variante (por ejemplo, retienen cierta cantidad de expresión regulable por un nutriente o específica de células). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “funcional” y sus variantes gramaticales, cuando se usa en referencia a una secuencia, subsecuencia o fragmento de ácido nucleico o de polipéptido, o una variante de una secuencia nucleotídica o de aminoácidos, significa que la secuencia tiene una o varias funciones de la secuencia de ácido nucleico o polipeptídica nativa (por ejemplo, secuencia no variante o no modificada). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “variante” significa una sustitución (nucleotídica o de aminoácidos) (por ejemplo, mutación de punto), supresión (interna o externa) o adición (por ejemplo, polipéptido quimérico) de una secuencia, u otra modificación de mutación de punto (por ejemplo, derivados químicos tales como formas modificadas resistentes a proteasas o nucleasas). Típicamente, Las variantes de aminoácidos tienen unos pocos o varios cambios de aminoácidos (por ejemplo, 1 a 10, 10 a 20, 20 a 50), tal como una o varias sustituciones conservativas de aminoácidos, o sustituciones no conservativas de aminoácidos fuera de los dominios críticos para la funcionalidad que se desea retener en la variante (por ejemplo, para insulina, una función reductora de la glucosa).

20 Los elementos de control de la expresión, tales como elementos regulables por un nutriente, también incluyen variantes funcionales, o subsecuencias. Por ejemplo, una subsecuencia de un promotor de GIP de ~2,5 Kb (por ejemplo, 2 Kb, 1 Kb, 0,5 Kb, 0,25 Kb, 0,20 Kb, 100 pb o menos) regulable por glucosa puede retener la expresión regulable por glucosa o específica de tejidos (intestino o páncreas o cerebro) de un ácido nucleico enlazado operativamente. Los dominios funcionales de diversos promotores que tienen propiedades conocidas se pueden configurar para optimizar las cantidades y patrones de expresión del ácido nucleico enlazado operativamente.

35 Los elementos de control de la expresión incluidos en la presente memoria pueden proceder de bacterias, levadura, planta, o animal (mamífero o no mamífero), en tanto que funcionen para conferir el control de la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente. De este modo, cualquier elemento de control de la expresión inducido por una sustancia o estímulo (por ejemplo, nutriente) procedente de cualquier organismo se puede usar para modular la transcripción de un ácido nucleico enlazado operativamente en una célula mucosal, y, según sea apropiado, la traducción de la proteína codificada en respuesta a la sustancia o estímulo, como se expone en la presente memoria.

40 Los elementos de control de la expresión regulables por un nutriente existen, por ejemplo, como promotores que regulan la expresión de enzimas implicadas en la glucólisis, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de hidratos de carbono y el metabolismo del colesterol (por ejemplo, esteroides), que son modulados por azúcares, grasas, hidratos de carbono y colesterol, respectivamente, y son aplicables en la invención. Los ejemplos particulares de elementos de control regulables por un nutriente son elementos inducibles por glucosa, que conducen la expresión de L-piruvato cinasa, acetil-CoA-carboxilasa, spot-14, ácido graso sintasa, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, fosfoenol-piruvato carboxicinasa, glucosa-6-fosfatasa y fosfofructocinasa (véase, también, por ejemplo, Rutter, GA *et al.*, News Physiol Sci. 15:149 (2000)). Otro ejemplo de un elemento de control regulable por un nutriente es el elemento regulador del gen de la alcohol-deshidrogenasa. Todavía otro ejemplo de un elemento de control regulable por un nutriente es el elemento de respuesta a vitamina D, que confiere expresión en presencia de vitamina D. El promotor del gen de metalotioneína de mamífero es un elemento de control de la expresión inducible por metales. Al igual que con los elementos de control específicos de tejidos, los elementos de control regulables por un nutriente pueden ser sensibles a múltiples nutrientes. Por ejemplo, un elemento inducible por glucosa puede ser sensible a lactosa. Por lo tanto, un nutriente particular (por ejemplo, glucosa) no es exclusivo de otros nutrientes, por cuanto otros nutrientes pueden modular la actividad (incrementar o disminuir), en menor grado, del elemento de control.

50 Un ejemplo de un elemento de control de la expresión bacteriano regulable por un nutriente es el represor lac, que es inducible por beta-galactósidos. Un ejemplo de un elemento de control de la expresión de levaduras regulable por un nutriente es el promotor gal presente en los genes GAL1 y GAL10, que confiere expresión inducible por

galactosa. Estos elementos pueden estar enlazados operativamente a un ácido nucleico y se pueden introducir en una célula mucosal con el fin de conferir la producción, regulable por un nutriente, de la proteína codificada.

5 Los elementos de control de la expresión adicionales incluidos son los que son sensibles a no nutrientes. Los ejemplos particulares son sustancias químicas o fármacos que son oralmente activos pero no se encuentran normalmente en el alimento. El fármaco o sustancia química no nutriente, cuando se consume, estimula la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente a un elemento de control de la expresión no nutriente. La ingestión de cantidades específicas de la sustancia química o fármaco proporciona control de la cantidad de ácido nucleico o proteína producida (vía transcripción o secreción). Por ejemplo, cuando un elemento de control de la expresión inducible por un fármaco confiere expresión de un ácido nucleico que codifica insulina, se pueden producir mayores cantidades de insulina en el intestino incrementando la cantidad de fármaco consumido. En las patentes US nº 5.989.910; nº 5.935.934; nº 6.015.709; y nº 6.004.941, por ejemplo, se pueden encontrar ejemplos particulares de tales sistemas de control de la expresión no nutrientes.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "enlazamiento operativo", o sus variaciones gramaticales, se refiere a una yuxtaposición física o funcional de los componentes así descritos para permitirles funcionar en su manera pretendida. En el ejemplo de un elemento de control de la expresión en enlazamiento operativo con un ácido nucleico, la relación es tal que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico.

20 El control de la expresión se puede efectuar a nivel de la transcripción, traducción, corte y empalme, estabilidad de los mensajes, etc. Típicamente, un elemento de control de la expresión que modula la transcripción se yuxtapone cerca del extremo de 5' del ácido nucleico transcrito (es decir, "en dirección 5'"). Los elementos de control de la expresión también pueden estar localizados en el extremo de 3' de la secuencia transcrita (es decir, "en dirección 3'"), o dentro del transcrito (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de la expresión se pueden localizar a una distancia lejos de la secuencia transcrita (por ejemplo, 100 a 500, 500 a 1000, 2000 a 5000, o más nucleótidos desde el ácido nucleico). La expresión del ácido nucleico enlazado operativamente es al menos en parte controlable mediante el elemento (por ejemplo, promotor) de manera que el elemento modula la transcripción del ácido nucleico y, según sea apropiado, la traducción del transcrito. Un ejemplo específico de un elemento de control de la expresión es un promotor, que habitualmente está situado 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de la expresión es un potenciador, que puede estar situado en 5', 3' de la secuencia transcrita, o dentro de la secuencia transcrita.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "produce" o "producción", cuando se usa en referencia a una proteína expresada por una célula o tejido mucosal, significa la expresión o secreción de la proteína por una célula mucosal. De este modo, cuando una célula mucosal produce una proteína en respuesta a una señal o estímulo, tal como un nutriente, la expresión o secreción de la proteína aumenta con respecto a la cantidad previa a la señal o al estímulo. La producción de una proteína mediante la célula o tejido mucosal puede ser debida a un aumento de la transcripción del ácido nucleico, de la traducción del transcrito, de la estabilidad del transcrito o proteína, o de la secreción de la proteína codificada. Típicamente, la secreción de una proteína por una célula, incrementada por una señal o estímulo (es decir, un secretagogo), estimula la liberación de una proteína ya traducida en la célula. Las proteínas cuya secreción está regulada se almacenan típicamente en vesículas secretoras dentro de células endocrinas.

45 Como alternativa, la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica la proteína, y la secreción subsiguiente de la proteína traducida, se pueden incrementar mediante una señal o estímulo. De este modo, en el ejemplo de una célula no endocrina, una señal o estímulo (por ejemplo, nutriente) puede estimular la transcripción de ácido nucleico que codifica la proteína (por ejemplo, insulina), vía un elemento de control de la expresión inducible por un nutriente, y la célula segregará subsiguientemente la proteína codificada tras su traducción. En el ejemplo de una célula endocrina, tal como una célula endocrina del intestino (por ejemplo, célula K, célula L, etc.), el elemento de control de la expresión usado para conferir expresión de la proteína puede o no ser regulable, pero en cualquier caso una señal o estímulo regulará típicamente la secreción de la proteína desde la célula. En este caso, la señal o estímulo funciona como un secretagogo que estimula o incrementa la secreción de una proteína. Por lo tanto, en células endocrinas, tanto si la expresión es regulable o no por un nutriente (por ejemplo, un promotor constitutivo), la producción de la proteína por la célula es regulable por el nutriente debido a que la secreción de la proteína está modulada por el nutriente. En consecuencia, "regulable por un nutriente" también se refiere a un nutriente que modula la secreción de una proteína a partir de una célula.

60 La secreción incrementada de una proteína por una célula endocrina en respuesta a una señal o estímulo proporciona una respuesta más rápida a la señal o estímulo en comparación con una proteína producida incrementando la transcripción de un ácido nucleico que codifica la proteína y la secreción subsiguiente, como en una célula no endocrina. Por el contrario, en una célula no endocrina, una señal o estímulo, tal como un nutriente, puede incrementar la transcripción de un ácido nucleico que codifica una proteína, y la proteína traducida es segregada subsiguientemente por la célula sin la necesidad de una señal o estímulo (por ejemplo, nutriente). De este modo, para una célula mucosal no endocrina transformada con un transgén regulable por un nutriente, la transcripción del transgén será inducible por el nutriente, pero la secreción no necesita el nutriente.

El ácido nucleico puede codificar un polipéptido terapéutico, tal como insulina, un antagonista de glucagón, leptina, GLP-1 o colecistocinina. Por ejemplo, una subsecuencia de insulina de longitud completa que retiene cierta capacidad para reducir la glucosa, proporciona homeostasis normal de la glucosa, o reduce los estados histopatológicos asociados con hiperglucemia crónica o aguda *in vivo*, es sólo un ejemplo de una subsecuencia funcional que tiene una o varias actividades de su contraparte de su longitud completa. De forma similar, una subsecuencia o variante de leptina o CCK o una hormona del crecimiento, factor de coagulación o anticuerpo, que retiene toda o parte de la capacidad para suprimir el apetito o inducir estabilización del peso o pérdida de peso, estimular el crecimiento, disminuir el tiempo de coagulación o episodios de hemorragia, o proporcionar protección pasiva frente a un antígeno extraño (por ejemplo, *H. pylori*), son ejemplos adicionales de una secuencia funcional o variante que se puede expresar en tejido mucosal de un animal para proporcionar beneficio terapéutico.

De este modo, "polipéptidos", "proteínas" y "péptidos", codificados por los "ácidos nucleicos", incluyen secuencias nativas de longitud completa, al igual que con proteínas de origen natural, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencias, en tanto que la subsecuencia, forma modificada o variante retengan cierto grado de funcionalidad de la proteína de longitud completa nativa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "transgén" significa un polinucleótido que se ha introducido en una célula u organismo artificialmente. Por ejemplo, una célula mucosal que tiene un transgén, el transgén se ha introducido mediante manipulación genética o "transformación" de la célula. Una célula o progenie de la misma en la que se ha introducido el transgén se denomina "célula transformada" o "transformante". Típicamente, el transgén está incluido en la progenie del transformante, o se convierte en parte del organismo que se desarrolla a partir de la célula. Los transgenes se pueden insertar en el ADN cromosómico, o se pueden mantener como un plásmido autorreplicante, YAC, minicromosoma, o similar.

Los transgenes incluyen cualquier gen que es transcrito en un antisentido o codifica un polipéptido. Los polipéptidos particulares codificados por transgenes incluyen proteínas detectables, tales como luciferasa, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde (para la detección *in vivo* no invasiva), cloranfenicolacetiltransferasa, o proteínas que son detectables (por ejemplo, inmunológicamente detectables). Las proteínas detectables son útiles para evaluar la eficiencia de la transformación celular (por ejemplo, en la transferencia génica *in vivo*), el éxito de la implantación celular, como se mide mediante supervivencia o proliferación celular, por ejemplo (por ejemplo, tras implantar la célula transformada en la mucosa del animal).

Las proteínas terapéuticas incluyen insulina, un transgén particular útil para tratar una afección hiperglucémica tal como diabetes. La insulina es el modulador hormonal principal del metabolismo de la glucosa, y facilita el transporte de la glucosa desde la sangre hasta órganos metabólicos claves tales como músculo, hígado y grasa. Como se muestra en el Ejemplo III, la producción de insulina en el intestino de ratones transgénicos mediante un transgén de insulina evita la diabetes en los ratones. La insulina es producida en cantidades suficientes para restaurar la tolerancia a la glucosa, y el momento de la liberación de la insulina restaura la homeostasis normal de la glucosa.

Otro ejemplo de un transgén que codifica una proteína terapéutica para tratar una afección hiperglucémica es un antagonista de glucagón. El glucagón es una hormona peptídica producida por las células α en los islotes pancreáticos, y es un regulador importante del metabolismo de la glucosa (Unger R.H. y Orci L. N. Eng. J. Med. 304:1518 (1981); Unger R.H. Diabetes 25:136 (1976)). Al igual que con la insulina, la concentración de glucemia media la secreción de glucagón. Sin embargo, contrariamente a la insulina, el glucagón se segrega en respuesta a una disminución de la glucemia. Por lo tanto, las concentraciones circulantes de glucagón son las más elevadas durante períodos de ayuno, y las más bajas durante una comida. Los niveles de glucagón aumentan para impedir que la insulina promueva el almacenamiento de glucosa y estimular al hígado a liberar glucosa en la sangre. Un ejemplo específico de un antagonista de glucagón es [des-His¹, des-Phe⁶, Glu⁹]glucagón-NH₂. En ratas diabéticas por estreptozotocina, los niveles de glucemia disminuyeron ~37% en 15 minutos de un bolo intravenoso (0,75 μ g/g de peso corporal) de este antagonista de glucagón (Van Tine B.A. et. al. Endocrinology 137:3316 (1996)).

Otro ejemplo de un transgén que codifica una proteína terapéutica para tratar una afección hiperglucémica o masa corporal indeseable (por ejemplo, obesidad) es el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). GLP-1 es una hormona liberada desde las células L en el intestino durante una comida, que estimula a las células β pancreáticas a incrementar la secreción de insulina. GLP-1 tiene actividades adicionales que lo hacen un agente terapéutico atractivo para tratar obesidad y diabetes. Por ejemplo, GLP-1 reduce el vaciamiento gástrico, suprime el apetito, reduce la concentración de glucagón, incrementa la masa de las células β , estimula la biosíntesis y secreción de insulina de una manera dependiente de la glucosa, y probablemente incrementa la sensibilidad del tejido a la insulina (Kieffer T.J., Habener J.F. Endocrine. Rev. 20:876 (2000)). Por lo tanto, la liberación regulada de GLP-1 en el intestino para coincidir con una comida puede proporcionar un beneficio terapéutico para una afección hiperglucémica o una masa corporal indeseable.

Los análogos de GLP-1 que son resistentes a dipeptidil peptidato IV (DPP IV) proporcionan una duración más prolongada de la acción y un valor terapéutico mejorado. De este modo, los transgenes que codifican análogos de GLP-1 con aumento de la duración de la acción se pueden dirigir al intestino usando la invención descrita en la

presente memoria para proporcionar una producción de análogos de GLP-1 regulada por nutrientes, para tratar una afección hiperglucémica o un peso corporal indeseable.

Otro ejemplo de un transgén que codifica una proteína terapéutica para tratar una afección hiperglucémica es un antagonista de la hormona resistina. La resistina es un factor derivado de adipocitos, cuya expresión es elevada en formas de obesidad genéticas e inducidas por la dieta. La neutralización de la resistina circulante mejora la glucemia y la acción de la insulina en ratones obesos. Contrariamente, la administración de resistina en ratones normales altera la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina (Steppan CM et. al. Nature 409:307 (2001)). Por lo tanto, la producción de una proteína que antagonice los efectos biológicos de resistina en el intestino puede proporcionar una terapia efectiva para resistencia a insulina y afecciones hiperglucémicas relacionadas con la obesidad.

Aún otro ejemplo de un transgén que codifica una proteína terapéutica para tratar masa corporal indeseable (por ejemplo, obesidad) o una afección hiperglucémica es leptina. La leptina, aunque producida principalmente por adipocitos, también es producida en cantidades más pequeñas en el estómago de una manera dependiente de las comidas. La leptina transmite información sobre el metabolismo de adipocitos y el peso corporal a los centros del apetito en el cerebro, en el que señala la ingesta reducida de alimentos (promueve la saciedad) e incrementa el gasto de energía corporal. Una única inyección subcutánea diaria de leptina tuvo sólo un molesto efecto sobre la reducción del peso en seres humanos, aunque el tratamiento con leptina da como resultado una disminución profunda de la masa grasa en roedores, así como una reducción en la glucemia (Seufert J. et. al. Proc Natl Acad Sci USA. 96:674(1999). Estudios previos han demostrado que la leptina es degradada rápidamente en la circulación. De este modo, el suministro desde el intestino, de una manera regulada, probablemente potenciará el beneficio clínico de la leptina, reduciendo la ingesta de alimentos y la masa corporal, así como la glucemia.

Aún otro ejemplo de un transgén que codifica una proteína terapéutica para tratar peso corporal indeseable (por ejemplo obesidad) o una afección hiperglucémica es el dominio globular de cabeza C-terminal de la proteína del adipocito relacionada con el complemento (Acrp30). Acrp30 es una proteína producida por adipocitos diferenciados. La administración a ratones de un producto de escisión proteolítica de Acrp30 que consiste en el dominio globular de cabeza conduce a pérdida de peso significativa (Fruebis J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 98:2005 (2001)). Por lo tanto, la expresión dirigida de un transgén que codifica el dominio globular de Acrp30 al intestino puede promover la pérdida de peso.

Todavía otro ejemplo de un transgén que codifica una proteína terapéutica para tratar masa corporal indeseable (por ejemplo, obesidad) es colecistocinina (CCK). CCK es un péptido gastrointestinal segregado a partir del intestino en respuesta a nutrientes particulares en el intestino. La liberación de CCK es proporcional a la cantidad de alimento consumido, y se cree que señala al cerebro para terminar una comida (Schwartz M.W. et. al. Nature 404:661-71 (2000)). En consecuencia, la CCK elevada puede reducir el tamaño de la comida y promover la pérdida de peso o la estabilización del peso (es decir, previene o inhibe aumentos en la ganancia de peso). Por lo tanto, un sistema de suministro de CCK regulado por un nutriente puede proporcionar beneficio terapéutico con el fin de reducir la ingesta de alimentos en las personas.

Ejemplos adicionales de transgenes que codifican proteínas terapéuticas incluyen factores de coagulación, para tratar hemofilia y otros trastornos de la coagulación (por ejemplo, Factor VIII, IX o X); factores de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento, factor 1 del crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento fibroblástico ácidos y básicos, factor β de crecimiento transformante, etc.), para tratar trastornos del crecimiento o síndromes de desgaste; y anticuerpos (por ejemplo, humanos o humanizados), para proporcionar inmunización o protección pasiva de un sujeto frente a antígenos o patógenos extraños (por ejemplo, *H. pylori*), o para proporcionar tratamiento contra el cáncer, artritis o cardiovascular patología.

Los transgenes adicionales que codifican una proteína terapéutica incluyen citocinas, interferones (por ejemplo, interferón (INF), INF- α 2b y 2a, INF- α N1, INF- β 1b, INF-gamma), interleucinas (por ejemplo, IL-1 a IL-10), factor de necrosis tumor (TNF- α , TNF- β), quimiocinas, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), hormonas polipeptídicas, polipéptidos antimicrobianos (por ejemplo, polipéptidos antibacterianos, antifúngicos, antivíricos, y/o antiparasitarios), enzimas (por ejemplo, adenosin desaminasa), gonadotropinas, quimiotactinas, proteínas de unión a lípidos, filgastim (Neupogen), hemoglobina, eritropoyetina, insulintropina, imiglucerasa, sarbramostim, activador de plasminógeno tisular (tPA), urocinasa, estreptocinasa, factor de crecimiento neurítico (NGF), fenilalanina amonio liasa, factor neurítico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento neurítico (NGF), fenilalanina amonio liasa, trombopoyetina (TPO), superóxido dismutasa (SOD), adenosin desamidasa, catalasa, calcitonina, L-asparaginasa endoteliana, pepsina, uricasa, tripsina, quimiotripsina, elastasa, carboxipeptidasa, lactasa, sacarasa, factor intrínseco, calcitonina, hormona similar a la hormona paratiroidea (PTH), CD4 soluble, y anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, Fabs) de los mismos (por ejemplo, ortoclón OKT-e (anti-CD3), anticuerpo monoclonal anti-GPIIb/IIIa).

Los transgenes descritos en la presente memoria son aplicaciones particulares de la invención, pero no pretenden limitarla. A este respecto, el experto podría idear fácilmente transgenes adicionales transcritos en antisentido terapéutico o codificar polipéptidos terapéuticos.

Las células diana incluyen células mucosales o células que no están normalmente presentes en la mucosa, que se pueden adaptar o que se han adaptado para el crecimiento en la mucosa. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “mucosa” o “mucosal”, cuando se usan en referencia a una célula, significan una célula que puede crecer en una mucosa. Las células mucosales incluyen, por ejemplo, las células que se encuentran normalmente en mucosa animal, tales como una célula del intestino (por ejemplo, boca (lengua y tejido bucal), esófago, y estómago, intestino delgado y grueso, recto, ano), el aparato respiratorio, los pulmones y la nasofaringe, y otras cavidades orales (por ejemplo, vagina). De este modo, una célula mucosal se refiere a los diversos tipos celulares que normalmente residen en las regiones mencionadas anteriormente, incluyendo células madre u otras células multipotentes o pluripotentes que se diferencian en los diversos tipos de células mucosales. Los ejemplos particulares de células mucosales incluyen células endocrinas, tales como células K, células L, células S, células G, células D, células I, células Mo, células Gr y células enteroendocrinas. Las células endocrinas se caracterizan generalmente por su capacidad para segregar una proteína sintetizada a la sangre en respuesta a una señal o estímulo (un “secretagogo”). Las células mucosales no endocrinas incluyen células epiteliales que recubren la superficie exterior de la mayoría del tejido mucosal, células del moco, células del vello, células cilíndricas, células estrómicas y células de Paneth. Generalmente no es conocido que las células no endocrinas segreguen una proteína sintetizada a la sangre en respuesta a una señal o estímulo.

El hallazgo de que las células K del intestino pueden funcionar como células sustitutas para producir niveles fisiológicos apropiadamente regulados de insulina en animales indica un modo de terapia para la diabetes, liberando a los sujetos de las inyecciones de insulina y reduciendo o incluso eliminando las complicaciones debilitantes asociadas. Puesto que posiblemente hay miles de millones de células K presentes en el intestino humano (Sandström O., El-Salhy M., Mech. Ageing Dev. 108:39 (1999)), la secreción regulada de insulina a partir de una fracción de estas células puede ser suficiente para lograr el beneficio terapéutico, incluyendo la mejora de los síntomas y complicaciones asociadas con la diabetes.

El intestino es el órgano endocrino más largo en el cuerpo, capaz de producir cantidades ingentes de proteínas, y contiene tejido que se renueva rápidamente, en el que las células en división son accesibles. Las células diana, tales como células K y células madre, están situadas predominantemente en el intestino superior, que es fácilmente accesible a técnicas de terapia génica no invasivas. De este modo, las técnicas no invasivas como formulaciones orales, procedimientos endoscópicos, o un tubo de alimentación modificado, permiten la implementación de vectores que facilitan la integración del transgén en el genoma del hospedante. Ya se han desarrollado vectores que suministran genes a las células del tubo digestivo, incluyendo células madre (Croyle *et al.*, Gene Ther. 5:645 (1998); S.J. Henning, Adv. Drug Deliv. Rev. 17:341 (1997), patentes US n^{os}. 5.821.235 y 6.110.456). Muchos de estos vectores han sido aprobados para estudios con seres humanos. Por lo tanto, las células del intestino, tales como células K, que segregan una proteína, tal como insulina, leptina, antagonista de glucagón, GLP-1, GLP-2, grelina, colecistocinina, hormona del crecimiento, factores de coagulación, anticuerpos, entre otros, de manera regulable, son un medio con el cual tratar la diabetes, obesidad, deficiencia del crecimiento y otros trastornos tratables produciendo una proteína en el tejido mucosal.

En la Tabla 2 se muestra una lista parcial de varios tipos de células endocrinas del intestino, proteínas segregadas por las células en respuesta a nutrientes particulares (“secretagogos”), y las funciones ejemplares. Las proteínas, las células endocrinas y los nutrientes son todos aplicables en la invención.

Tabla 2

PÉPTIDO	TIPO CELULAR	LOCALIZACIÓN CELULAR	FUNCIÓN	SECRETAGOGOS
Gastrina	células G	Antro pilórico (estómago)	Incrementa la secreción de ácidos	Aminoácidos
Somatostatina	Células D	Tubo digestivo	Reduce la liberación del péptido del intestino (inhibidor paracrino)	Ácido intraluminal, ácidos grasos libres, hormonas
Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa	Células K	Intestino delgado superior	Secreción de bicarbonato pancreática, reduce la liberación de ácido gástrico	Ácido, sales biliares, ácidos grasos
Péptido 1 similar a glucagón	Células L	Intestino delgado inferior	Incrementa la secreción de insulina, disminuye la liberación de ácidos gástricos	Glucosa, grasa
Péptido 2 similar a glucagón	Células L	Intestino delgado inferior	Incrementa la proliferación mucosal	Glucosa, grasa
Colecistocinina	Células I	Intestino delgado superior	Incrementa la contracción vesicular y la secreción de enzimas pancreáticas	Aminoácidos, ácidos grasos

Tabla 2 (continuación)

PÉPTIDO	TIPO CELULAR	LOCALIZACIÓN CELULAR	FUNCIÓN	SECRETAGOGOS
Motilina	Células Mo	Intestino delgado superior	Incrementa la movilidad gástrica	Liberación cíclica, comidas
Grelina	Células Gr	Estómago e intestino	Orexigénico	Todavía por elucidar

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “cultivada”, cuando se usa en referencia a una célula, significa que la célula se hace crecer *in vitro*. Un ejemplo particular de tal célula es una célula aislada de un sujeto, y hecha crecer o adaptada para el crecimiento en cultivo tisular. Otro ejemplo es una célula genéticamente manipulada *in vitro*, y transplantada nuevamente en el mismo sujeto o en uno diferente. El término “aislada”, cuando se usa en referencia a una célula, significa una célula que se separa de su entorno *in vivo* de origen natural. Un ejemplo de una célula aislada sería una célula mucosal obtenida de un sujeto tal como un ser humano. Las células “cultivadas” y “aisladas” pueden ser manipuladas manualmente por el hombre, tal como transformadas genéticamente. Estos términos incluyen cualquier progenie de las células, incluyendo células de la progenie que pueden no ser idénticas a la célula progenitora debido a mutaciones que se producen durante la división celular. Los términos no incluyen un ser humano completo.

10 La célula mucosal diana puede estar presente en un tejido u órgano mucosal de un sujeto, tal como el del intestino (por ejemplo, intestino). De este modo, una forma para introducir la proteína en la mucosa de los sujetos para lograr terapia es suministrar intracelularmente un polinucleótido, incluyendo un elemento de control de la expresión, en enlazamiento operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína a células presentes en la mucosa del sujeto. Como alternativa, la célula mucosal se puede aislar de un tejido apropiado de un sujeto, se puede transfectar con el transgén, y se puede introducir (transplantar) en un tejido (mucosal u otro) de un sujeto. De este modo, otra forma para introducir la proteína en el sujeto para lograr terapia es transfectar un polinucleótido, que incluye un elemento de control de la expresión, en enlazamiento operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína en células mucosales cultivadas, y después implantar las células transformadas o progenie en el sujeto.

15 Las células mucosales transfectadas con un transgén incluyen estirpes celulares endocrinas y no endocrinas que crecen en cultivo. Por ejemplo, una célula transformada de origen o estirpe intestinal, tal como una célula STC-1 o GTC-1, se puede implantar en un tejido de un sujeto. Las células mucosales transfectadas con un transgén, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, incluyen células endocrinas (por ejemplo, célula K, célula L, célula G, célula D, célula S, célula I, o célula Mo, célula Gr) y células no endocrinas epiteliales, cilíndricas, estrómicas, vellosas, de Paneth, células madre u otros tipos celulares presentes típicamente en el tejido mucosal de un animal.

20 La célula diana también puede ser una célula no mucosal (endocrina o no endocrina) que puede crecer o se puede adaptar para el crecimiento en la mucosa u otro tejido (incluso durante un tiempo limitado, por ejemplo días o meses). Por ejemplo, una célula se puede obtener de un tejido no mucosal de un sujeto, se puede transformar con un transgén o polinucleótido, y después se puede transplantar en un tejido del sujeto (el mismo sujeto o diferente) con el fin de efectuar el tratamiento cuando se produce el antisentido transcrito o proteína codificada. Como alternativa, un aislado celular primario o una estirpe de célula no mucosal establecida se puede transformar con un transgén o polinucleótido, y después se puede transplantar en un tejido mucosal de un sujeto.

25 De este modo, para producir una célula mucosal aislada o cultivada de la invención, la célula mucosal se puede obtener, por ejemplo, de un tejido u órgano del tubo digestivo de un sujeto. La célula mucosal se puede transfectar entonces con el transgén mediante técnicas de ácido nucleico convencionales, y se puede propagar. Por ejemplo, se pueden aislar células madre intestinales y después se pueden cultivar y transfectar *in vitro* (Booth, C. *et al.*, Exp. Cell Res. 241:359 (1999); Kawaguchi, A.L. *et al.*, J. Pediatr. Surg. 33:559 (1998)). Las células que contienen o expresan el transgén se pueden identificar usando métodos convencionales, tales como transferencias Southern, Northern o Western, solas o en combinación con selección usando un marcador seleccionable. Las células transformadas se pueden reintroducir entonces (transplantar/implantar) en el mismo tejido o uno diferente del mismo sujeto o uno diferente del que se obtuvieron originalmente.

30 Si se desea, las células endocrinas mucosales diana pueden contener múltiples transgenes (es decir, dos o más). De esta manera, la expresión de diferentes proteínas codificadas por los transgenes puede proporcionar un efecto aditivo o sinérgico y, a su vez, un beneficio terapéutico superior a la expresión de cualquier proteína sola. Además, si los dos transgenes están enlazados a diferentes elementos de control de la expresión, o si la secreción de los dos polipéptidos codificados está regulada por diferentes señales o estímulos (por ejemplo, dos nutrientes diferentes), las proteínas se pueden producir independientemente una de la otra o en combinación (cuando se proporcionan ambos nutrientes diferentes). Por ejemplo, se pueden construir dos transgenes, uno que codifica GLP-1 y el otro que codifica insulina, en los que la producción está controlada por dos señales diferentes, tales como glucosa y un fármaco, respectivamente. La glucosa estimula la producción de GLP-1 (ya sea estimulando la transcripción o la secreción, como se explica en la presente memoria), mientras que el fármaco estimula la producción de insulina (ya

5 sea estimulando la transcripción o la secreción, como se explica en la presente memoria). La adición del fármaco para estimular la producción de insulina (nuevamente, ya sea estimulando la transcripción o la secreción) y la adición de glucosa pueden estimular la producción de GLP-1; mayores cantidades de fármaco o de glucosa podrían inducir incluso mayores cantidades de producción de insulina o de GLP-1. La producción tanto de insulina como de GLP-1 por adición del fármaco con una comida (que contiene glucosa) puede proporcionar un efecto terapéutico incluso mayor, especialmente para sujetos que sufren, por ejemplo, diabetes aguda. En consecuencia, la invención incluye además células mucosales que contienen múltiples transgenes, y métodos para producirlos y usarlos.

10 De este modo, según la invención, se proporciona una célula o células mucosales que producen una proteína regulable por un nutriente, en las que la expresión de la proteína es conferida por un transgén que comprende un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína. En una realización, la célula mucosal es una célula endocrina (por ejemplo, una célula K). En otra realización, la célula mucosal es una célula no endocrina. En todavía otra realización, la célula mucosal es una célula madre, o una célula progenitora multipotente o pluripotente. En una realización adicional, el elemento de control de la expresión confiere expresión regulable por un nutriente. En un aspecto, el elemento regulable por un nutriente comprende un promotor endocrino del intestino (por ejemplo, un promotor de GIP). En todavía otra realización, el nutriente incrementa la secreción de una proteína codificada por el ácido nucleico. En todavía otra realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido terapéutico (por ejemplo, insulina, leptina, péptido 1 similar a glucagón, péptido 2 similar a glucagón, un antagonista de glucagón, colecistocinina, una hormona del crecimiento, un factor de coagulación, un anticuerpo, entre otros). En todavía otra realización, la célula mucosal incluye dos o más transgenes.

25 Los polinucleótidos, que incluyen un elemento de control de la expresión, en enlace operativo con un ácido nucleico, se pueden introducir para la expresión estable en células de un organismo completo. Tales organismos, incluyendo animales transgénicos, son útiles para estudiar el efecto de la producción de la proteína mucosal en un animal completo, y el beneficio terapéutico. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, la producción de insulina en el intestino de un ratón transgénico protege al animal de desarrollar diabetes y de intolerancia a la glucosa tras la destrucción de las células β pancreáticas. Las razas de ratones que desarrollan o son susceptibles de desarrollar una enfermedad particular (por ejemplo, diabetes, trastornos degenerativos, cáncer, etc.) también son útiles para introducir proteínas terapéuticas como se describe en la presente memoria con el fin de estudiar el efecto de la expresión de la proteína terapéutica en el ratón susceptible a la enfermedad. Los modelos de animales transgénicos y genéticos que son susceptibles a una enfermedad particular o condiciones fisiológicas son conocidos en la técnica, y son dianas apropiadas para expresar proteínas terapéuticas en el intestino.

35 De este modo, según la invención, se proporcionan animales transgénicos no humanos que producen una proteína en tejido mucosal, producción de origen no natural en tejido mucosal del animal, producción conferida por un transgén presente en células somáticas o germinativas del animal. En una realización, el transgén comprende un polinucleótido, que incluye un elemento de control de la expresión, en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico (por ejemplo, insulina, leptina, GLP-1, GLP-2, grelina, CCK, un antagonista de glucagón, una hormona del crecimiento, un factor de coagulación, un anticuerpo, entre otros). En otra realización, el animal transgénico es un ratón. En aún otra realización, la expresión del polipéptido terapéutico en el tejido mucosal del animal es sensible a un nutriente. En todavía otra realización, la secreción del polipéptido terapéutico en el tejido mucosal aumenta por un nutriente. En una realización adicional, la expresión del polipéptido terapéutico en tejido mucosal aumenta por un nutriente (es decir, el elemento de control de la expresión que controla la expresión de insulina comprende un elemento inducible por un nutriente). En una realización adicional, el elemento regulable por un nutriente comprende un promotor inducible por glucosa (por ejemplo, un promotor del polipéptido insulínico dependiente de glucosa). En realizaciones adicionales, el tejido mucosal es un tejido u órgano del tubo digestivo (por ejemplo, intestino) o intestino, e incluye células endocrinas. En una realización adicional, se proporcionan células aisladas de los animales transgénicos de la invención que expresan el polipéptido terapéutico.

50 La expresión "animal transgénico" se refiere a un animal cuyas células de estirpe somática o germinativa poseen información genética recibida, directa o indirectamente, mediante manipulación genética deliberada a nivel subcelular, tal como mediante microinyección o infección con virus recombinante. El término "transgénico" incluye además células o tejidos (es decir, "célula transgénica", "tejido transgénico") obtenidos de un animal transgénico manipulado genéticamente como se describe en la presente memoria. En el presente contexto, un "animal transgénico" no engloba animales producidos mediante cruzamiento clásico o fertilización *in vitro*, sino más bien representa animales en los que una o varias células reciben una molécula de ácido nucleico. Los animales transgénicos de la invención pueden ser heterocigotos u homocigotos con respecto al transgén. Los métodos para producir animales transgénicos, incluyendo ratones, ovejas, cerdos y ranas, son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes US n^{os} 5.721.367, 5.695.977, 5.650.298, y 5.614.396), y, como tales, se incluyen adicionalmente.

65 Según la invención, se proporcionan métodos para tratar un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un trastorno tratable produciendo una proteína terapéutica en un tejido mucosal. En una realización, un método de la invención incluye poner en contacto células de tejido mucosal en el sujeto, transformadas con un polinucleótido (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*) que comprende un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica, con un nutriente que induce la producción de la proteína en una

cantidad efectiva para tratar el trastorno. En otra realización, un método de la invención incluye producir una proteína terapéutica en un tejido mucosal del sujeto implantando una o varias células mucosales transformadas (*in vitro* o *ex vivo*) que producen la proteína en el tejido del sujeto en una cantidad efectiva para tratar el trastorno.

5 Los trastornos tratables mediante un método de la invención incluyen una afección hiperglucémica, tal como diabetes insulino dependiente (tipo 1) o insulino independiente (tipo 2), así como estados o trastornos fisiológicos asociados con o que resultan de la afección hiperglucémica. De este modo, las afecciones hiperglucémicas tratables mediante un método de la invención también incluyen un cambio histopatológico asociado con hiperglucemia crónica o aguda (por ejemplo, diabetes). Los ejemplos particulares incluyen degeneración del páncreas (destrucción de
10 células β), calcificación de los túbulos renales, degeneración del hígado, daño ocular (retinopatía diabética), pie diabético, ulceraciones en la mucosa tal como boca y encías, hemorragia excesiva, coagulación sanguínea o curación de heridas retrasadas, y riesgo incrementado de cardiopatía isquémica, apoplejía, insuficiencia venosa periférica, dislipidemia, hipertensión y obesidad.

15 De este modo, en diversos métodos de la invención, una célula mucosal que produce insulina o una subsecuencia funcional de insulina en respuesta a la glucosa es útil para incrementar la insulina, disminuir la glucosa, mejorar la tolerancia a la glucosa, tratar una afección hiperglucémica (por ejemplo, diabetes), o para tratar trastornos fisiológicos asociados con o que resultan de una afección hiperglucémica. Tales trastornos incluyen, por ejemplo, neuropatía diabética (autónoma), nefropatía (daño renal), infecciones de la piel y otros trastornos cutáneos, curación
20 lenta o retrasada de lesiones o heridas (por ejemplo, la que conduce a ántrax diabético), daño ocular (retinopatía, cataratas) que conduce a ceguera, pie diabético, y periodontitis acelerada. Tales trastornos incluyen también un mayor riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica, apoplejía, insuficiencia venosa periférica, dislipidemia, hipertensión y obesidad.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “hiperglucémica” o “hiperglucemia”, cuando se usa en referencia a una afección de un sujeto, significa un nivel transitorio o crónico anormalmente elevado de glucosa presente en la sangre de un sujeto. La afección puede estar provocada por un retraso en la metabolización o absorción de la glucosa, de manera que el sujeto presenta intolerancia a la glucosa o un estado de glucosa elevada no encontrado típicamente en sujetos normales (por ejemplo, en sujetos subdiabéticos intolerantes a la glucosa con
30 riesgo de desarrollar diabetes, o en sujetos diabéticos). Los niveles de glucosa plasmática en ayunas (FPG) para normoglucemia son inferiores a aproximadamente 110 mg/dl; para metabolismo alterado de la glucosa, entre aproximadamente 110 y 126 mg/dl; y para diabéticos, superior a aproximadamente 126 mg/dl.

35 Los trastornos tratables produciendo una proteína en un tejido mucosal también incluyen obesidad o una masa corporal indeseable. La leptina, colecistocinina y GLP-1 disminuyen el hambre, incrementan el gasto de energía, inducen pérdida de peso, o proporcionan homeostasis normal de la glucosa. De este modo, en diversas realizaciones, un método de la invención para tratar obesidad o una masa corporal indeseable, o hiperglucemia, incluye poner en contacto células del tejido mucosal, que tienen un transgén que codifica leptina, colecistocinina o
40 GLP-1, con un nutriente para producir una proteína en una cantidad efectiva para tratar obesidad o una masa corporal indeseable. Los trastornos tratables también incluyen los asociados típicamente con obesidad, por ejemplo LDL sérico/plasmático anormalmente elevado, VLDL, triglicéridos, colesterol, formación de placas que conduce a un estrechamiento o bloqueo de los vasos sanguíneos, aumento del riesgo de hipertensión/apoplejía, cardiopatía isquémica, etc.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “obeso” u “obesidad” se refiere a un sujeto que tiene al menos un incremento del 30% en la masa corporal en comparación con un sujeto normal de la misma edad y género. “Masa corporal indeseable” se refiere a sujetos que tienen 1%-29% más masa corporal que un sujeto normal equiparable, así como sujetos que son normales con respecto a la masa corporal pero que desean disminuir o evitar un
50 incremento en su masa corporal.

El término “sujeto” se refiere a un animal. Típicamente, el animal es un mamífero; sin embargo, cualquier animal que tenga tejido mucosal, tal como intestino, está englobado por el término. Los ejemplos particulares de mamíferos son primates (seres humanos), perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, y ovejas. Los sujetos incluyen los que tienen un trastorno, por ejemplo un trastorno hiperglucémico, tal como diabetes, o sujetos que no tienen ningún trastorno pero
55 pueden estar en riesgo de desarrollar el trastorno, por ejemplo sujetos subdiabéticos que tienen niveles de FPG entre aproximadamente 110 y 126 mg/dl. Los sujetos en riesgo de desarrollar un trastorno incluyen, por ejemplo, aquellos cuya dieta puede contribuir a o estar asociada con el desarrollo de diabetes u obesidad, así como los que pueden tener un antecedente familiar o predisposición genética al desarrollo de la diabetes u obesidad. Los sujetos también incluyen sujetos aparentemente normales, por ejemplo los que desean perder peso pero no se considera
60 que son obesos o tienen una masa corporal superior a la normal.

En la Tabla 3 se muestra una lista parcial de proteínas terapéuticas y enfermedades diana.

Tabla 3

COMPUESTOS PRINCIPALES	ENFERMEDAD DIANA	FUNCIÓN	EFECTO TERAPÉUTICO
Insulina	Diabetes	Sustitución de insulina	Mejora la tolerancia a la glucosa Retrasa/previene la diabetes
Antagonistas de glucagón	Diabetes	Reduce la producción de glucosa endógena	Mejora la tolerancia a la glucosa
GLP-1	Diabetes Obesidad	Estimula el crecimiento de células β , mejora la sensibilidad a insulina, suprime el apetito	Mejora la tolerancia a la glucosa Induce pérdida de peso
Leptina	Obesidad Diabetes	Supresión del apetito y mejora de la sensibilidad a insulina	Induce pérdida de peso Mejora la tolerancia a la glucosa
CCK	Obesidad	Supresión del apetito	Induce pérdida de peso
Hormona del crecimiento (GH)	Deficiencias de GH, desgaste y antienvjecimiento	Sustitución de GH	Mejora el crecimiento
Factores de coagulación	Hemofilia	Sustitución de factores de coagulación	Mejora el tiempo de coagulación
Anticuerpos monoclonales humanos terapéuticos	Infecciones Cánceres	Neutralización de patógenos o modulaciones inmunitarias	Evita infecciones o rechazos de transplantes

5 El tratamiento generalmente da como resultado la reducción o prevención de la gravedad o síntomas de la afección en el sujeto, es decir, una mejora en el estado del sujeto o un “efecto terapéutico”. Por lo tanto, el tratamiento puede reducir la gravedad o prevenir uno o varios síntomas de la afección o un trastorno asociado, inhibir la progresión o empeoramiento de la afección o un trastorno asociado, y en algunos casos invertir la afección o un trastorno asociado. De este modo, en el caso de una afección hiperglucémica, por ejemplo, el tratamiento puede reducir la glucemia, mejorar la tolerancia a la glucosa, proporcionar homeostasis normal de la glucosa, o prevenir, mejorar o
10 invertir un cambio histopatológico asociado con o que resulta de la afección hiperglucémica.

15 La mejora de un cambio histopatológico asociado con una afección hiperglucémica incluye, por ejemplo, prevenir además o reducir la calcificación de los túbulos renales, disminuir o detener la retinopatía o cataratas, disminuir el tiempo de curación de heridas o lesiones, reducir el pie diabético, prevenir o reducir periodontitis acelerada, o disminuir el riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica, apoplejía, insuficiencia venosa periférica, dislipidemia, hipertensión y obesidad. La mejora en la obesidad puede incluir, por ejemplo, una reducción de la masa corporal o una mejora en un trastorno asociado, tal como una disminución en los niveles de colesterol, LDL o VLDL, una
20 disminución en la tensión arterial, una disminución en el engrosamiento de la íntima de los vasos sanguíneos asociado con una dieta rica en grasas, una disminución en la frecuencia cardíaca en reposo, un incremento en la capacidad pulmonar, etc. La mejora en un trastorno hemorrágico, tal como hemofilia, puede incluir, por ejemplo, un menor tiempo de coagulación o frecuencia/duración de los episodios hemorrágicos.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “mejorar” significa una mejora en la afección del sujeto, una reducción en la gravedad de la afección, o una inhibición de la progresión o empeoramiento de la afección. En el caso de una afección hiperglucémica (por ejemplo, diabetes), por ejemplo, una mejora puede ser una disminución en la glucemia, un incremento en la insulina, una mejora en la tolerancia a la glucosa, u homeostasis de la glucosa. Una mejora en la afección hiperglucémica también puede incluir función pancreática mejorada (por ejemplo, inhibe o previene la destrucción de células β de los islotes), una disminución en una patología asociada con o que resulta de la afección, tal como una mejora en la histopatología de un tejido u órgano afectado, como se expone en la presente
30 memoria. En el caso de obesidad, por ejemplo, una mejora puede ser una disminución en la ganancia de peso, una reducción de la masa corporal, o una mejora en las afecciones asociadas con obesidad, como se expone en la presente memoria (por ejemplo, reducción de la glucemia, niveles de colesterol, LDL o VLDL, una disminución en la tensión arterial, una disminución en el engrosamiento de la íntima de los vasos sanguíneos, etc.). En el caso de hemofilia u otros trastornos de la coagulación/hemorragia de la sangre, una mejora puede reducir la frecuencia o
35 duración de los episodios de sangrado o de la hemorragia. Igualmente, las mejoras incluyen trastornos crónicos asociados con trastornos asociados con la coagulación/hemorragia de la sangre, tales como una reducción en los problemas neurológicos, daño incapacitante de los tejidos y articulaciones, por ejemplo.

40 Las dosis o “cantidad efectiva” para tratar un sujeto son preferiblemente suficientes para mejorar uno, varios o todos los síntomas de la afección, en un grado medible o detectable, aunque la prevención o inhibición de la progresión o empeoramiento del trastorno o enfermedad, o un síntoma, es un resultado satisfactorio. De este modo, en el caso de una afección o trastorno tratable produciendo una proteína en un tejido mucosal, la cantidad de proteína producida, o célula o células transplantadas, suficiente para mejorar una afección tratable mediante un método de la invención,

5 dependerá de la afección y del resultado deseado, y se puede averiguar fácilmente por una persona experta. Las cantidades apropiadas dependerán de la afección tratada, del efecto terapéutico deseado, así como del sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad en el sujeto, género, edad, etc.). Por ejemplo, una restauración parcial de la homeostasis normal de la glucosa en un sujeto puede reducir la frecuencia de la inyección de insulina, incluso aunque no se haya producido la liberación completa de las inyecciones de insulina.

10 La cantidad efectiva se puede averiguar midiendo efectos fisiológicos relevantes. Por ejemplo, en el caso de diabetes u otra afección hiperglucémica, se puede usar una disminución en la glucemia o una mejora en el ensayo de tolerancia a la glucosa para determinar si la cantidad de insulina, o célula o células que expresan insulina
15 transplantadas en la mucosa del animal, es efectiva para tratar la afección hiperglucémica. Por ejemplo, una cantidad que reduzca FPG de 126 mg/dl a 120, 115, 110, o menos, es una cantidad efectiva. En el caso de obesidad o una masa corporal indeseable, una disminución en la masa del sujeto, una disminución en el tamaño de las comidas o en el contenido calórico de una comida, un aumento de la saciedad para un tamaño dado de comida, y las disminuciones en los niveles séricos/plasmáticos de lípido, colesterol, ácidos grasos, LDL o VLDL, pueden ser
20 cantidades efectivas para mejorar la obesidad o una masa corporal indeseable de un sujeto. En el caso de hemofilia, una cantidad efectiva es una cantidad que reduce el tiempo de coagulación o la frecuencia o duración de episodios hemorrágicos en un sujeto.

25 Los métodos de la invención para tratar un sujeto son aplicables para la profilaxis para prevenir una afección en un sujeto, tal como una afección hiperglucémica o un trastorno asociado, o el desarrollo de obesidad o una masa corporal incrementada. Como alternativa, los métodos se pueden poner en práctica siguiendo el tratamiento de un sujeto como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, tras el tratamiento y una reducción de la masa corporal hasta el peso deseado, se pueden producir periódicamente leptina, GLP-1 o CCK mediante las células mucosales, como se describe en la presente memoria, con el fin de suprimir el apetito, disminuir el consumo de
30 comidas, etc., manteniendo de este modo el peso corporal deseado.

35 Los métodos de la invención para tratar un sujeto también se pueden complementar con otras formas de terapia. Las terapias suplementarias incluyen tratamiento con fármacos, un cambio en la dieta (bajo contenido de azúcar, grasas, etc.), resección quirúrgica, trasplante, radioterapia, etc. Por ejemplo, se puede usar un método de la invención para tratar una afección hiperglucémica en combinación con fármacos u otras formulaciones farmacéuticas que incrementan la insulina o reducen la glucosa en un sujeto. Los fármacos para tratar diabetes incluyen, por ejemplo biguanidas y sulfonilureas (por ejemplo, tolbutamida, clorpropamida, acetohexamida, tolazamida, dibenclamida y glipicida). Los fármacos que suprimen el apetito también son bien conocidos, y se pueden usar en combinación con los métodos de la invención. Las terapias suplementarias se pueden administrar antes, contemporáneamente o tras
40 los métodos de tratamiento de la invención. El experto puede averiguar fácilmente las terapias que se pueden usar en un régimen en combinación con los métodos de tratamiento de la invención.

45 Como un método de la invención puede incluir el suministro *in vivo*, tal como un polinucleótido que comprende un elemento de control de la expresión en enlazamiento operativo con un ácido nucleico en células mucosales de un sujeto, con el fin de producir una proteína codificada en el sujeto, por ejemplo, los sistemas de expresión incluyen además vectores diseñados específicamente para el suministro *in vivo*. Se han desarrollado vectores que suministran eficientemente genes a las células del tubo digestivo (por ejemplo, células madre), y se contemplan para uso en el suministro de los polinucleótidos en células mucosales (véanse, por ejemplo, las patentes US nº 5.821.235, nº 5.786.340 y nº 6.110.456; Croyle, M.A. *et al.*, Gene Ther. 5:645 (1998); Croyle, M.A. *et al.*, Pharm. Res. 15:1348 (1998); Croyle, M.A. *et al.*, Hum. Gene Ther. 9:561 (1998); Foreman, P.K. *et al.*, Hum. Gene Ther. 9:1313 (1998); Wirtz, S. *et al.*, Gut 44:800 (1999)). Los vectores adenovíricos y víricos adenoasociados, adecuados para terapia génica, se describen en las patentes US nº 5.700.470, nº 5.731.172 y nº 5.604.090. Los vectores adicionales adecuados para terapia génica incluyen vectores del virus del herpes simple (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.501.979), vectores retrovíricos (véanse, por ejemplo, las patentes US nº 5.624.820, nº 5.693.508 y nº 5.674.703; y los documentos WO 92/05266 y WO 92/14829), vectores del virus del papiloma bovino (BPV) (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.719.054), vectores a base del CMV (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.561.063) y los vectores de parvovirus, rotavirus y virus de Norwalk. Los vectores lentivíricos son útiles para infectar células en división así como células que no están en división (véase, por ejemplo, la patente US nº 6.013.516).

55 La introducción *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de ácido nucleico y polipéptido también se puede lograr usando otras técnicas. Por ejemplo, un polinucleótido que comprende un elemento de control de la expresión en enlazamiento operativo con un ácido nucleico que codifica una proteína se puede incorporar en partículas o una sustancia polimérica, tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogel, polivinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, o copolímeros de lactida/glicolida, copolímeros de polilactida/glicolida, o copolímeros de etileno-acetato de vinilo. Un polinucleótido se puede atrapar en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo mediante el uso de microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina, o microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en un sistema de suministro de fármaco coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de agua en aceite, micelas, micelas mixtas, y liposomas. El uso de liposomas para introducir diversas composiciones,
60
65

incluyendo polinucleótidos, es conocido por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes US nº 4.844.904, nº 5.000.959, nº 4.863.740, y nº 4.975.282). Un vehículo que comprende un polímero natural, o un derivado o un hidrolizado de un polímero natural, descrito en el documento WO 94/20078 y en la patente US nº 6.096.291, es adecuado para el suministro mucosal de moléculas, tales como polipéptidos y polinucleótidos. También son conocidos los lípidos catiónicos anfífilos a base de piperazina, útiles para la terapia génica (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.861.397). También se conocen los sistemas de lípidos catiónicos (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.459.127). En consecuencia, se pueden lograr y se contemplan medios vectoriales (víricos y no víricos, por ejemplo, ADN desnudo) y no vectoriales de suministro en células o tejido mucosales, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Puesto que los métodos de la invención pueden incluir la puesta en contacto de una célula o células mucosales presentes en un sujeto con un polinucleótido, la presente invención también proporciona formulaciones "farmacéuticamente aceptables" o "fisiológicamente aceptables" en las que se incluye un transgén o un polipéptido terapéutico. Tales formulaciones se pueden administrar *ex vivo* o *in vivo* a un sujeto, por ejemplo con el fin de poner en práctica los métodos de tratamiento de la invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables" se refieren a vehículos, diluyentes, excipientes y similares que se pueden administrar a un sujeto, preferiblemente sin producir efectos secundarios adversos excesivos (por ejemplo, náusea, dolor abdominal, cefaleas, etc.). Tales preparaciones para administración incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden obtener a partir de vehículos, diluyentes, excipientes, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración a un sujeto. Tales formulaciones pueden estar contenidas en un comprimido (revestido o no revestido), cápsula (dura o blanda), microperla, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir. También pueden estar presentes compuestos activos suplementarios y conservantes, entre otros aditivos, por ejemplo agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Una formulación farmacéutica se puede formular para que sea compatible con la ruta pretendida de administración. De este modo, las formulaciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes o excipientes adecuados para la administración mediante rutas que incluyen la intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, ingestión o inhalación), intravenosa, intracavidad, intracraneal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo transmucosal y rectal.

Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir lo siguiente: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para ajustar la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o de plástico.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua), o polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ), o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y propilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorbutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En la composición se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de formulaciones inyectables se puede lograr incluyendo un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina.

Para administración oral, una composición se puede incorporar con excipientes y se puede usar en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. En las formulaciones orales se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente de deslizamiento, tal como dióxido de silicio coloidal; un

agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta piperita, salicilato de metilo, o un sabor.

5 Las formulaciones también pueden incluir vehículos para proteger la composición frente a la degradación o eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso en el tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo, solo o en combinación con una cera.

10 Las formulaciones adicionales incluyen partículas biodegradables o biocompatibles o una sustancia polimérica tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogel, polivinilpirrolidona, polianhídridos, poliácido glicólico, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, o copolímeros de lactida/glicolida, copolímeros de polilactida/glicolida, o copolímeros de etileno-acetato de vinilo, con el fin de controlar el suministro de una composición administrada. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán manifiestos para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Alza Corporation
15 y Nova Pharmaceuticals, Inc.

La velocidad de liberación de una composición se puede controlar alterando la concentración o composición de tales macromoléculas. Por ejemplo, la composición se puede atrapar en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo mediante el uso de microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina o microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en un sistema de suministro de fármaco coloidal. Los sistemas de dispersión coloidales incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, microperlas, y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. Estos se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente US nº 4.522.811.

25 Formulaciones farmacéuticas adicionales apropiadas para la administración son conocidas en la técnica y son aplicables en los métodos y composiciones de la invención (véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12ª ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; y Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc.,
30 Lancaster, Pa., (1993)).

El moco o forro endotelial del tejido mucosal se puede eliminar o de otro modo preparar antes de la administración usando, por ejemplo, penetrantes u otros potenciadores de la penetración de la barrera. Tales penetrantes apropiados para la barrera a permear son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para
35 administración transmucosal, incubación con N-acetil-cisteína (Nakanishi *et al.* Chem Pharm Bull (Tokyo) 40:1252 (1992), Meaney y O'Driscoll Eur J Pharm Sci. 8:167 (1999)); hidrólisis de mucinas intestinales mediante proteína Sigma 1 purificada y partículas subvéricas infecciosas (Bisaillon *et al.* J Mol Biol. 286:759(1999)); desialización (Slomiany *et al.* Gen Pharmacol. 27:761 (1996); (Hirmo *et al.* FEMS Immunol Med Microbiol. 20:275 (1998));
40 desulfuración mediante H. pylori glucosulfatasa (Slomiany *et al.* Am J Gastroenterol. 87:1132 (1992)); desialización mediante neuraminidasa (Hanski *et al.* Cancer Res. 51:5342 (1991)); ruptura de enlaces de disulfuro mediante β -mercaptoetanol (Gwozdinski *et al.* Biochem Int. 17:907 (1988)); desglucosilación con exoglucosidasas específicas tales como fucosidasa, β -galactosidasa, N-acetil-galactosaminidasa, β -N-acetil hexosaminidasa, y neuraminidasa (Slomiany *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 142:783 (1987)); eliminación de ácido mediante HCl 0,4 N (Ruggieri
45 *et al.* Urol Res. 12:199 (1984), Davis C.P. y Avots-Avotins A.E. Scan Electron Microsc. (Pt 2):825-30 (1982), Parsons *et al.* Am J Pathol. 93:423 (1978)), entre otros. La administración mucosal se puede lograr mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración mediante inhalación, la formulación se puede suministrar vía una bomba o un pulverizador de aerosol desde un dispensador o recipiente a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

50 El número de células madre se puede incrementar mediante exposición a agentes citotóxicos y factores de crecimiento. Por ejemplo, la irradiación del intestino delgado aumenta el número de células clonogénicas/células madre (Roberts S.A. Radiat. Res. 141:303 (1995); Cai W.B. *et al.* Intl. J. Radiat. Biol. 71:145 (1997)). Además, se ha demostrado que el tratamiento con GLP-2, factor de crecimiento epidérmico, TGF- α , factores de crecimiento similares a insulina, interleucinas, entre otros, promueve el crecimiento de células mucosales (Potten C.S. Int. J. Exp. Path 78:219 (1997)). De esta manera, se pueden producir células diana adicionales, incrementando de este modo la eficiencia de la transformación y la producción regulada subsiguiente de proteína mediante las células transformadas.

60 Para suministrar la formulación a diversas partes del intestino de un sujeto, se pueden usar endoscopios, cánulas, tubos de intubación, catéteres, y similares. Esto permite el suministro efectivo y el envío de vectores a áreas particulares del intestino.

65 Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que se entiende habitualmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, se describen en este caso métodos y materiales

adecuados.

Todas las publicaciones, patentes y otras referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares “un”, “y”, y “el” incluyen los referentes plurales excepto que el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a “una célula mucosal” incluye una pluralidad de tales células, y la referencia a “un polinucleótido que comprende un elemento de control de la expresión en enlazamiento operativo con un ácido nucleico” incluye la referencia a uno o varios de tales constructos, etc.

Se ha descrito un número de realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que se pueden hacer diversas modificaciones sin separarse del espíritu ni del alcance de la invención. En consecuencia, los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no limitar el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo I

Este ejemplo describe el establecimiento de una estirpe de célula endocrina del intestino, útil para estudiar la producción regulada de insulina y para dirigir la expresión de insulina *in vivo*. Este ejemplo también describe la construcción de un vector de expresión génica de insulina humana.

Se estableció una estirpe celular que expresa GIP para investigar si el promotor de GIP es efectivo dirigiendo la expresión del gen de insulina hacia células K. Esta estirpe celular se clonó a partir de la estirpe de célula intestinal murina STC-1, una población mixta de células endocrinas del intestino (Rindi et. al., Am. J. Pathol. 136:1349 (1990)). Las células K en la población mixta se identificaron visualmente mediante transfección de un plásmido de expresión de la proteína fluorescente verde llevada a cabo por el promotor de ~2,5 Kb de la GIP de rata. El promotor de GIP de rata se obtuvo a partir de una librería λ DASH genómica de rata (Stratagene) mediante hibridación en placas con un clon de ADNc de GIP de rata como se describe previamente (Boylan et. al., J. Biol. Chem. 273:17438 (1997)), y se subclonó en el plásmido pEGFP-1 carente de promotor (Clontech). El vector informador resultante se transfectó en células STC-1 (D. Drucker, Universidad de Toronto) usando Lipofectamina (GIBCO). Las células se dispersaron con tripsina/EDTA, y las células fluorescentes que expresan EGFP se recogieron a dos manos y se colocaron en cápsulas individuales para la expansión clonal (figura 1).

Tras la expansión clonal de las células transitoriamente fluorescentes, los clones se analizaron para determinar la expresión de ARNm de GIP mediante transferencia Northern. De forma breve, se aisló ARN total de células GTC-1 y STC-1 con Trizol (Gibco), según las instrucciones del fabricante. El ARN celular total (20 ug) de cada muestra se separó electroforéticamente y se transfirió a una membrana de nailon. La hibridación se llevó a cabo con un fragmento EcoR1 de 660 pb radiomarcado del ADNc de GIP de rata, que se cebó al azar con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Tras la hibridación, las membranas se lavaron y se expusieron a película de rayos X. El nivel de ARNm de GIP en un clon (Células Tumorales de GIP; GTC-1) fue ~8 veces superior a en las células STC-1 heterogéneas progenitoras (FIG 2).

Con el fin de determinar si las células GTC-1 procesan correctamente preproinsulina genómica humana, se transfectó en estas células un constructo de expresión de insulina en el que el gen de insulina estaba enlazado al extremo 3' del promotor de GIP de rata (FIG 3, GIP/Ins).

Para construir el plásmido de expresión de insulina humana/GIP, se insertó una porción de ~2,5 Kb del promotor de GIP de rata en pGLBH, como se explica anteriormente (Boylan *et al.*, J. Biol. Chem. 273:17438 (1997)). El ADNc de insulina humana, que comprende ~1,6 Kb de la secuencia genómica que se extiende desde los nucleótidos 2127 a 3732, e incluye el sitio de poliadenilación nativo, se cortó de pBR322 (ATCC n° 57399) mediante digestión con BamHI, y se ligó en el sitio de BglII del constructo pGLBH que contiene GIP. El constructo de expresión se muestra en la FIG 3.

Se aisló ARN total a partir de células transfectadas con GIP/Ins y células no transfectadas e islotes humanos (Trizol, GIBCO). Se transcribieron de forma inversa 5 μg del ARN aislado con un cebador oligo-dT usando transcriptasa inversa Superscript II (GIBCO). Se amplificaron 2 μl del producto de ADNc con cebadores específicos para el gen de preproinsulina humana (Cebador 1 y 3, FIG 3). Los resultados indican que el transcrito de ARNm de preproinsulina humana se procesó correctamente (figura 4, parte superior).

Cuando el constructo de GIP/Ins se transfectó en una estirpe de célula β (INS-1), en una estirpe celular hepática (HepG2) y en una estirpe celular de fibroblastos de rata (3T3-L1), se pudo detectar poco ARNm de preproinsulina humana. Estas observaciones indican que el promotor de GIP es específico de la célula, y es probable que sea efectivo dirigiendo la expresión del transgén hacia células K *in vivo*.

Después se llevó a cabo el análisis de transferencia Western de las células GTC-1, para determinar si estaban

presentes enzimas de procesamiento para convertir proinsulina en insulina madura. De forma breve, las células GTC-1 se lisaron en tampón de RIPA enfriado con hielo, y los sobrenadantes se evaluaron para determinar el contenido de proteína total usando el método de Bradford. La proteína del lisado celular (50 µg) se fraccionó en 10% de SDS-PAGE, y las proteínas fraccionadas se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos policlonales que reconocen PC1/3 y PC2 (Dr. Iris Lindberg, Louisiana State Medical Center). Las membranas se lavaron, se incubaron con antisuero anti-conejo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante (Amersham-Pharmacia), y se desarrollaron con un kit de detección de transferencia Western de quimioluminiscencia. Los resultados indican que las proproteína convertasas requeridas para el procesamiento correcto de proinsulina en insulina madura (PC1/3 y PC2; Steiner, D.F., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:31 (1998)) se expresaron en células GTC-1 (figura 4, parte inferior).

Para confirmar que la proinsulina se procesó apropiadamente, se midieron los niveles de insulina y de péptido C en los medios de cultivo celular (figura 5). Tanto el péptido C como la insulina se detectaron en el medio de cultivo recogido a partir de célula GTC-1 transfectada con el plásmido GIP/Ins. Este resultado indica que las células K procesan proinsulina en insulina madura.

Para confirmar que la producción de insulina humana a partir de células GTC-1 transfectadas con el plásmido GIP/Ins era regulable mediante glucosa, se ensayaron niveles de insulina en el medio de cultivo celular a diferentes concentraciones de glucosa. De forma breve, células GTC-1 70-80% confluentes en placas de 12 pocillos se dejaron en ayunas 2 h en DMEM con 1,0 mM de glucosa y 1% de suero fetal de ternera (FCS). Las células se lavaron y después se incubaron en 0,5 ml de medio de liberación (DMEM más 1% de FCS con 1,0 ó 10,0 mM de glucosa) durante 2 h. El medio se recogió después de 2 horas para cada condición, y se evaluó usando el kit de ELISA para insulina específica de humanos, según las instrucciones del fabricante (ALPCO). Además, la liberación de insulina a partir de estas células fue dependiente de la glucosa (FIG 6).

Ejemplo II

Este ejemplo describe ratones transgénicos que producen insulina en respuesta a la glucosa.

Usando el constructo de expresión de insulina humana GIP/Ins descrito en el Ejemplo I, el fragmento de GIP/insulina (~4,1 Kb) se eliminó mediante digestión con HindIII. Se generaron ratones transgénicos mediante microinyección pronuclear del transgén de ~4,1 Kb en embriones fertilizados que se implantaron en hembras pseudopreñadas. La descendencia transgénica se identificó mediante análisis de transferencia Southern. El ADN procedente de secciones de la oreja se digirió con XhoI y PvuII (FIG 3), se separó electroforéticamente, y se transfirió a membrana de nailon. Para la detección del transgén, se amplificó un fragmento del gen de insulina humana de 416 pb que comprende el intrón 2 usando los cebadores 2 y 4 (FIG 3). El producto de la PCR se preparó como una sonda marcando radiactivamente al azar con [α -³²P]dCTP, y las bandas se detectaron mediante autorradiografía. Los resultados del análisis Southern se confirmaron adicionalmente mediante amplificación por PCR del ADN genómico usando los cebadores 2 y 4. Los fundadores positivos se cruzaron con ratones FVB/N de tipo salvaje, para establecer estirpes transgénicas (FIG 8).

Los tejidos de ratones transgénicos se examinaron para determinar la expresión de insulina. De forma breve, se fraccionó ARN total (50 µg) para cada uno de estómago y duodeno, íleo, músculo, hígado, bazo, riñón, grasa, cerebro, pulmón, corazón, vejiga y testículo de ratón, y se transfirió a una membrana y se sondó con un fragmento de ADNc de 333 pares de bases que engloba los exones 1 y 2 y parte del exón 3 del gen de proinsulina humana. El análisis reveló que la insulina se expresó en el estómago y el duodeno, pero no en el íleo, músculo, hígado, bazo, riñón, grasa, cerebro, pulmón, corazón, vejiga o testículo procedentes de los animales transgénicos resultantes (FIG 9).

Para confirmar la producción de insulina en el duodeno, se llevó a cabo un análisis de RT-PCR para ARNm de insulina. De forma breve, se usaron los cebadores directo 5'- CCAGCCGCAGCCTTTGTGA-3' e inverso 5'-GGTACAGCATTGTTCCACAATG-3' específicos de proinsulina humana, y los cebadores directo 5'-ACCACCAGCCCTAAGTGAT-3' e inverso 5'-CTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGC-3' específicos de proinsulina de ratón. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C durante 1 min., hibridación a 50°C durante 1 min., y extensión a 72°C durante 1 min. durante 45 ciclos. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los conjuntos de cebadores específicos de seres humanos y de ratón produjeron productos de 350 pb y 396 pb, respectivamente.

El ARN de insulina se detectó en la muestra de duodeno procedente de los ratones transgénicos, confirmando que la insulina no fue debida a contaminación del páncreas de ratón adyacente (FIG 9). La localización celular de la proteína insulina se determinó en biopsias tisulares de ratones transgénicos utilizando un anticuerpo frente a insulina. La inmunorreactividad de la insulina se detectó en distintas células endocrinas en secciones del estómago de animales transgénicos (FIG 10).

Los resultados mencionados anteriormente indican que la distribución tisular de la expresión de insulina en animales

transgénicos corresponde al patrón de expresión tisular de GIP (Tseng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1992 (1993); Yeung *et al.*, Mol. Cell. Endocrinol. 154:161 (1999)).

Para determinar si las células que expresan insulina fueron células K, se analizaron tejidos para determinar la inmunorreactividad con antisueros de GIP. De forma breve, los tejidos se fijaron toda la noche en disolución de Bouin, y se embebieron en parafina. Las secciones tisulares (5 μm de grosor) se montaron en portaobjetos de vidrio. Para la inmunohistoquímica, se usó el método del complejo de avidina-biotina con peroxidasa y diaminobencidina como cromógeno. Las secciones se incubaron con anti-insulina de cobaya (1:500; Linco Research, Inc.) o anti-GIP de ratón (1:200; R. Pederson, University of British Columbia) durante 30 minutos, y con anticuerpos secundarios apropiados durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para la inmunohistoquímica se usaron anticuerpos secundarios biotinilados, y para la inmunofluorescencia se usaron anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína o con Cy3. Los resultados indican que las células que expresan insulina fueron células K debido a la coexpresión de GIP inmunorreactiva (FIG 10). Estos resultados confirman que la producción de insulina humana se dirigió efectivamente a las células K en el intestino de ratones.

Ejemplo III

Este ejemplo muestra que la producción de insulina en ratones transgénicos proporcionó homeostasis normal de la glucosa y protección frente al desarrollo de diabetes. La producción de insulina humana a partir de células K del intestino de ratones transgénicos también está regulada por las comidas. Este ejemplo también describe datos que muestran que la producción de insulina inducible por glucosa mediante los ratones transgénicos proporciona homeostasis de la glucosa tras la destrucción de las células β pancreáticas.

Se llevó a cabo el análisis de los niveles de insulina humana plasmática en ratones transgénicos en respuesta a la ingesta de alimento. De forma breve, los niveles de insulina plasmática se midieron usando el kit de ELISA para insulina específica de seres humanos (ALPCO), según las instrucciones del proveedor. Este ensayo tiene una reactividad cruzada $<0,01\%$ con proinsulina humana y péptido C, y no detecta insulina de ratón. Las medidas del péptido C plasmático se realizaron con un kit de RIA para péptido C de rata/ratón (Linco). El ensayo no presenta reactividad cruzada con el péptido C humano.

En muestras plasmáticas reunidas, recogidas tras la exposición a glucosa oral, la insulina fue $39,0 \pm 9,8$ pM ($n = 10$, media \pm SEM) en ratones transgénicos, e indetectable en los controles ($n = 5$). Para confirmar que la insulina humana producida a partir de células K está regulada por las comidas, se dejaron en ayunas a ratones transgénicos. Tras un ayuno de 40 horas, se recogieron muestras de sangre vía la vena de la cola. A los animales se les volvió a dar entonces alimento con un pienso estándar, y se recogieron muestras de sangre nuevamente 24 h después de la reposición del alimento.

Como se muestra en la figura 11A, el ayuno redujo significativamente la insulina humana circulante en ratones transgénicos en más de 40% ($13,0 \pm 4,2$ pM frente a $7,6 \pm 2,3$ pM, $p < 0,03$). Después de la restricción del alimento, la realimentación dio como resultado un incremento de aproximadamente 400% en la insulina humana circulante.

Para evaluar la cinética de liberación de insulina humana a partir de células K del intestino, los ratones transgénicos que ayunaron se alimentaron con una comida mixta en forma de un pelete de pienso (0,5 g) o con una exposición a glucosa oral (3 mg/g de peso corporal). Como se muestra en la figura 11B, ambas exposiciones a nutrientes orales estimularon prontamente la liberación de insulina humana a partir de células K del intestino en al menos 20% en 30 min. Estos resultados confirmaron que la secreción de insulina a partir de células K del intestino está de hecho regulada por las comidas.

De forma interesante, los niveles de péptido C de ratón después de una carga de glucosa oral en ratones transgénicos fueron $\sim 30\%$ inferiores a los controles ($227,1 \pm 31,5$ pM frente a $361,5 \pm 31,2$ pM, $n = 3$ en cada grupo, media \pm SEM). Esta observación sugiere que la insulina humana producida a partir del intestino puede haber conducido a una disminución compensatoria de la producción de insulina endógena.

Se investigó la capacidad de la producción de insulina humana a partir de células K del intestino para proteger a los ratones transgénicos de la diabetes. Se administró estreptozotocina (STZ), una toxina para las células β , a ratones transgénicos y a controles de edad parecida. De forma breve, se administró estreptozotocina (200 mg/kg de peso corporal) en tampón de citrato a ratones transgénicos de 8 semanas y ratones de control de edad parecida, vía una inyección intraperitoneal. A esta dosis de estreptozotocina, los ratones presentan típicamente glucosuria en 3 días después de la inyección.

En los animales de control, el tratamiento con STZ dio como resultado una hiperglucemia en ayunas ($26,2 \pm 1,52$ mM, $n = 3$, media \pm SEM) y la presencia de glucosa en la orina en 3 a 4 días, indicando el desarrollo de diabetes. Cuando se dejaron sin tratar, estos animales se deterioraron rápidamente y murieron en 7 a 10 días. Por el contrario, no se detectó glucosuria ni hiperglucemia en ayunas ($9,52 \pm 0,67$ mM, $n = 5$, media \pm SEM) en ratones transgénicos durante un tiempo de hasta tres meses después del tratamiento con STZ, y continuaron ganando peso normalmente.

Para determinar si la producción de insulina a partir de células K fue capaz de mantener la tolerancia a la glucosa oral en estos ratones a pesar del daño importante a las células β por STZ, los ratones se expusieron a una carga de glucosa oral cinco días después del tratamiento con STZ. De forma breve, se administró oralmente glucosa mediante un tubo de alimentación (1,5 g/kg de peso corporal) como una disolución al 40% (peso/vol) a ratones en ayunas durante 14 h. Se recogieron muestras de sangre (40 μ l) de la vena de la cola de ratones conscientes a 0, 10, 20, 30, 60, 90, y 120 minutos después de la carga de glucosa. Los niveles de glucosa plasmática se determinaron mediante ensayo enzimático colorimétrico (Sigma), y los niveles de insulina plasmática se midieron usando el kit de ELISA para insulina específica de seres humanos (ALPCO).

Los ratones de control a los que se les dio STZ fueron importantemente hiperglucémicos tanto antes como después de la ingestión de glucosa (FIG 12). Por el contrario, los ratones transgénicos tratados con STZ tuvieron niveles de glucemia normales y desecharon rápidamente la carga de glucosa oral como lo hicieron los ratones de control normales de edad similar (FIG 12).

Para asegurarse de que el tratamiento con STZ destruyó efectivamente las células β en estos animales experimentales, se inmunotifaron para insulina de ratón, como se describe previamente, secciones pancreáticas procedentes de animales transgénicos tratados con STZ y de los controles. El número de racimos celulares teñidos positivamente para insulina de ratón fue sustancialmente menor en animales tratados con STZ cuando se comparó con controles tratados falsamente (FIG 13). El contenido pancreático total de insulina en ratones transgénicos tratados con STZ se evaluó homogeneizando los páncreas y sometiendo a ultrasonidos a 4°C en 2 mM de ácido acético que contiene 0,25% de BSA. Tras la incubación durante 2 h en hielo, los homogenizados tisulares se volvieron a someter a ultrasonidos, se centrifugaron (8.000 g, 20 min.), y los sobrenadantes se evaluaron para determinar la insulina mediante radioinmunoensayo sólo. Los resultados indican que el contenido pancreático total en ratones transgénicos tratados con STZ fue 0,5% del de los controles tratados falsamente (0,18 frente a 34,0 μ g de insulina por páncreas, n = 2). El hecho de que estos ratones transgénicos tratados con STZ desecharon la glucosa oral como los ratones normales a pesar de no tener virtualmente células β pancreáticas indica que la insulina humana producida en el intestino fue suficiente para mantener la tolerancia normal a la glucosa.

Estos hallazgos indican que la producción de insulina a partir de células K del intestino puede proteger a los ratones de desarrollar diabetes, y también proporciona homeostasis normal de la glucosa hasta el grado de restaurar la tolerancia normal a la glucosa. Por lo tanto, la insulina expresada en el intestino es un medio con el que se pueden tratar afecciones hiperglucémicas tales como diabetes.

Ejemplo IV

Este ejemplo describe el trasplante de una célula transformada que produce una proteína en respuesta a un nutriente en un tejido de un sujeto mamífero.

Para aislar células mucosales diana, se recogerá una biopsia tisular del duodeno de un sujeto. La biopsia se lava en disolución salina balanceada de Hank (HBSS; Gibco BRL) enfriada con hielo, ~pH 7,4, que contiene 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA; Sigma), y se cortó finamente con escalpelos, seguido de la digestión en una mezcla enzimática que contiene 75 U/ml de colagenasa tipo I (Sigma), 75 U/ml de colagenasa tipo XI (Sigma), 0,9 U/ml de colagenasa tipo IX (Sigma) y 1 U/ml de tripsina (Worthington Biochemical Corp) durante 1 hora en un baño de agua agitado a 37°C. El volumen total se duplicó entonces con HBSS-BSA, y se dejó sedimentar durante 10 min. Se descartó el sobrenadante que contiene las células despegadas. El tejido que queda se digirió adicionalmente en la mezcla enzimática durante dos periodos de 45 min., con cada etapa seguida de la adición de 300 μ l de 0,5 M de EDTA durante 15 min. La suspensión celular que resulta de la digestión 3 se filtra a través de una malla de Nitex (200 μ m, B&SH Thompson), y se lava y se centrifuga a 200 x g dos veces con HBSS-BSA suplementada con 0,01% de ditiotreitól y 0,001% de ADNasa. Las células se filtran entonces una segunda vez a través de una malla fina de Nitex (62 μ m, B&SH Thompson), se cuentan, y se diluyen en HBSS-BSA-DTT-ADNasa hasta 6 x 10⁶ células/ml para elutriación.

Las células endocrinas mucosales se enriquecerán usando elutriación centrífuga de las células en contraflujo (Lindahl P.E. Nature 161:648 (1948), un procedimiento que separa células basándose en sus coeficientes de sedimentación. La suspensión celular se bombea en una cámara giratoria, y las células se mantienen cuando su velocidad de sedimentación está equilibrada por el flujo de fluido a través de la cámara de separación. Las fracciones diferentes de células homogéneas se "eluyen" entonces incrementando el caudal a través de la cámara, o disminuyendo la velocidad centrífuga. Los caudales y velocidades de centrifugación apropiados se determinan empíricamente. Los lotes que consisten en 1,5 x 10⁸ células dispersas se introducen en el elutriador de Beckman (modelo J2-21 M/E; Beckman) vía una bomba (Cole Palmer) conectada a una fuente estéril de HBSS-BSA.

Las células mucosales dispersadas por la enzima se cargaron en la cámara elutriadora a una velocidad del rotor de 2500 rpm con un caudal de 25 ml/min., y se lavaron durante 2 min. Se recogió una fracción de 100 ml (F1) tras cambiar el caudal a 30 ml/min. Se obtuvo una segunda fracción de 100 ml (F2) a una velocidad del rotor de 2100 rpm y a un caudal de 55 ml/min. Las células de F2 se concentraron centrifugando a 200 x g durante 10 min., y

después se resuspendieron en medio de cultivo estéril (DMEM (47,5%) y F-12K de Ham que contiene 5,5 mM de glucosa, 5% de suero fetal de ternera, 2 ng/ml de factor de crecimiento de nervios, 8 mg/ml de insulina, mg/l de hidrocortisona, 50 mg/l de gentamicina, 0,25 mg/l de anfotericina B, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/l de estreptomina y 20 μ M de citosina- β -D-arabinofuranósido.

5 Las células endocrinas mucosales resultantes se immortalizaron condicionalmente según Kobayashi et. al. (Science 287:1258 (2000)). Las células mucosales cultivadas se transdujeron con un vector retrovítico estándar incompetente para la replicación que posee un constructo genético que consiste en el promotor de GIP enlazado operativamente a un oncogén (por ejemplo, telomerasa, antígeno T grande, v-myc, ras, entre otros) fusionado en tándem a un IRES y un gen *HSV-tk*. La insulina y el marcador de selección se expresan bicistricamente. El constructo genético está flaqueado por sitios de reconocimiento de recombinasas, para permitir el corte del oncogén y por tanto la desinmortalización de las células antes del trasplante.

15 Para establecer una estirpe de células K inmortalizada, se examinan los clones supervivientes de células – transducidas con el vector retrovítico que posee el promotor de GIP enlazado a un oncogén – en busca de la expresión de GIP mediante tinción inmunofluorescente y transferencia Western. Los clones que expresan cantidades satisfactorias de GIP se expanden posteriormente para establecer una estirpe de células K. La estirpe de células K se transduce posteriormente con un vector retrovítico que posee un constructo genético que consiste en el promotor de GIP enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica insulina humana y un marcador de selección positivo. La insulina y el marcador de selección se expresan bicistricamente. Las células K transfectadas se incuban con fármaco de selección apropiado. Los clones que sobreviven se aíslan y se ensayan para determinar la expresión de insulina humana mediante transferencia Western y ELISA (ALPCO).

25 Los clones de células K que expresan niveles apropiados de insulina humana se cultivan hasta que se obtiene un número suficiente de células. Antes del trasplante en un sujeto mamífero, la estirpe de células K que expresa insulina humana se desinmortaliza mediante corte del oncogén. Esto se logra transfectando células con adenovirus que expresa la recombinasa apropiada (por ejemplo cre, flp, entre otras). Veinticuatro horas a cuarenta y ocho horas después de su transfección, las células se incuban en ganciclovir. Después de una exposición de 78 horas a ganciclovir, las células supervivientes (10^6 - 10^{12} células) se purifican y se preparan para su trasplante en un sujeto mamífero.

35 Como alternativa, las células precursoras mucosales o células madre se aíslan de biopsias duodenales mediante disociación enzimática (por ejemplo termolisina), y se expanden en cultivo como se describe previamente (Perraeault N. y Beaulieu J.F. Exp Cell Res 245:34 (1998); Perraeault N. y Beaulieu J.F. Exp Cell Res 224:354 (1996)). Estas células madre y células precursoras se transfectan con vectores víricos que poseen el constructo de GIP/Ins. Las células que se transfectan con éxito se seleccionan mediante incubación en fármaco de selección. Estas células genéticamente manipuladas son inducidas entonces a diferenciarse, y finalmente se transplantan en sujetos mamíferos.

40 En resumen, este ejemplo ilustra un método *ex vivo* para manipular células K y células precursoras endocrinas mucosales para producir insulina humana. Las células manipuladas mediante ingeniería se pueden transplantar nuevamente en el mismo sujeto o en un sujeto diferente. El trasplante se puede lograr mediante varias metodologías bien establecidas como se describe en la presente memoria, o conocidas en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden encapsular e implantar en la piel del sujeto mamífero, o las células se pueden implantar en el hígado a través del suministro de la vena porta.

Listado de secuencias

<110> KIEFFER, TIMOTHY J.
 CHEUNG, ANTHONY T.
 5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA EXPRESIÓN REGULADA DE PROTEÍNA EN EL INTESTINO
 <130> 029996/012 8307
 10 <140> PCT/IB 01/00722
 <141> 12-03-2001
 <160> 18
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 25 <400> 1
 ccagccgcag cctttgtga 19
 <210>2
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 2
 ggtacagcat tgtccacaa tg 22
 <210>3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 3
 50 accaccagcc ctaagtgat 19
 <210>4
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 60 <400> 4
 ctagttgcag tagttctcca gc 22
 65 <210>5
 <211> 1319

<212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

5

```

ccgaaattac ccactacgtt ggaattctat aagggttggg tttgctgttt tgtttacagc 60
tgcgtctttg gcaccagca cagctgagtg gttctaagcc cacgtcgatg cttaacacat 120
ggttgttgaa tgaatacacg cgaagccggg tctcatttag gggcatgagt aggcagaggt 180
gtgggcagga agcaggaaag agcggaaaca ggtgcggaca gaaaggaggg gctctgaagg 240
atgccagtca gtgccaaact gtcattccaga taccaggttc actgtggccc taggccaggc 300
tgcacggggc tccccatgtg gtctgcccag ggtgagagca gaactgcggg gggcggggca 360
gaaggaaacc aaccaggaag cagggttgca cccaaattat ccaggtttta agtacattta 420
agagacaagg ctgggctggt gaaggtcaga ggtgtccctg ggggtgctgga ctaggactga 480
ccacttctgt tttagttaa tggtgagaac tgcctcacac tgctacctgc cttacttgcc 540
ccttgagagc tgtgagccta ggaccacccc atgtgtgggt tggacctca gtcacacact 600
gaacgtgtgt gaagccactg gttgtcagag cagggtcttc ggcactgagg aagcagtga 660
cactatcccc tatcaaata caattaaata cacacagaat gcgaggcaca caactgagtt 720
tcaggagagg cctcgctcag gcaaggggtt caagaggctt ctgtgggacc cgctggatgt 780
tccagggagt tcttaaagat gggcgtgcct ccagccaagt gaaatcaaga gaaaagtacg 840
cgaagtatag gaaaactcag cagtctggag aggtaaatag gggaggaatc cgaggctcag 900
agacaggagt gacttgccca cggacgcaca gcaagttggc aggtggagtt cagctgtgcc 960
accttctgaa gccgggtacc ctttacagcc accagataca agcgggatag agacagctga 1020
tggagaagct ggaggtgggg ggcgggaccc cgaaggtggg gaaagggcgc gggggggcgg 1080
tcctatgacg taatttctct ggtgtgtgcg cgcgtgtgcg tgcgtgtgcg tgtatataaa 1140
agccggcata gcattgctgc tgetgcccgc gccaccgcca ccatcaccgc tgttaccacc 1200
accgctactg cagtgttccc gctggtgcag agctttggta gccagactac agaccactc 1260
ccgccatcct cctgcagcag ctegtccact ctttcgcgac cgtccggctc gctatgcgc 1319
    
```

<210>6
 <211>1760
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 6

15

```

gggaaacttc tctagctctt tcattagggg ccctgtgttc catctaatag ctgactgtga 60
gcatccactt ctgtgcttgc caggcactgg catagcctca caagagacag ctatatcagg 120
gtcttgtcag caaaatcttt ctggcatatg caatagtgtc tgggtttggg gggtgtatat 180
gggctggatc cccgggtggg gcagtctctg gatggctctt ctttcctct tagctccaaa 240
ctttgtctct gtaactcctt ccatgggtac tttgtttccc attctaagaa ggagcaaaagt 300
atccacactt ccttcttctt ccttcttctt gagttttgca aatgccacaa aactttcaaa 360
gccttctgaa tagccttctc tttagtgtt tccaatgtat attaaaataa tctatctttc 420
atccccattg attaaagcct tcttaaagcc agaaaactat attcattttt ttcttttccc 480
agtagttcac aaactatctg gcacctcata agcatcataa ctcagttggg gggtagataa 540
aattggaatg tgattgttca gtcagcagag acttttagag gacctcatak aacaagattc 600
tctcagttct cagaaatata tttcagtata tacagggtta gaggactcac atctttaata 660
aaataaagtt aaaaatttag acctgtataa attattaagg tacctaatac agttccacgg 720
caaagtacag ccatggttat gaattataaa tccaagaagc ggtgggttaa ctctgacatt 780
    
```

```

gttccttggg  tggttctcat  tcattgaagt  tagtcacctc  aacttactca  accaaaacct  840
agaagtattt  ctgtgggtact  atgttctctt  gatgcccaaga  gggctctagg  catatgaaaa  900
tctctcaatc  tctctccctc  tctctcccc  ttccaccccc  actctctctc  ttctagcagt  960
aatccctccc  ttccctggtag  gcagtatggt  ttttggagca  cagtttctta  gctatctctt  1020
gcaacacctg  attttgtctga  agatttgaat  ggctctatat  agaagtatca  acaacttgag  1080
cgtctgtgaa  ctctcatttt  gacactgtgc  tgaaagaatt  ggagttgatt  ctcatataaa  1140
aaaaaattaa  gcatctcacc  ttttttgtct  aaactaaaca  gttttaaacc  agttctgcct  1200
ggagtcatga  tatgaaatac  gatctatcat  atttgcaatg  ttctgttcaa  ttgtggctgc  1260
accaggaat  gagaagctat  ttctttatag  gcacaaataa  aaagatagtc  attatctgta  1320
aaattcttat  gacatggcag  caagcccaag  aaacctttct  aaacaaggcg  tgaaaacgca  1380
gagatgtcct  tgcaattagt  catgtctatc  tgacagattt  cttcctttct  aaggaattt  1440
gtgctgaaca  ttttatttct  agcctcagag  ataaaagaag  ggggaagaag  ctgtagtttt  1500
tgctacataa  gacaggtggc  gtaagcatgc  aacgctttaa  aaaaatatct  aaagtgattg  1560
ttttctctcg  gattctttga  aaaagctcgc  ctgctgctgg  gtttgagggt  gagccggtga  1620
cgtcagcgtg  gaatgcggag  tcagggcccc  aggctctcta  taagccgagg  agctgtccgg  1680
tgctgaaacg  gcccgagccc  tcactcagcg  gcagagagga  gcatgcttgg  agccttccc  1740
ataatataag  acagaggtaa  .  .  .  .  .  1760

```

<210>7
 <211> 2623
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 7

```

agctttaggt  gtgtgaatat  ctactttggg  gctagggcct  tggtcatact  aagtaagttt  60
ccccttcact  ggggtgtacc  agtttaccct  ggactgtcta  agcaacaaga  aggatagaca  120
tggcctacca  cagatttcat  gtctgccact  ggctatgtca  gaacatgtag  gagcttttgg  180
aatcagtgaa  acaggatatt  tcagactgcc  ttccctgcgt  ggggctttcc  cgaagccata  240
tttttcctag  agtcagcctt  tcccagctga  ggacaagctg  tactggacag  atgccagcca  300
cttgaactgg  gaatacatgg  tcatttaggc  agctggctta  tctcatccat  ggtacttgat  360
ggcttcgggt  cagcacctca  cagaaagttc  agacgggagg  ctcccgagaa  aacagagaag  420
caggcaggag  atcctgcagg  caatcctcct  gctccacagc  ctgcatggac  ttccctcagc  480
cttagtgctg  gtgggtccca  tctgagaaca  ttggttatat  gttattttca  aaccgatctg  540
cctttaagga  gtggaagaaa  aaaactgtgg  tgtttgggct  acctttatga  taatggcctt  600
ttcatcctcc  taataaatat  tgccaagtag  ggtagattct  atacgaaagc  tcttaacca  660
tgggtattagc  aaatcatgta  ggtgctaata  atgaatactg  gatgcagtca  gtacagggat  720
ataaaatgga  atgtaagagc  ctggtgctat  gaatggttag  ctaactagat  gttgtacaag  780
aaatggtgac  gttatgacgt  gtggaaactt  ggtattgaag  atgtggactc  gaaactttgt  840
ggattttttg  atgccatgat  aaaaatgtga  agaatactgt  tccttacc  aaagaagaag  900
aagaaggaga  aggaggagga  agaggaggag  gaggaagaag  agggggagga  agaagaagag  960
aaggaggagg  aagaggagga  ggaggaagaa  gagggaggag  aggaagaaga  agagaaggag  1020
gaggactagg  aggaggagga  gaagaaggag  aaggggaagg  agagagtagc  cagaacattt  1080
ggggtgccat  cagaatacca  gatactccag  acatagtcac  agaaggactg  gtttgtttgt  1140
taaataagtg  ctttgaaaag  tttgtgggga  aacctgcagt  gagattgtgt  gtcttagaaa  1200
tgataggcaa  gattcatcca  caagaatgcg  acaagatggc  tgctgaaca  agcctgaac  1260
attaacagca  ccagtagacc  tgcttacacg  gaagaaagca  atctcatagg  cctcacc  1320
aaacaaagac  tacagacagc  agaggaactg  gagagcagga  gaaattgggt  ctcccttta  1380
tgagccccct  aactggttgt  caaatactca  atggctcagc  ctgaaatcat  atgcacaaag  1440
taatactagc  gcaactgaac  agattgtagc  tgtgtgtgtg  tgtgtaatga  taacaaagaa  1500
gaaaaggccc  catggttagag  agggagcaag  gtgggcatgg  aggtatggaa  ggagtggaa  1560
ggaggggtga  gaaggggaaa  gtgatgtaat  tatcttttaa  tttataaaaa  aataaaaaat  1620
gggctggtga  gatggctcag  tgggtaagag  caccgactg  cttcttccga  aggtctggag  1680
ttcaaatccc  agcaaccaca  tgggtgctca  caacctccg  taacgagatc  tggcgccctc  1740
ttctggagtg  tctgaagaca  gctacagtg  acttacatat  aataaataaa  taaatctttt  1800
aaaaaaaata  aaaaataaaa  tattagaata  aaatgtagag  gaatattttt  aatttaacaa  1860
cttgggtgtg  gcaaaagctt  tcttcaacaa  aaacttaate  cctcagataa  gaaaagacta  1920

```

10

ES 2 374 061 T3

```

gaatccacga cgtggataga tacttctgta tgatgcaaga cactatztat caggttgtaa 1980
cttgagcaga acttgagttg taacttggtg ggaaacacaa cacccttggc aaacaaaaga 2040
ttactagata ttttagatga aatataaaaa tactttccac aactgatagg taggaaacag 2100
ttcaatagta atataattat tgaacaaata atccttaaaa gaagaaatcc agaggâatag 2160
caagttaggg gaagagaggg tgtgtgtgtg tgtgtgtgcg cgcacattta tagccaaaat 2220
agatgatata cttaaagaa catgccatta aaaccatta ttttgcatc agtttacata 2280
tgctaataaa tacttaaaaa aaaaacattg ggattggaga gaaatggctc agtggttaag 2340
agttcaattc ccagcaacca catgattgct cacaaccatc tgtaatggga tctgatgcct 2400
tcttctggta tgtctgaaga aagtgaccgt gtacttataa ttataaataa ataaatcttt 2460
aaccataaaa ccccataat ttcaacaaca gatatgtcct ggtctgaggc ttccaggcat 2520
agaaatagaa acacacagag tgtggagcca gtgcggttca ggtccgcat tccagttcag 2580
gcttcagacc aagagaaagg gaaaagaaga gacaagcaac aag 2623

```

<210>8
 <211>226
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8

```

tccagaaat gcgcgatcca ggccggcggg cggggcgggg gctccggcga gagggcgggc 60
cccgggaacg gcggcgggcg gggcgggagg cggggcccgg cccgtaaga agagcgtggc 120
cggccgcggc caccgctggc cccagggaaa gccgagcggc caccgagccg gcagagacc 180
accgagcggc ggcggaggga gcgacgccgg ggcgcacgag ggcacc 226

```

<210>9
 <211> 110
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
  1           5           10           15
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
          20           25           30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35           40           45
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
          50           55           60
Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
          65           70           75           80
Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
          85           90           95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100           105           110

```

<210> 10
 <211>450
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 374 061 T3

<400> 10

```

gctgcatcag aagaggccat caagcacatc actgtccttc tgccatggcc ctgtggatgc 60
gcctcctgcc cctgctggcg ctgctggccc tctggggacc tgaccagecc gcagcctttg 120
tgaaccaaca cctgtgcggc tcacacctgg tggaaactct ctacctagtg tgcggggaac 180
gaggcttctt ctacacaccc aagaccggcc gggaggcaga ggacctgcag gtggggcagg 240
tggagctggg cgggggccc ggtgcaggca gcctgcagec cttggccctg gaggggtccc 300
tgcagaagcg tggcattgtg gaacaatgct gtaccagcat ctgtccctc taccagctgg 360
agaactactg caactagacg cagcccgcag gcagccccc acccgccgcc tctgcaccg 420
agagagatgg aataaagccc ttgaaccagc                                     450
    
```

5 <210> 11
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 11

```

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
  1              5              10              15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
              20              25              30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
              35              40              45

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
  50              55              60

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
  65              70              75              80

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln
              85              90              95

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
              100              105              110

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
              115              120              125

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
              130              135              140

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
              145              150              155              160

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
              165
    
```

15 <210> 12
 <211> 3408
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 12

tctgttttca ggccaagaa gcccatcctg ggaaggaaaa tgcattgggg aaccctgtgc 60
ggattcttgt ggctttggcc ctatcttttc tatgtccaag ctgtgcccac ccaaaaagtc 120
caagatgaca ccaaaaccct catcaagaca attgtcacca ggatcaatga catttcacac 180
acgcagtcag tctectccaa acagaaagtc accggtttgg acttcattcc tgggctccac 240
cccacctga ccttatccaa gatggaccag aacttgccag tctaccaaca gatcctcacc 300
agtatgcctt ccagaaacgt gatccaaata tccaacgacc tggagaacct ccgggatctt 360
cttcacgtgc tggccttctc taagagctgc cacttgccct gggccagtgg cctggagacc 420
ttggacagcc tggggggtgt cctggaagct tcaggctact ccacagaggt ggtggccctg 480
agcaggctgc aggggtctct gcaggacatg ctgtggcagc tggacctcag ccctgggtgc 540
tgaggccttg aaggctactc ttctgcaag gactacgta agggaaggaa ctctggcttc 600
caggtatctc caggattgaa gagcattgca tggacacccc ttatccagga ctctgtoaat 660
ttccctgact cctctaagcc actcttccaa aggcataaga ccctaagcct ccttttgcct 720
gaaaccaaaag atatatacac aggatcctat tctcaccagg aagggggtcc acccagcaaa 780
gagtgggctg catctgggat tcccaccaag gtcttcagcc atcaacaaga gttgtcttgt 840
cccctcttga cccatctccc cctcactgaa tgcctcaatg tgaccagggg tgatttcaga 900
gagggcagag gggtaggcag agcctttgga tgaccagaac aaggttccct ctgagaattc 960
caaggagttc catgaagacc acatccacac acgcaggaac tcccagcaac acaagctgga 1020
agcacatggt tatttattct gcattttatt ctggatggat ttgaagcaaa gcaccagctt 1080
ctccaggctc tttggggtca gccagggcca ggggtctccc tggagtgcag tttccaatcc 1140
catagatggg tctggctgag ctgaacccat tttgagtgcac tggaggggtg ggttcatctg 1200
agcaagagct ggcaaagggtg gctctccagt tagttctctc gtaactggtt tcatttctac 1260
tgtgactgat gttacatcac agtgtttgca atggtgttgc cctgagtgga tctccaagga 1320
ccaggttatt ttaaaaagat ttgttttgc aagtgtcata ttaggtgtc tgcaccag 1380
gggtgggaat gtttgggag aagggagaag gatctagaat gtgtttctg aataacattt 1440
gtgtgggtgg tctttggaa ggagtggat cattttctta tcttctgcaa ttgcttagga 1500
tgtttttcat gaaaatagct ctttcagggg ggttgtgagg cctggccagg cacccctgg 1560
agagaagttt ctggccctgg ctgaccccaa agagcctgga gaagctgat ctttgettca 1620
aatccatcca gaataaaacg caaagggctg aaagccattt gttggggcag tggtaagctc 1680
tggctttctc cgactgctag ggagtggctt ttccatcat ggagtgcag tcccacactg 1740
gtgactgcga tcttcagagc aggggtcctt ggtgtgacce tctgaatggt ccagggttga 1800
tcacactctg ggtttattac atggcagtg tctatattgg ggcttgcag ccaaattgta 1860
gttcttgtct gattggctca cccaagcaag gccaaaatta ccaaaaatct tggggggtt 1920
ttactccagt ggtgaagaaa actcctttag caggtggctc tgagacctga caagcactgc 1980
taggcgagtg ccaggactcc ccaggccagg ccaccaggat ggcccttccc actggaggtc 2040
acattcagga agatgaaaga ggaggtttgg ggtctgccac catcctgctg ctgtgtttt 2100
gctatcacac agtgggtggt ggatctgtcc aaggaaactt gaatcaaagc agttaacttt 2160
aagactgagc acctgctca tgctcagccc tgactggtgc tataggctgg agaagctcac 2220
ccaataaaca ttaagattga ggccctccct cagggatctt gcattcccag tggtaaaacc 2280
gactcacc atgtgccaag gtgggttatt taccacagca gctgaacagc caaatgcag 2340
gtgcagttga cagcaggtgg gaaatggtat gagctgaggg gggccgtgc caggggccca 2400
cagggaaacc tgcttgcact ttgtaacatg tttacttttc agggcatctt agcttctatt 2460
atagccacat cctttgaaa caagataact gagaatttaa aaataagaaa atacataaga 2520
ccataacagc caacaggtgg caggaccagg actatagccc aggtcctctg ataccagag 2580
cattacgtga gccaggtaat gagggactgg aaccaggag accgagcgtt ttctggaaaa 2640
gaggagtttc gaggtagagt ttgaaggagg tgagggatgt gaattgcctg cagagagaag 2700
cctgttttgt tggagggtt ggtgtgtgga gatgcagagg taaaagtgtg agcagtgagt 2760
tacagcgaga ggcagagaaa gaagagacag gagggcaagg gccatgctga agggacctg 2820
aagggtaaag aagtttgata ttaaaggagt taagagtagc aagtctaga gaagaggctg 2880
gtgctgtggc cagggtgaga gctgctctgg aaaatgtgac ccagatcctc acaaccacct 2940
aatcaggctg aggtgtctta agccttttgc tcacaaaacc tggcacaatg gctaattccc 3000
agagtgtgaa acttctcaag tataaatggt tgtctgtttt tgtaacttaa aaaaaaaaaa 3060
aaaagtttgg ccgggtgcgg tggtcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggccaagg 3120
tggggggatc acaaggcac tagatggcga gcacctggc caacatggtg aaaccccgtc 3180
tctactaaaa acacaaaagt tagctgagcg tgggtggcgg cgctgtagt cccagccact 3240
cgggaggctg agacaggaga atcgcttaaa cctgggaggc ggagagtaca gtgagccaag 3300

atcgcgccac tgcactccgg cctgatgaca gagcgagatt cegtcttaaa aaaaaaaaaa 3360
aaaaagtttg ttttaaaaa aatctaataa aaataacttt gccccctg 3408

ES 2 374 061 T3

<210> 13
 <211>136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 13

Gly Ser Ala Ala Gly Leu Leu Arg Leu Glu Thr Pro Ser Gln Leu Arg
 1 5 10 15
 Pro Asn Pro Lys Ala Met Asn Ser Gly Val Cys Leu Cys Val Leu Met
 20 25 30
 Ala Val Leu Ala Ala Gly Ala Leu Thr Gln Pro Val Pro Pro Ala Asp
 35 40 45
 Pro Ala Gly Ser Gly Leu Gln Arg Ala Glu Glu Ala Pro Arg Arg Gln
 50 55 60
 Leu Arg Val Ser Gln Arg Thr Asp Gly Glu Ser Arg Ala His Leu Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Leu Ala Arg Tyr Ile Gln Gln Ala Arg Lys Ala Pro Ser Gly
 85 90 95
 Arg Met Ser Ile Val Lys Asn Leu Gln Asn Leu Asp Pro Ser His Arg
 100 105 110
 Ile Ser Asp Arg Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser
 115 120 125
 Ala Glu Glu Tyr Glu Tyr Pro Ser
 130 135

10 <210> 14
 <211>685
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 14

ggctcagctg ccgggctgct cgggttgaa acgccaagcc agctgcgtcc taatccaaaa 60
 gccatgaaca gcggcgtgtg cctgtgctgt ctgatggcgg tactggcggc tggcgccctg 120
 acgcagccgg tgccctccgc agatcccgcg ggctccgggc tgcagcgggc agaggaggcg 180
 ccccgtaggc agctgagggt atcgcagaga acggatggcg agtcccgagc gcacctgggc 240
 gccctgctgg caagatacat ccagcaggcc cggaaagctc cttctggacg aatgtccatc 300
 gttaagaacc tgcagaacct ggaccccagc cacaggataa gtgaccggga ctacatgggc 360
 tggatggatt ttggccgtcg cagtgccgag gagtatgagt acccctccta gaggaccag 420
 ccgccatcag cccaacggga agcaacctcc caaccagag gaggcagaat aagaaaacaa 480
 tcacactcat aactcattgt ctgtggagtt tgacattgta tgtatctatt tattaagtcc 540
 tcaatgtgaa aaatgtgtct gtaagattgt ccagtgcaac cacacacctc accagaattg 600
 tgcaaatgga agacaaaatg ttttcttcat ctgtgactcc tggctgaaa atgttggtat 660
 gctattaaag tgatttcatt ctgcc 685

20 <210> 15
 <211> 1362
 <212> ADN
 <213> *Rattus sp.*

<400> 15

ES 2 374 061 T3

```

aattcgcgcg ctaagccgca ttattcacgt ttccagacat gtcacaaata cagctaattc 60
ctacaacctg agctgtgtca tggggggggg ggggaatcacc cacagcattt aatctgctgc 120
tgttttaaac acgttgcttc taagtaaaga gaccgctaga gccacaacca ggaacctaac 180
tgctgctggc atcacttgcc ttttcatagt ctccctcagc cggaaccccc ccacgctggg 240
tgccttctct atttagaaag agtttctaag cctttctcct tcaccctaga ctggcaaggt 300
tgagggtagg ctgaggggtg caagactgtg agaaaagggg gccctctct tcttcttggc 360
cggtagatct ctacagcaag atcctcacca cccagtggaa tcccgtaact ctagaggaaa 420
ggaagaactc tagaggacgg gaagatcatt gcaagctccc ctatagtgct gagcccagcc 480
cgctccactc agccagccag agcttgaggg tgetttagac actctctggc gccacttctc 540
gacaaaaatc atcggtagat gtaggctggg gagaagtcat cttgggaaga aatggaaacc 600
ttttcccaa aggctttccg cacaaaagge aagagctgca cccaggatct taaaattctg 660
taagacgaga atccacgagg ccaactgtga ttgagttctg aaaaattgag agccctactc 720
ccctctctca cttgtgggag cccactcagg tctgaagtgc tcccagagaa catgccagaa 780
ttacatttgc tgacacctag tctgtgaggg tccccgggtt tcctggaagg atttgatccc 840
tcaaagctca ctaaacagtg gtcagcttct ccattccaga caaactcctg cttctctccg 900
ggagtagggg tggcaccctc cctgaagagg actcagcaga ggcaccgaac aggggtgggga 960
ggaaagctgt ttagataaag aggaggactc atacaaagta ccccgctggg gaggggctat 1020
cctcattcac tgggccggtt ccttctctcc ggggggccac ttcgatcggg ggtctctcca 1080
gtggctgctc ctgagcacgt gtctgcccgg actgctcag cactgggtaa acagatgact 1140
ggctgcttac cgggcggggc tatttaagag gactgcctc gccgctgcc ctcaacttag 1200
ctggacagca gccgttggaa accgccaagc cagctgactc cgcattccgaa ggtaagtggc 1260
tggcagatcc aagaatcatg agtgtgaaga actggcctgt agctttgcat ctattgcccgt 1320
ttagtctttc cattttctgt gccttccctc acttgacagc tg 1362

```

- <210> 16
- 5 <211> 217
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 16
- 10

ES 2 374 061 T3

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30

Ser Arg Pro Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 210 215

<210> 17
 <211>799
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17

```

cgaaccactc agggctctgt ggacagctca cctagctgca atggctacag gctcccggac 60
gtccctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg cttcaagagg gcagtgcctt 120
cccaaccatt cccttatcca ggcttttga caacgctatg ctccgcgccc atcgtctgca 180
ccagctggcc ttgacacct accaggagt tgaagaagcc tatatccaa aggaacagaa 240
gtattcattc ctgcagaacc ccagacctc cctctgttcc tcagagtcta ttccgacacc 300
ctccaacagg gaggaaacac aacagaaatc caacctagag ctgctccgca tctccctgct 360
gctcatccag tcgtggctgg agcccgtgca gttcctcagg agtgtcttcg ccaacagcct 420
gggtgacggc gcctctgaca gcaacgtcta tgacctcta aaggacctag aggaaggcat 480
ccaaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagcccccg actgggcaga tcttcaagca 540
gacctacagc aagttcgaca caaactcaca caacgatgac gcactactca agaactacgg 600
gctgctctac tgcttcagga aggacatgga caaggctgag acattcctgc gcategtgca 660
gtgccgctct gtggagggca gctgtggctt ctagctgccc ggggtggcatc cctgtgacct 720
ctccccagtg cctctctctg ccctggaagt tgccactcca gtgccacca gccttgtcct 780
aataaaatta agttgcatc                                     799
    
```

<210> 18
 <211> 1167
 <212> ADN
 <213> *Rattus sp.*

5

<400> 18

```

atctctccag tcccttctc aaccttctga gaacaggcaa actccaccat gattggctta 60
taaatcgtta tatggacct ctaaggatgt aacaactggg agcatgctta cctagcatgt 120
ccgaaaccgg gagttcagtc cctagcactg cacaactctca gtccttatga agtagaggga 180
agatcagagg ttcaaggaca acatcaattt gagaccagcc tgggctactt accaaagaaa 240
gaaagagaga aataaataaa tagatagata aataaataaa taagtaaata aatatcttat 300
    
```

10

```

ggctggagag ttggttcagt gtttaagagc acttattgtg gggttgggga tttatctcag 360
tggtagagcg tttgcctagg aagctcaagg ccttgggttc ggtccccagc tccggaaaca 420
aaacaaaaca aaacaaaac aaacaaacaa acaaaaaacc ctgtctggaa aacacctaaa 480
taaagatata tatatataat atatatacat ataatatata tatgatata atatatatat 540
atatctttgt ggaggaagct ataccttctt ttcttgagcc tccaacacat aaatgtgcc 600
tgtcatccca ttcataattgc cccaagtggg aaacctatgt actataaact ctaagttcct 660
agtcactagg aactctcaag acacctacct caggcagcat cacttccgga gtgccaccat 720
tatcagttaa catccacatc tgggattcag atcccagatc ccttctgttc cctcagaagt 780
cacctacagc tttgtggggg tgccccttcc ctgagagagt gccaccggag ttgaccctca 840
ccaaggcaac cctttgtacc cacagaatcc aacaggaagt agggggaaga acagccggcc 900
ctgtgcccag aaaaaagag gggagggaga aggggtgct cagcctacca ccgggcaggt 960
cccagataac actgcagata cccaaatgtt aatcaccatc tagcacaggc ccagagcaaa 1020
ggggaaagtg attaggtgta taatggggtt cactgggcag gagcagtggg cttgagcttc 1080
aaagataaga ggttttcagg ttaatcagca ccctgtgggt tgtggatata aggaagctaa 1140
cacagggtct tgaagcaaga tcttgag                                     1167
    
```

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* o *ex vivo* para generar una célula mucosal del intestino que produce una proteína en respuesta a un nutriente, que comprende:
- 5 (a) poner en contacto una célula mucosal del intestino o una célula madre mucosal del intestino con un polinucleótido que comprende un elemento de control de la expresión, funcional en células mucosales del intestino, en enlazamiento operativo con un ácido nucleico que codifica una proteína en condiciones que permiten la transformación de la célula *in vitro* o *ex vivo*, en el que el elemento de control de la expresión
- 10 comprende un promotor del polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP) o un promotor de glucocinasa, cromagranina A, cromagranina B, colecistocinina, proglucagón, adenosina desaminasa, secretina, gastrina, somatostatina, motilina o grelina; y
- 15 (b) identificar un transformante celular que produce la proteína de manera regulada por glucosa, sacarosa, fructosa, hidrato de carbono, polipéptido, un aminoácido o grasa, generando de este modo una célula mucosal del intestino que produce una proteína en respuesta a un nutriente.
2. Célula mucosal del intestino aislada o cultivada que produce una proteína de manera regulada por un nutriente, en la que la expresión de la proteína es conferida por un transgén que comprende un elemento de control de la
- 20 expresión, funcional en células mucosales del intestino, en enlazamiento operativo con un ácido nucleico que codifica la proteína, en el que el elemento de control de la expresión comprende un promotor del polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP) o un promotor de glucocinasa, cromagranina A, cromagranina B, colecistocinina, proglucagón, adenosina desaminasa, secretina, gastrina, somatostatina, motilina o grelina.
- 25 3. Célula mucosal del intestino según la reivindicación 2, en la que el nutriente aumenta la expresión o secreción de la proteína.
4. Célula mucosal del intestino según la reivindicación 2 ó 3, en la que el ácido nucleico codifica insulina.
- 30 5. Célula mucosal del intestino según la reivindicación 2 ó 3, en la que el ácido nucleico codifica leptina, GLP-1, GLP-2, colecistocinina, un antagonista de glucagón, una hormona del crecimiento, un factor de coagulación, o un anticuerpo.
- 35 6. Célula mucosal del intestino según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la célula mucosal del intestino se obtiene de un sujeto.
7. Célula mucosal del intestino según la reivindicación 6, en la que el sujeto es un ser humano.
- 40 8. Célula mucosal del intestino según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en la que la célula mucosal del intestino se obtiene de un tejido u órgano del tubo digestivo, o se deriva de una estirpe celular de origen intestinal.
9. Célula mucosal del intestino según la reivindicación 8, en la que el tejido es el estómago o el duodeno.
- 45 10. Célula mucosal del intestino según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en la que la célula mucosal del intestino es una célula endocrina.
11. Célula mucosal del intestino según la reivindicación 10, en la que la célula endocrina es una célula K.
- 50 12. Célula mucosal del intestino según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en la que la célula mucosal del intestino es una célula madre o una célula no endocrina.
13. Célula mucosal del intestino según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en la que el elemento de control de la expresión, funcional en células mucosales del intestino, en enlazamiento operativo con un ácido nucleico comprende además un vector.
- 55 14. Célula mucosal del intestino según la reivindicación 13, en la que el vector comprende un vector vírico.
15. Uso de una o varias células mucosales del intestino según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14 para la preparación de una composición farmacéutica o dispositivo para tratar a un sujeto que tiene, o está en riesgo de
- 60 tener, un trastorno tratable produciendo una proteína en un tejido, con lo cual dicha composición o dispositivo se va a administrar mediante implantación en dicho tejido, y en el que dicho trastorno comprende una afección hiperglucémica u obesidad o una masa corporal indeseable.
- 65 16. Uso según la reivindicación 15, en el que la afección hiperglucémica comprende diabetes.
17. Uso según la reivindicación 15 ó 16, en el que el sujeto tiene un nivel de glucosa plasmática en ayunas superior

a 110 mg/dl.

18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que la célula mucosal del intestino expresa insulina.
- 5 19. Uso según la reivindicación 15, en el que la célula mucosal del intestino expresa leptina, GLP-1, GLP-2, colecistocinina, un antagonista de glucagón, una hormona del crecimiento, un factor de coagulación, o un anticuerpo.
- 10 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el tejido es un tejido mucosal.
21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el tejido es un tejido no mucosal.
22. Uso según la reivindicación 21, en el que el tejido no mucosal es hígado, páncreas o músculo.
- 15 23. Uso de un polinucleótido que comprende un elemento de control de la expresión, funcional en células endocrinas mucosales del intestino, en enlace operativo con un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica, con lo que la producción de la proteína terapéutica en células endocrinas mucosales del intestino que comprenden células K, células L, células S, células G, células D, células I, células Mo, células Gr o células enteroendocrinas, o células madre que se diferencian en células K, células L, células S, células G, células D, células I, células Mo, células Gr o células enteroendocrinas, es inducida poniendo en contacto dichas células endocrinas mucosales del intestino o dichas células madre con glucosa, sacarosa, fructosa, hidrato de carbono, polipéptido, un aminoácido o grasa, para la preparación de una composición farmacéutica o dispositivo para tratar un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, un trastorno tratable produciendo una proteína terapéutica en un tejido mucosal, con lo que la administración de dicha composición o dispositivo a un sujeto da como resultado la transformación de células endocrinas mucosales del intestino que comprenden células K, células L, células S, células G, células D, células I, células Mo, células Gr o células enteroendocrinas, o células madre que se diferencian en células que comprenden K, células L, células S, células G, células D, células I, células Mo, células Gr o células enteroendocrinas, y en el que dicho trastorno comprende una afección hiperglucémica u obesidad o una masa corporal indeseable.
- 20 24. Uso según la reivindicación 23, en el que la afección hiperglucémica comprende diabetes.
- 25 25. Uso según la reivindicación 24, en el que la diabetes comprende diabetes tipo I.
26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que el sujeto tiene un nivel de glucosa plasmática en ayunas superior a 110 mg/dl.
- 30 27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que la diabetes comprende diabetes insulino dependiente.
- 35 28. Método según la reivindicación 1 o uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en el que el nutriente aumenta la expresión o secreción de la proteína.
- 40 29. Método o uso según la reivindicación 28, en el que la secreción de la proteína aumenta en las células endocrinas.
- 45 30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29, en el que el elemento de control de la expresión comprende un elemento constitutivo o regulado por un nutriente.
- 50 31. Uso según la reivindicación 30, en el que el elemento regulado por un nutriente comprende un promotor, una variante funcional del mismo, o una subsecuencia funcional del mismo.
- 55 32. Uso según la reivindicación 31, en el que el promotor comprende un promotor del polipéptido insulino trópico dependiente de glucosa (GIP) o un promotor de glucocinasa, cromagranina A, cromagranina B, colecistocinina, proglucagón, adenosina desaminasa, secretina, gastrina, somatostatina, motilina o grelina.
- 60 33. Método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 23 a 32, en el que el ácido nucleico codifica insulina, leptina, GLP-1, GLP-2, colecistocinina, una hormona del crecimiento, un factor de coagulación, o un anticuerpo.
34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 33, en el que la célula endocrina mucosal del intestino está presente en un tejido u órgano del tubo digestivo de un sujeto.
- 65 35. Uso según la reivindicación 34, en el que el tejido es el intestino o el tubo intestinal.
36. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 35, en el que la célula endocrina mucosal del intestino es una célula K.

37. Método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 23 a 35 ó 36, en el que el elemento de control de la expresión, funcional en células endocrinas mucosales del intestino, en enlazamiento operativo con un ácido nucleico comprende además un vector.
- 5 38. Método o uso según la reivindicación 37, en el que el vector comprende un vector vírico.
39. Animal transgénico no humano que produce insulina en un tejido mucosal del intestino, producción de insulina que no se produce de forma natural en el tejido mucosal del intestino del animal, producción de insulina conferida por un transgén presente en células del tejido mucosal del intestino, en el que el transgén comprende un polinucleótido que incluye un elemento de control de la expresión, funcional en células mucosales del intestino, en enlazamiento operativo con un ácido nucleico que codifica insulina, y en el que la producción de la insulina en el animal es sensible al nutriente.
- 10
40. Animal transgénico según la reivindicación 39, en el que el animal es un ratón.
- 15
41. Animal transgénico según la reivindicación 39 ó 40, en el que el elemento de control de la expresión comprende un elemento regulado por un nutriente.
42. Animal transgénico según la reivindicación 41, en el que el elemento regulado por un nutriente comprende un promotor inducible por glucosa, una variante funcional del mismo, o una subsecuencia funcional del mismo.
- 20
43. Animal transgénico según la reivindicación 42, en el que el promotor inducible por glucosa comprende un promotor del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP).
- 25
44. Animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 43, en el que el ácido nucleico que codifica insulina codifica una subsecuencia funcional de insulina.
45. Animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 44, en el que el tejido mucosal del intestino es un tejido u órgano del intestino.
- 30
46. Animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 44, en el que el tejido mucosal del intestino es el estómago o el duodeno.
47. Animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 46, en el que el tejido mucosal del intestino incluye células endocrinas.
- 35
48. Animal transgénico según la reivindicación 47, en el que la célula endocrina es una célula K.
49. Animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 46, en el que la célula mucosal del intestino es una célula madre.
- 40
50. Animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 49, en el que el animal es resistente a desarrollar una afección hiperglucémica.
- 45
51. Animal transgénico según la reivindicación 50, en el que la afección hiperglucémica comprende diabetes.
52. Célula mucosal del intestino aislada del animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 51, que produce insulina en respuesta al nutriente.

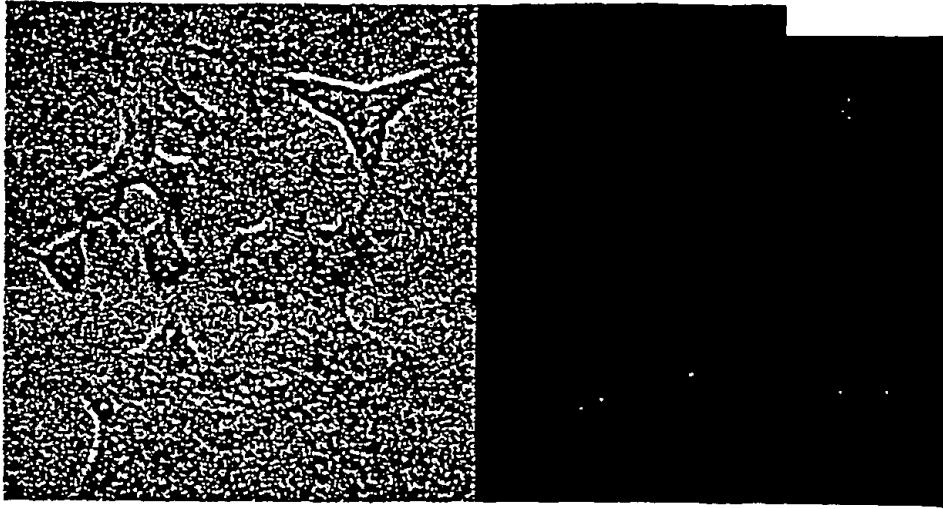


Figura 1

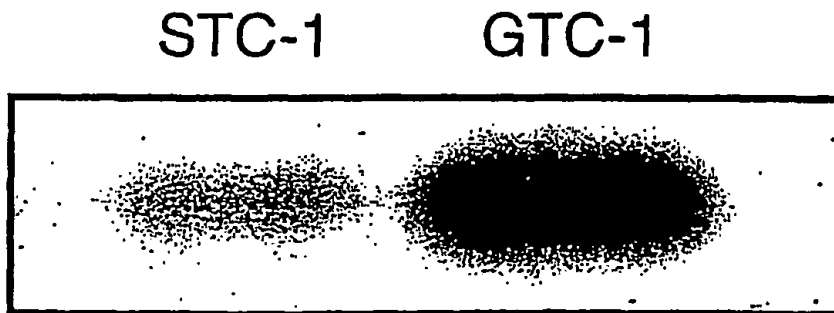


Figura 2

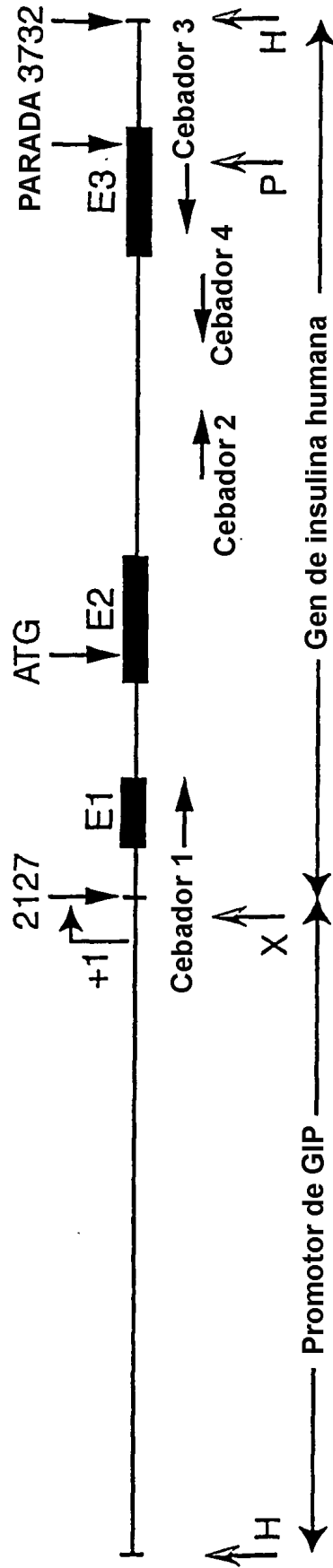


Figura 3

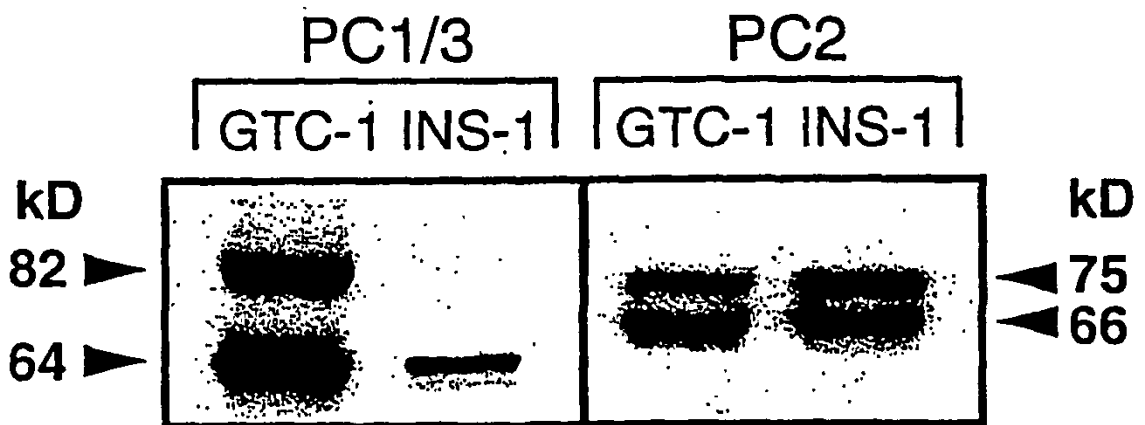
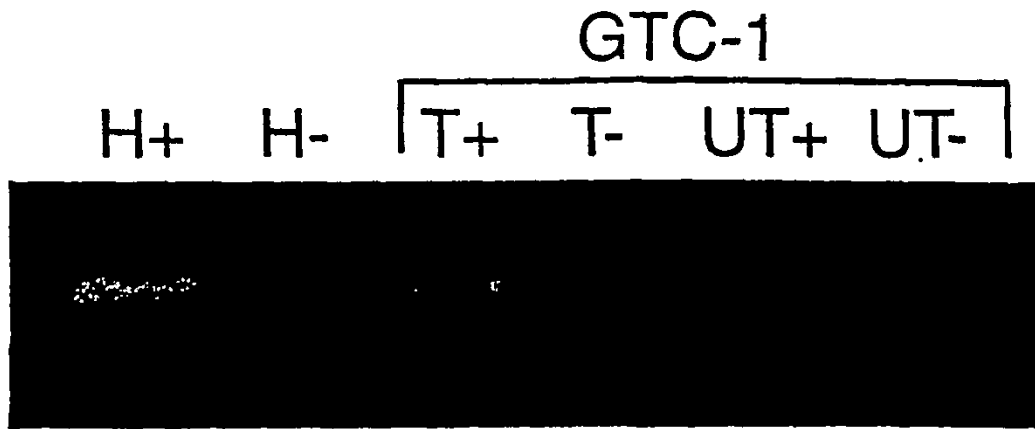


Figura 4

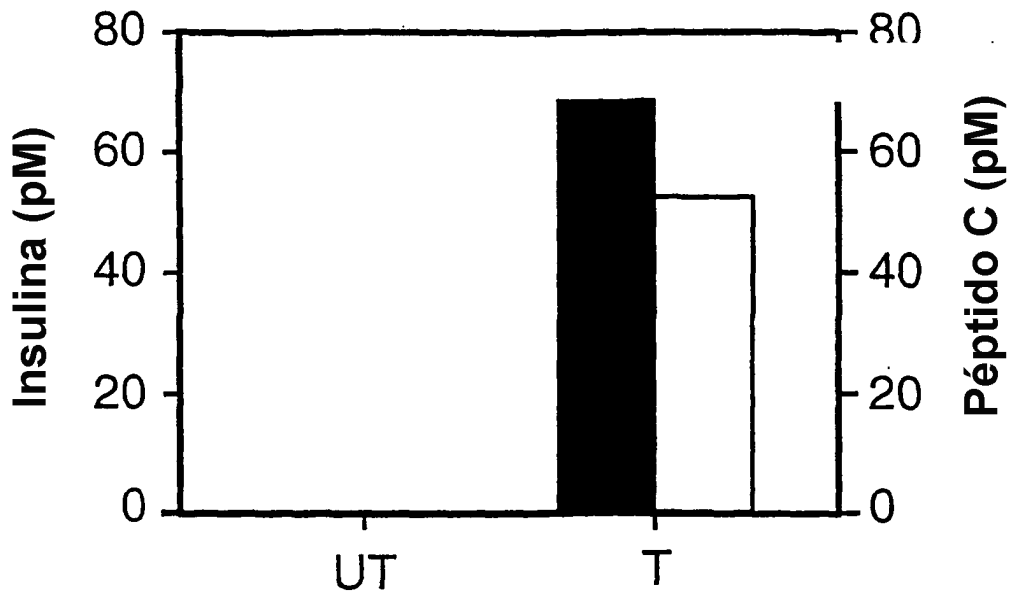


Figura 5

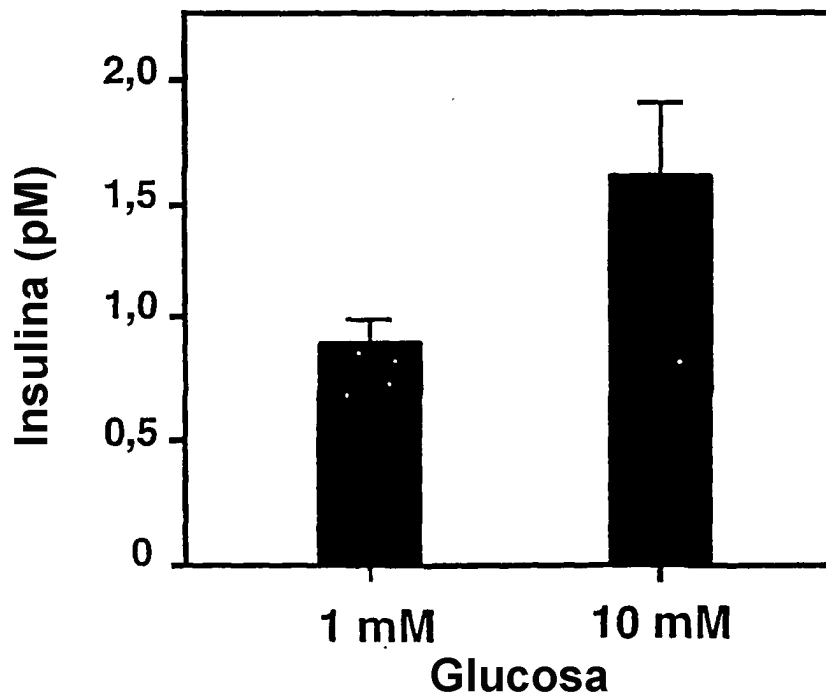


Figura 6

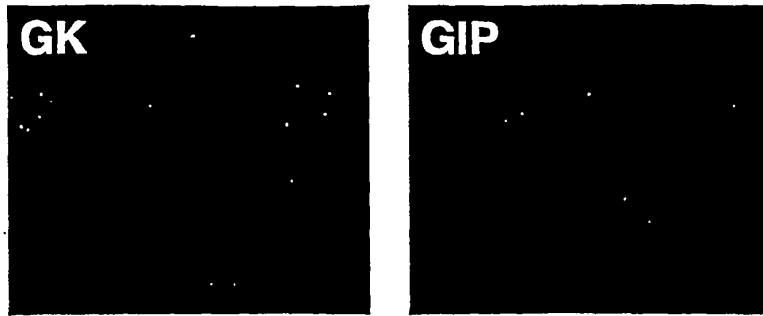


Figura 7

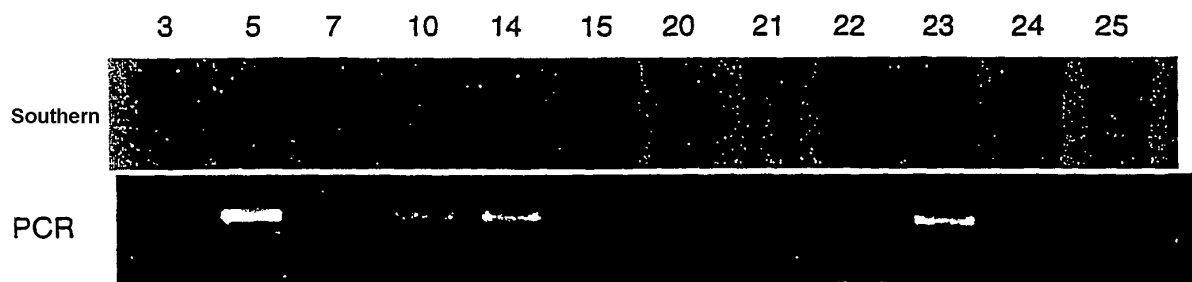


Figura 8

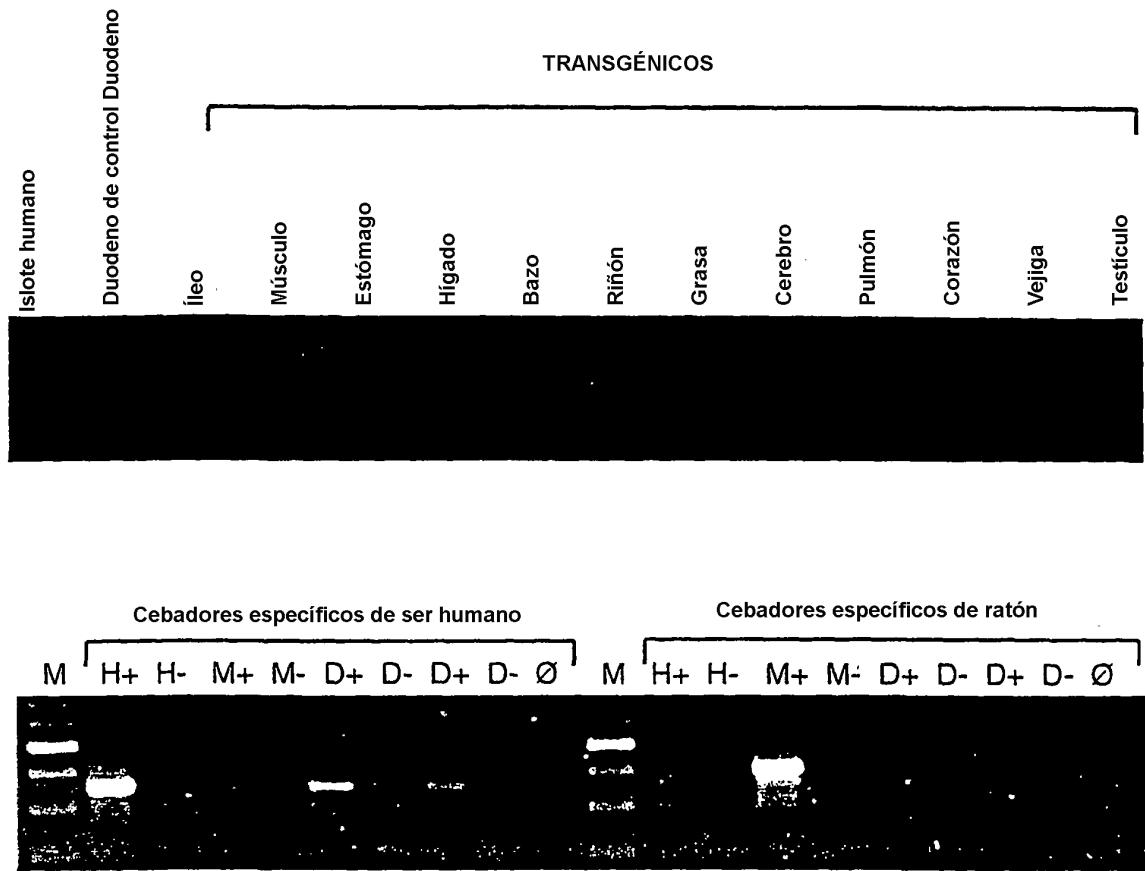


Figura 9

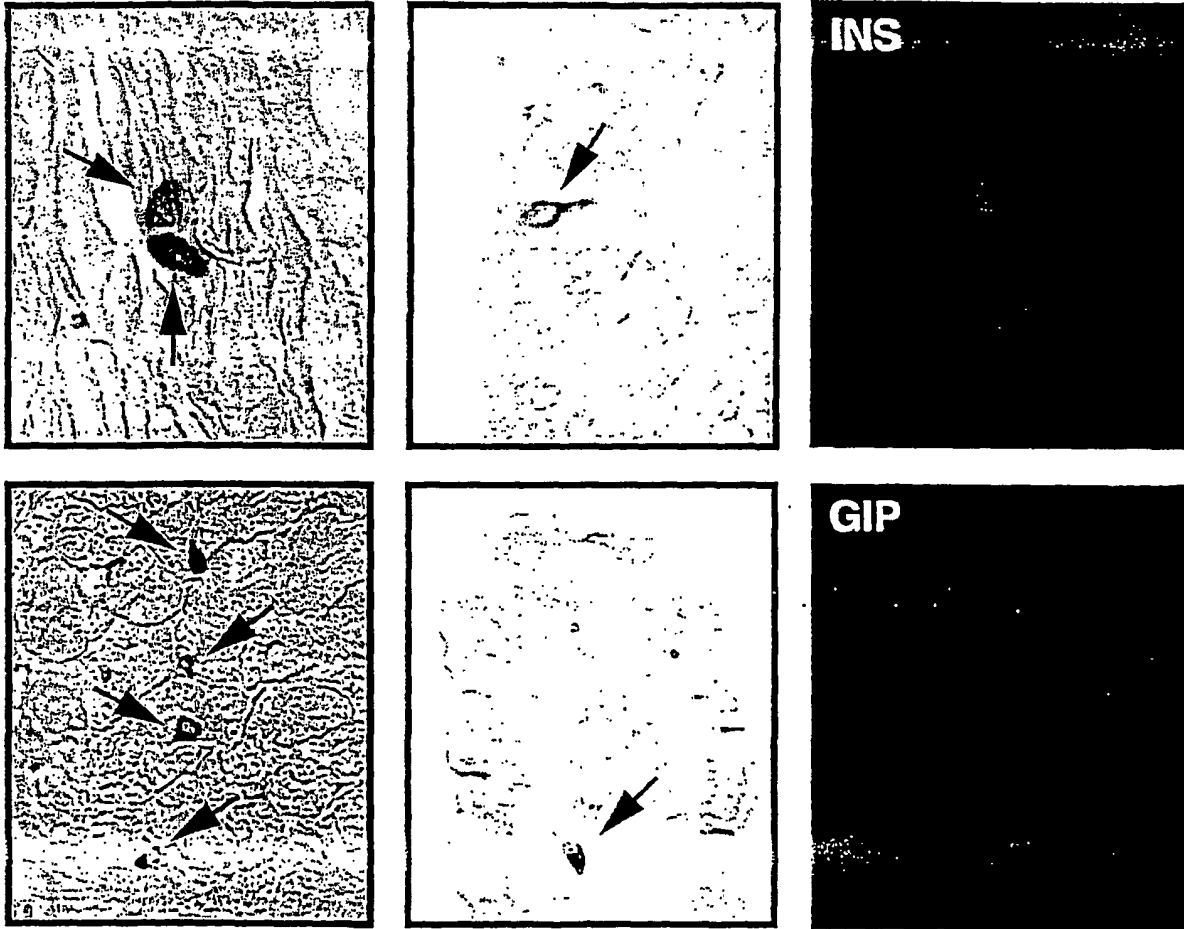


Figura 10

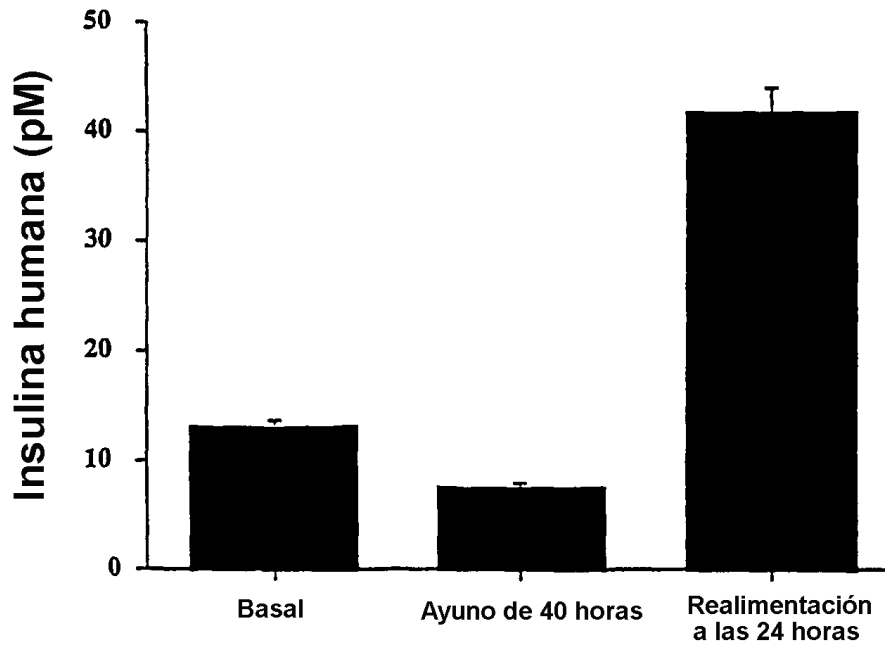


Figura 11A

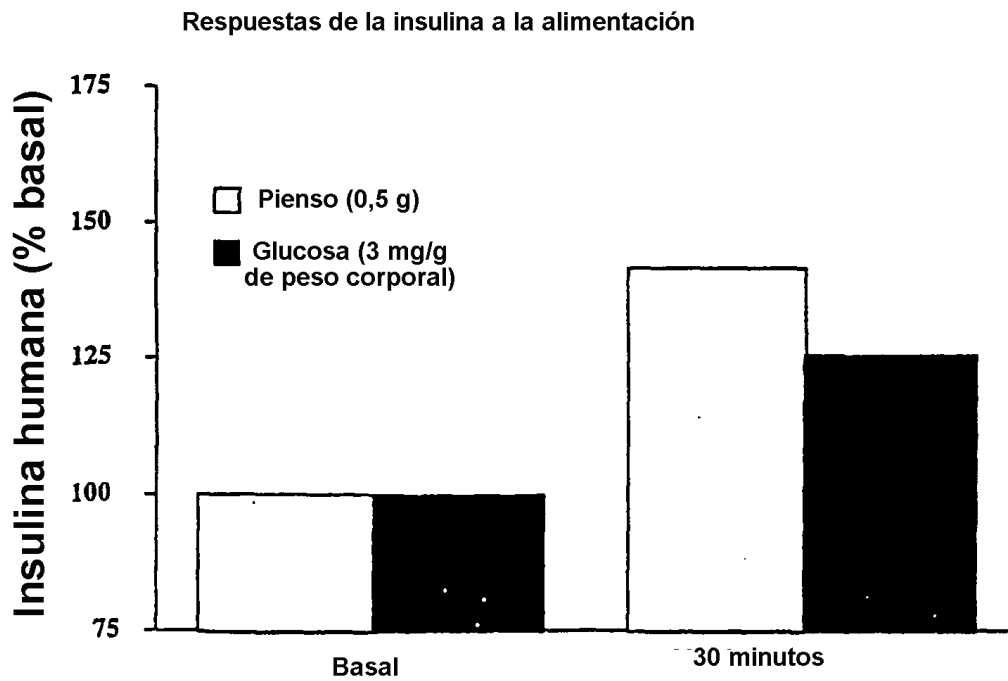


Figura 11B

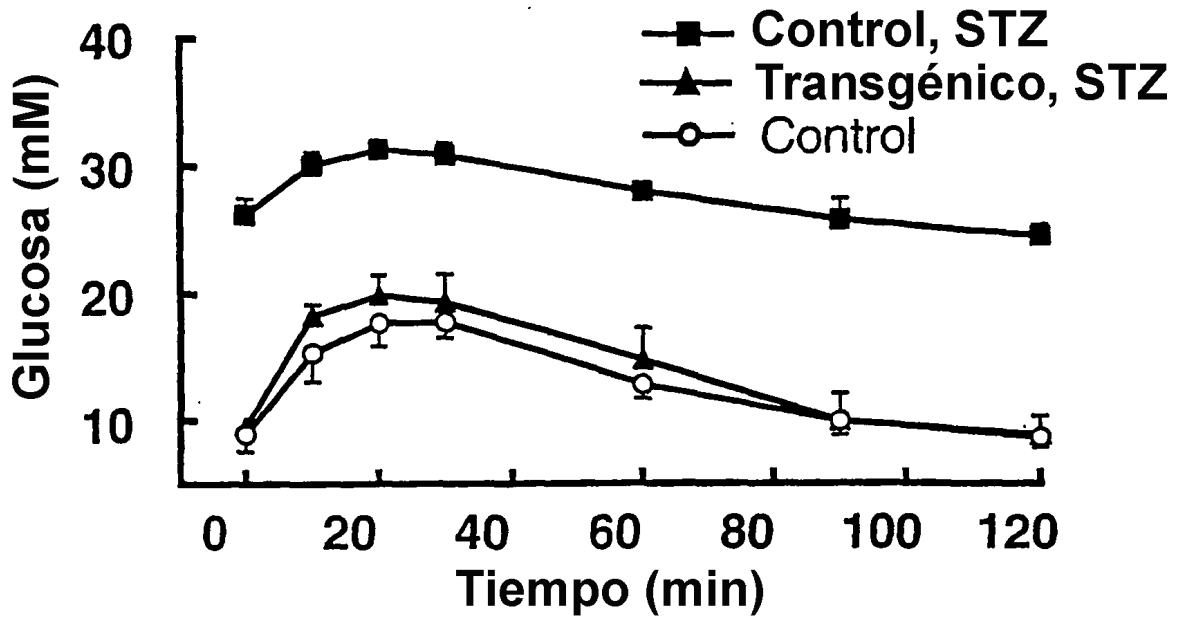


Figura 12

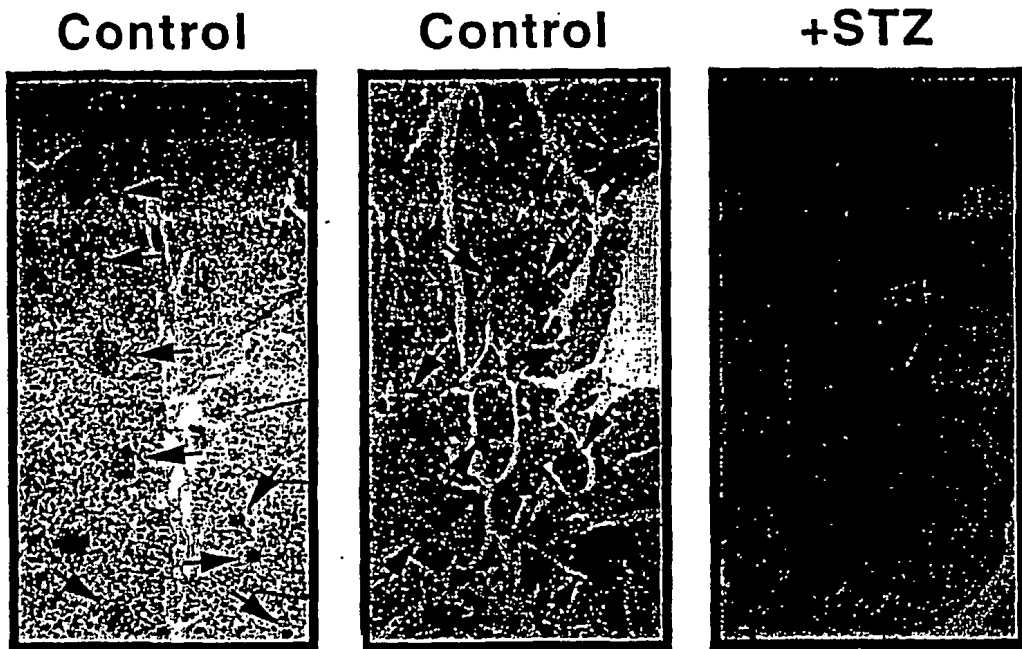


Figura 13

Promotor de GIP

atctctccag tcccttcctc aaccctctga gaacaggcaa actccaccat gattggctta
 taaatcgta tatggaccta ctaaggatgt aacaactggg agcatgctta cctagcatgt
 ccgaaacccg gagttcagtc cctagcactg cacaaitctca gtccttatga agtagaggga
 agatcagagg tcaaggaca acatcaattt gagaccagcc tgggctactt accaaagaaa
 gaaagagaga aataaataaa tagatagata aataaataaa taagtaata aatatcttat
 ggctggagag ttggttcagt gtttaagagc acttattgtg gggttgggga ttagctcag
 tggtagagcg ttgcctagg aagctcaagg ccctgggttc ggccccagc tccggaaaca
 aaacaaaaca aaacaaaac aaacaaaaca acaaaaaacc ctgtctggaa aacacctaaa
 taaagatata tatataat atatatacat ataataata tatgatata atatataat atatcttgt
 ggaggagct atacctttct tcttgagcc tcaacacat aaatgtgcc tgcaccca
 ttcatttgc cccaagtggg aaacctgtg actataaact ctaagttcct agtactagg
 aactcgaag acacctacct caggcagcat cacttccgga gtgccaccat taccagtaa
 catccacatc tgggattcag atcccagatc ccttctgttc cctcagaagt cacctacagc
 tttgtggggg tcccccttc ctcagagagt gccaccgag ttgacctca ccaaggcaac
 ccttgtacc cacagaatcc aacaggaagt aggggggaaga acagccggcc ctgtgccag
 aaaaaagag gggaggggaga aggggggtgct cagcctacca cggggcaggt cccagataac
 actgcagata cccaatgtt atcaccat tagcacaggc ccagagcaaa ggggaaagt
 attaggtgta taatggggtt cactgggcag gaccagtggg cttagcttc aaagataaga
 ggtttcagg ttaatcagca ccctgtggtg tgtggatata aggaagctaa cacagggtct
 tgaagcaaga tcctgag

Gen de cromogranina A (Chga) de ratón, región promotora.
 ACCESO L31361

1 ccgaaattac cactacgtt ggaattctat aagggttggg ttgctgtt ttgttacagc
 61 tgcgtctttg gcaccagca cagctgagtg gttctaagcc cacgtcagtg cttaacacat
 121 ggttgtgaa tgaatacacg cgaagccggt tctcatitag gggcatgagt aggcagaggt
 181 gtgggcagga agcaggaaag agcggaaaca ggtgcggaca gaaaggaggg gctctgaagg
 241 atgccagta gtccaaact gtcacccaga taccaggttc actgtggccc taggccaggc
 301 tgcacggggc tccccatgtg gtcgcccag ggtgagagca gaactgcggt gggcggggca
 361 gaaggaaacc aaccaggaag caggggtgca ccaaattat ccaggttta agtacatita
 421 agagacaagg ctgggctgtt gaaggtcaga ggtgtccctg ggggtctgga ctaggactga
 481 ccaactctgt tttagittaa tgggtgagaac tgectcacac tgctacctgc ctacttgcc
 541 ccttgagagc tgtgagccta ggaccaccc atgtgtgggt tggacctca gtcacacact
 601 gaactgtgtg gaagccactg gttgtcagag cagggctctc ggcactgagg aagcagtgac
 661 cactatcccc tatcaataa caattaata cacacagaat gcgaggcaca caactgagtt
 721 tcaggagagg cctcgtcag gcaaggggtt caagaggctt ctgtgggacc cgctggatgt
 781 tccaggaggt tcttaaatg gggcgtgctt ccagccaagt gaaatcaaga gaaaagtacg
 841 cgaagtatag gaaaactcag cagtctggag aggtaaatag gggaggaatc cgaggctcag
 901 agacaggagt gacttgcaca cggacgcaca gcaagtggc aggtggagtt cagctgtgcc
 961 acctctgaa gccgggtacc cttacagcc accagataca agcgggatag agacagctga
 1021 tggagaagct ggaggtgggg ggcgggacc cgaaggtggg gaaagggcgc gggggggcgg
 1081 tcctatgacg taatttctg ggtgtgtgcg cgcgtgtgcg tgcgtgtgcg tgtatataaa
 1141 agccggcata gcattgtgc tgcgtccgcc gccaccgcca ccatcaccgc tgttaccacc
 1201 accgtactg cagtgtccc gctgtgcag agcttggta gccagactac agaccactc
 1261 ccgcatcct cctgcagcag cctgtccact cttccgcac cgtccggctc gctatgcgc

Figura 14

Gen de secretogranina II (Scg2) de *Mus musculus*, promotor y exón 1, secuencia completa.
ACCESO AF037451

```

1  gggaaacttc tctagctctt tcattagggg ccctgtgttc catctaatag ctgactgtga
61  gcattccact ctgtgcttgc caggcactgg catagcctca caagagacag ctatacagg
121  gtctgtcag caaatcttt ctggcatatg caatagtgtc tgggtttggt ggtgtatat
181  gggctggatc cccgggtggg gcagtctctg gatggctttt cctccgtct tagctccaaa
241  ctttctctct gtaactcctt ccatgggtac ttgtttccc attctaagaa ggagcaaagt
301  atccacactt ccttctctt ccttctctt gagtttga aatgccacaa aacttcaaa
361  gcctctgaa tagcctctc ttagtgctt tccaatgat attaaaataa tctatcttc
421  atccccatg attaaagcct tctaaagcc agaaaactat atcattttt tcttttccc
481  agtagtcaac aaactatctg gcacctcata agcatcataa ctcagttggt gggtagataa
541  aattggaatg tgattgtca gtcagcagag acttttagag gacctcatal aacaagatc
601  tctcagtct cagaaatata ttcagtata tacaggggta gaggactcac atcttaata
661  aaataaagt aaatattag acctgtataa attattaagg tacctaata agttccacgg
721  caaagtacag ccatgggtat gaattataa tccaagaagc ggtgggtaa ctctgacatt
781  gttccttga tggctctcat tcatgaagt tagtcacctc aactactca accaaaacct
841  agaagtatt ctgtgttact atgttctct gatgccaaga gggctctagg catatgaaa
901  tctctcaatc tctctccc cctctcccc tccacccc actctctc tctagcagt
961  aatccctccc tctctggtg gcagtatgt tttggagca cagtctta gctatctct
1021  gcaacacctg atttgtctga agattgaat ggcctcatal agaagiatca acaactgag
1081  cgtctgtgaa ctctcattt gacactgtgc tgaagaat ggagttgatt ctatataaa
1141  aaaaaataa gcactcacc tttttgtc aaactaaaca gttttaaac agttctgct
1201  ggagtcata tatgaaatac gatctatcat attgcaatg tctgttcaa ttgtgctgc
1261  accaggaat gagaagctat tctttatag gcacaaataa aaagatagc attatctga
1321  aaattctat gatagggcag caagcccaag aaaccttct aaacaaggcg tgaaacgca
1381  gagatgctt tgcaattagt catgtctatc tgacagattt ctctctct aagggaatt
1441  gtgctgaaca tttattctg agcctcagag ataaaagaag ggggaagaag ctgtagttt
1501  tgctacataa gacaggtggc gtaagcatgc aacgctttaa aaaaatatct aaagtattg
1561  ttttctctg gattcttga aaaagctgc ctgcctggg gttgaggct gagccgggta
1621  cgtcagcgtg gaatcggag tcagcgcgcc aggctctcta taagccgagg agctgtccgg
1681  tgctgaaacg gcccgagccc tcaactcagc gcagagagga gcatgctgg agcctccac
1741  ataataaag acagaggtaa

```

Gen de glucocinasa de *Mus musculus*, región de flanqueo de 5'.
ACCESO U93275

```

1  agctttaggt gtgtgaatat ctactttggt gctagggcct tggctactat aagtaagtt
61  ccccttcaact ggggtgtacc agttaccct ggactgtcta agcaacaaga aggatagaca
121  tggcctacca cagatttcat gctgcccact ggctatgtca gaacatgtag gagctttgg
181  aatcagtgaa acaggtattt tcagactgcc tcccctcgt ggggcttcc cgaagccata
241  ttttcttag agtcagcctt tccagctga ggacaagctg tactggacag atgccagcca
301  ctgaaactgg gaatacatgg tcaataggc agctggctta tctatccat ggtactgat
361  ggcttcgggt cagcacctca cagaaagtgc agacgggagg cttccgagaa aacagagaag
421  caggcaggag atcctgcagg caatcctct gctccacagc ctgcatggac tcccctcagc
481  cttagtctgt gtgggtccca tctgagaaca ttggttatat gttatttca aaccgatctg
541  ctttaagga gtggaagaaa aaaactgtgg tgtttggctt accttatga taatggcctt
601  tcatctctc taataaatat tgccaagtag ggtagattct atacgaaagc tcttaacca
661  tegtattagc aatcatgta ggtgctaata atgaactct gatgcagtca gtacagggat

```

Figura 15

721 ataaaatgga atgtaagagc ctgttgctat gaatggtag ctaactagat gttgtacaag
 781 aaatgttgac gttatgacgt gtggaaactt ggtattgaag atgtggactc gaaactttgt
 841 ggatttttg atgccatgat aaaaatgtga agaactactgt tccttaccaa aaagaagaag
 901 aagaaggaga aggaggagga agaggaggag gaggaagaag agggggagga agaagaagag
 961 aaggaggagg aaggaggagga ggaggagaaga gagggaggagg aggaagaaga agagaaggag
 1021 gaggactagg aggaggagga gaagaaggag aaggggaaagg agagagtagc cagaacattt
 1081 ggggtgcat cagaatacca gatactccag acatagtcac agaaggactg gtttttgt
 1141 taaatagggt ctttgaag tttgtggga aacctgcagt gagattgtgt gtcttagaaa
 1201 tgataggcaa gattcatcca caagaatgcg acaagatggc tgcctgaaca agccctgaac
 1261 attaacagca ccagtagacc tgcttacacg gaagaaagca atctcatagg ccctacccc
 1321 aaacaagac tacagacagc agaggaaactg gagagcagga gaaatgggt ctccttta
 1381 tgagccccct aactggtgt caaatactca atggtcagcc ctgaaatcat atgcacaaag
 1441 taactactagc gcaactgaac agatttagc tgtgtgtgtg tgtgtaatga taacaagaa
 1501 gaaaaggccc catgttagag agggagcaag gtgggcatgg aggtatggaa ggagtggaa
 1561 ggaggggtga gaaggggaaa gtgatgtaat tatcttttaa titataaaaa aataaaaaat
 1621 gggctggtga gatggctcag tgggtaagag caccgactg ctctccga aggtctggag
 1681 tcaaatccc agcaaccaca tgggtgctca caacctccg taacgagatc tggcgcctc
 1741 tctggagtg tctgaagaca gctacagtgt acttacat atataataaa taaatcttt
 1801 aaaaaaata aaaaataaaa tattagaata aaatgtagag gaatattttt aatttaaca
 1861 cttgggtgtg gcaaaagctt tctcaaca aaacttaac cctcagataa gaaaagacta
 1921 gaatccagca cgtggataga tacttctgta tgatgcaaga cactattat caggttgta
 1981 ctgagcaga acttgagttg taactgttg ggaaacaca caccctggc aaacaaaga
 2041 ttactagata ttttagatga aatataaaaa tactttcac aactgatagg taggaaacag
 2101 tcaatagta atataat atgaacaata atccttaaaa gaagaaatcc agaggaaatag
 2161 caagttaggg gaagagaggg tgtgtgtgtg tgtgtgtgcg cgcacattta tagccaaat
 2221 agatgatata cttaaatgaa catgccatta aaaccatta tttgcatac agtttacata
 2281 tgtaaatgaa tacttaaaaa aaaacattg ggattggaga gaaatggctc agtggtaag
 2341 agtcaattc ccagcaacca catgattgct cacaaccatc tgtaatggga tctgatgcct
 2401 tcttctggta tgtctgaaga aagtaccgt gtactataa ttataataa ataaatcttt
 2461 aaccaaaaa ccccataat tcaacaaca gatatgtctt ggtctgagge tccaggcat
 2521 agaaatagaa acacacagag tgtggagcca gtgcggtica ggtccgcat tccagttcag
 2581 gcttcagacc aagagaagg gaaaagaaga gacaagcaac aag

Gen de adenosina desaminasa (ADA) de H. sapiens, región de flanqueo de 5' y exón 1 (y CDS unida).
 ACCESO X02189

1 tccaggaat ggcgatcca gcccggcggg cggggcgggg gctccggcga gagggcgggc
 61 cccgggaacg gcggcggcgg gggcgggagg cggggcccgg cccgtaaga agagcgtggc
 121 cggccgggc caccgctggc ccagggaaa gccgagcggc caccgagccg gcagagaccc
 181 accgagcggc ggcggagggg gcgacgccc ggccgacgag ggcacc

ARNm de Homo sapiens para pre-proinsulina.
 ACCESO X70508

MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREA
 EDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN"

1 gctgcatcag aagaggccat caagcacatc actgtccttc tgccatggcc ctgtggatgc

Figura 16

61 gcctctgcc cctgtggcg ctgctggccc tcggggacc tgaccagcc gcagccttg
 121 tgaaccaaca cctgtggcg tcacacctgg tgaagctct ctacctagtg tgcggggaac
 181 gagcctctt ctacacacc aagaccggc gggaggcaga ggacctgcag gtggggcagg
 241 tggagctggg cgggggccc ggtgcaggca gcctgcagcc ctggccctg gaggggtccc
 301 tgcagaagcg tggcattgtg gaacaatgt gtaccagcat ctgctccctc taccagctgg
 361 agaactactg caactagacg cagcccgcag gcagccccc acccgccgcc tctgcaccg
 421 agagagatgg aataaagccc ttgaaccagc

Leptina (LEP) de Homo sapiens, ARNm.
 ACCESO XM_004625

"MHWGTL CGFLWL WPYLFYVQA VPIQKVQDDTKTLIKTTVTRINDISHTQSVSSKQKVTG
 LDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQLTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLP
 WASGLETLDLSLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGLQDMLWQLDLSPGC"

1 tctgtttca ggccaagaa gcccacctg ggaaggaaa tgcattgggg aacctgtgc
 61 ggattctgt ggcttggcc ctatcttctc tatgtccaag ctgtgcccac ccaaaaagtc
 121 caagatgaca ccaaaacct catcaagaca atgtcacca ggatcaatga cattcacac
 181 acgcagtacg tctctccaa acagaaagtc accggttgg actcattcc tgggtccac
 241 cccatctga cctatccaa gatggaccag acactggcag tctaccaaca gatcctcacc
 301 agtatgctt ccagaaact gatccaaata tccaacgacc tggagaacct ccgggatctt
 361 cttcacgtgc tggcctctc taagagctgc cactgcccct gggccagtgg cctggagacc
 421 ttggacagcc tgggggggtgt cctggaagct tcaggctact ccacagaggt ggtggccctg
 481 agcaggctgc aggggtctct gcaggacatg ctgtggcagc tggacctcag ccctgggtgc
 541 tgaggccttg aaggtcactc ttctgcaag gactacgta agggaaggaa ctctggctc
 601 caggtatctc caggattgaa gagcattgca tggacacccc ttatccagga ctctgcaat
 661 ttccctgact cctetaagcc actcttcaa aggcataaga cctaagcct ccttttgcct
 721 gaaaccaaag atatafacac aggatcctat tctaccagg aaggggggtcc acccagcaaa
 781 gagtgggctg catctgggat tcccaccaag gctctcagcc atcaacaaga gttgtctgt
 841 cccctctga cccatctccc cctcactgaa tgcctcaatg tgaccagggg tgattcaga
 901 gagggcagag gggtaggcag agccttggga tgaccagaac aaggttccct ctgagaattc
 961 caaggagtic catgaagacc acatccacac acgcaggaac tcccagcaac acaagctgga
 1021 agcacatgtt tatttattct gcatttatt ctggatggat tgaagcaaa gcaccagctt
 1081 ctccaggctc ttgggggta gccagggcca ggggtctccc tggagtgcag ttccaatcc
 1141 catagatggg tctggctgag ctgaacccat ttgagtgc tgagggttg ggttcactg
 1201 agcaagagct ggcaaaagtg gctctccagt tagtctctc gtaactggtt tcatttctc
 1261 tgtgactgat gtacatcac agtgttggca atggtgtgc cctgagtgga tctccaagga
 1321 ccaggttatt taaaaagat ttgtttgtc aagtgtcata ttaggtgtc tgcaccagc
 1381 ggtggggaat gtttggcag aagggagaag gatctagaat gtgtttctg aataacatt
 1441 gttggtggg ttcttggaa ggagtggat catttctta tctctgcaa ttgcttagga
 1501 tgttttcat gaaaatagct ctccagggg ggttgtgagg cctggccagg caccctctg
 1561 agagaagttt ctggccctgg ctgacccca agagcctgga gaagctgatg ctttctca
 1621 aatccatcca gaataaacg caaaggctg aaagccattt gttggggcag tggtaagctc
 1681 tggcttctc cgactgctag ggagtgtct ttctatcat ggagtgcagg tcccactg
 1741 gtgactgca tctcagagc aggggtctt ggtgtgacc tctgaatgtt ccagggttga
 1801 tcactctg gggttattac atggcagtgt tctatttgg ggcttgcag ccaatttga
 1861 gttctgtct gattggctca ccaagcaag gccaaaatta ccaaaaatct tggggggtt
 1921 ttactcaggt ggtgaagaaa actccttag caggtgttcc tgagacctga caagcactgc
 1981 taggcgagtg ccaggactcc ccaggccagg ccaccaggat ggcccttccc actggaggtc
 2041 acattcagga agatgaaga ggaggttgg ggtctgccac catcctgctg ctgtgtttt

Figura 17

2101 gctatcacac agtgggtggt ggatctgtcc aaggaaactt gaatcaaagc agttaacttt
 2161 aagactgagc acctgctca tgctcagccc tgactgggtc tataggctgg agaagctcac
 2221 ccaataaaca ttaagattga ggcttgcctt cagggatctt gcattcccag tggtaaacc
 2281 gcactcacc atgtgccaaag gtggggattt taccacagca gctgaacagc caaatgcatg
 2341 gtgcagttga cagcaggtgg gaaatggtat gagctgaggg gggccgtgcc caggggccca
 2401 cagggaaacc tgcttgcaat ttgtaaatg tttactttt agggcatctt agcttctatt
 2461 atagccacat ccctttgaaa caagataact gagaatttaa aaataagaaa atacataaga
 2521 ccataacagc caacaggtgg caggaccagg actatagccc aggtcctctg ataccagag
 2581 cattacgtga gccaggtaat gagggactgg aaccagggag accgagcgtt tctggaaaa
 2641 gaggagttc gaggtagagt ttgaaggagg tgagggatgt gaattgcctg cagagagaag
 2701 cctgttttgt tggaaaggtt ggtgtgtgga gatgcagagg taaaagtgtg agcagtgagt
 2761 tacagcgaga ggagagaaa gaagagacag gagggcaagg gccatgctga agggacctg
 2821 aagggtaaa aagttgata ttaaaggagt taagagtagc aagtctaga gaagaggctg
 2881 gtgctgtggc cagggtgaga gctgctctgg aaaatgtgac ccagatcctc acaaccacct
 2941 aatcaggctg aggtgtctta agccttttg tcacaaaacc tggcacaatg gctaattccc
 3001 agagtgtgaa acttctaag tataaatggt tgtctgttt tgaacttaa aaaaaaaaa
 3061 aaaagtttg cgggtgctg tggctcagc ctgtaatccc agcactttgg gaggccaagg
 3121 tggggggatc acaaggtcac tagatggcga gcatcctggc caacatggtg aaacccctc
 3181 tctactaaaa acacaaaagt tagctgagcg tgggggggg cgctgtagt cccagccact
 3241 cgggaggtg agacaggaga atcgcttaa cctgggaggc ggagagtaca gtgagccaag
 3301 atgcgccac tgcactccgg cctgatgaca gagcgagatt cctcttaaa aaaaaaaaa
 3361 aaaaagttg ttttaaaa aatctaaata aaataactt gcccccctg

Colecistocinina (CCK) de Homo sapiens, ARNm.
 ACCESO XM_003225

"GSAAGLLRLETSPQLRPNPKAMNSGVCLCVLMAVLAAGALTQPVPADPAGSGLQRAE
 EAPRRQLRVSQRDGESERAHLGALLARYIQARKAPSGRMSIVKNLQNLDPSTRISDRD
 YMGWMDFGRRSAEEYEYPS"

1 ggctcagctg cggggtgct cgggtggaa acgccaagcc agctgcgtcc taatcaaaa
 61 gccatgaaca gggcgtgtg cctgtgctg ctgatggcgg tactggcggc tggcgcctg
 121 acgcagccgg tgcctcccgc agatcccgc ggctcgggc tcagcgggc agaggaggcg
 181 cccctagggc agctgagggt atgcagaga acggatggcg agtcccagc gcacctgggc
 241 gccctgctgg caagatacat ccagcaggcc cggaaagctc cttctggacg aatgtccatc
 301 gttagaacc tgcagaacct ggacccagc cacaggataa gtagccggga ctacatgggc
 361 tggatggatt tggccgtc cagtgccgag gagtatgagt acccctcta gaggaccag
 421 ccgcatcag ccaacggga agcaacctc caaccagag gaggcagaat aagaaacaa
 481 tcacactcat aactcattg ctgtggagt tgacattgta tgtatctatt tattaagtc
 541 tcaatgtgaa aaatgtgtc gtaagattg ccagtgaac cacacacct accagaattg
 601 tgcaaatgga agacaaatg tttctcat ctgtgactc tggctgaaa atgtgttat
 661 gctattaaag tgattcatt ctgcc

Promotor de CCK (Rata)
 ACCESO S70690

1 aatcggcg ctaagccga ttattcagt ttccagacat gtcacaaata cagctaattc

Figura 18

61 ctacaacctg agctgtgtca tggggggggg gggaatcacc cacagcattt aatctgctgc
 121 tgttttaaac acgtigtctc taagtaaaga gaccgctaga gccacaacca ggaacctaac
 181 tgctgtggc atcacttgc tttcatagt ctccctcagc eggaaccccc ccacgtggg
 241 tgccctctct attagaaag agtttctaag cctttctct tcaccctaga ctggcaaggt
 301 tgagggtagg ctgagggtg caagactgtg agaaaaggga gccctctct tctcttgc
 361 cggtgagtat ctacccaag atctcacca ccagtgga tccgtaact ctaggagaa
 421 ggaagaactc tagaggacgg gaagatcatt gcaagctccc ctatgtgtgc gagcccagcc
 481 cgctccactc agccagccag agcttgaggg tgcttgagac actctctggc gccactcgc
 541 gaccaaaatc atcggtagat gtaggctggt gagaagtcatt ctgggaaga aatggaaacc
 601 tttcccaa aggccttcg cacaaaaggc aagagctgca ccaggtatc taaaattctg
 661 taagacgaga atccagagg ccaactgtga ttgattctg aaaaattgag agccctactc
 721 cctctctca ctgtgggag ccactcagg tctgaagtgc tccagagaa catgccagaa
 781 ttacatttc tgacacctag tctgtgagg tccccggt tctggaagg attgatccc
 841 tcaagctca ctaaacagt gtcagctct ecattccaga caaactctg ctctctccg
 901 ggagtgggg tggcacctc cctgaagagg actcagcaga ggcaccgaac aggggtggga
 961 ggaagctgt ttagataaag aggaggactc atacaaagta cccgcctgg gaggggctat
 1021 cctcattcac tggccggtt cctctctcc ggggggccc ttcgatcgtt ggtctctca
 1081 gtggctgct ctgagcacgt gtcctgccgg actgcgtcag cactgggtaa acagatgact
 1141 ggctgcgtac cggcgggggc tatttaagag gactgccct gccgcctgcc ctcaactag
 1201 ctggacagca gccgtggaa accccaagc cagctgactc cgcacccgaa ggtaagtggc
 1261 tggcagatcc aagaatcatg agtgtgaaga actggcctgt agcttgcatt ctattgccg
 1321 ttactcttc catttctgt gcctccctc acttgacagc tg

ARN mensajero humano para la hormona del crecimiento (presomatotropina).
 ACCESO V00519

"MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRPFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEE
 AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSV
 FANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHND
 DALLKNGYGLLYCFRKMDKLVETFLRIVQCRSVEGSCGF"

1 cgaaccactc agggctctgt ggacagctca cctagctgca atggctacag gctccggac
 61 gtcctgctc ctggctttg gctgctctg cctgccctgg ctcaagagg gcagtgcct
 121 cccaaccatt ccttatecca ggcctttga caacgtatg ctccgcgcc atcgtctgca
 181 ccagctggc ttgacacct accaggagt tgaagaagc tatatccaa aggaacagaa
 241 gtattcattc ctgcagaacc ccagacctc cctctgttc tcagagteta ttccgacacc
 301 ctccaacagg gaggaacac aacagaaatc caacctagag ctgctccgca tctcctgct
 361 gctcatccag tctggctgg agcccgtgca gttctcagg agtgtcttcg ccaacagcct
 421 ggtgtacggc gcctctgaca gcaactgta tgacctcta aaggacctag aggaaggcat
 481 ccaaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagccccgg actgggcaga tcttaagca
 541 gacctacagc aagtgcaca caactcaca caacgatgac gcactactca agaactacgg
 601 gctgctctac tgctcagga aggacatgga caaggtcgag acattcctgc gcacgtgca
 661 gtccgctct gtggagggca gctgtgctt ctactgccc gggtggcact cctgtgacc
 721 ctcccagtg cctctctgg cctggaagt tgccactcca gtgccacca gcctgtct
 781 aataaatta agttgcatc

Figura 19

Promotor de GIP de rata -1 a -1894 pb.

(-1894)

5'_GAGTGGCGACAGGCTGCTGCTAGCAGGCTCTACACTGAGCTAACCCCACCCATAT
 ATATACATAGTTACTATTAGCTTTATTTATATTTTTAAAGATTATCATTATATATATAG
 TACTACTGTAGTGTCTAGATACACAGAAGAGGCATCGGTCTCTTACAGAGAGCCACC
 ATGTGGTTGCTGGGGATTGAACTCATACTCTGGCAGAGCAGTCGGTGCTCTTAACG
 CTGAGCCATCTCTCCAGCGCCCCCAAAGCCAGCTTTTAAAAATATTTTAAAATTTCT
 TTCTACAGATTGTTTTATGTATATGAGTGTTTTGTGTGTATGCGTTGATGTGTGTACT
 GTGTGCATGGCACATGCCAGTGGGCCACAGACAGAGGGACATGAGATTCCCCTGAA
 ACTTGGAGTTACAGATGGCTGTGGGCTGCCATGTGAGTGAGCGCCTTTGGAACCAAA
 CCTGGGTCCTGCACAAAAGCAACAAGCACTCTTAATCGTTGAGCCACCTCTCCAACC
 CCTTGATATTTCTTTTCGTTGGTGCATTAATAATTGATAAACAGAGGGTTTTCTTTATT
 TAAAGATTTATTTATTTTATGTGAGTACACTGTTGCTCTCTTCAGACACATAGAAGAG
 GGCATTGCTGGATTCTGCTACAGATGGTTGTGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGAGTT
 AACTCAGGACCTCTGGAAGAGCAGTCAGTGCTCTTAACCACTGAGCCATCTCTCCA
 GTCCCTTCCTCAACCTTCTGAGAACAGGCAAACCTCCACCATGATTGGCTTATAAATC
 GTTATATGGACCTACTAAGGATGTAACAACCTGGGAGCATGCTTACCTAGCATGTCCG
 AAACCCGGAGTTCAGTCCCTAGCACTGCACAATCTCAGTCCTTATGAAGTAGAGGGA
 AGATCAGAGGTTCAAGGACAACATCAATTTGAGACCAGCCTGGGCTACTTACCAAA
 GAAAGAAAGAGAGAAATAAATAAATAGATAGATAAATAAATAAATAAAGTAAATAA
 ATATCTTATGGCTGGAGAGTTGGTTCAGTGTTTAAGAGCACTTATTGTGGGGTTGGG
 GATTTATCTCAGTGGTAGAGCGTTTGCTAGGAAGCTCAAGGCCCTGGGTTCCGTCC
 CCAGCTCCGGAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAA
 CTGTCTGGAAAACACCTAAATAAAGATATATATATATAATATATATACATATAATAT
 ATATATGATATATATATATATATATATATCTTTGTGGAGGAAGCTATACCTTTCTTTCTT
 GAGCCTCCAACACATAAATGTGCCCTGTCAATCCATTATGCCCCAAGTGGGAA
 ACCATGTGACTATAAACTCTAAGTTCCTAGTCACTAGGAACTCTCAAGACACCTACC
 TCAGGCAGCATCACTTCCGGAGTGCCACCATTATCAGTTAACATCCACATCTGGGAT
 TCAGATCCCAGATCCCTTCTGTTCCCTCAGAAGTCACCTACAGCTTTGTGGGGGTGC
 CCCTTCCCTCAGAGAGTGCCACCCGAGTTGACCCTCACCAAGGCAACCTTTGTACC
 CACAGAATCCAACAGGAAGTAGGGGGAAGAACAGCCGGCCCTGTGCCAGAAAAAA
 AGAGGGGAGGGAGAAGGGGGTGTCTCAGCCTACCACCGGGCAGGTCCAGATAACA
 CTGCAGATACCAAAATGTTAATACCCATTAGCACAGGCCAGAGCAAAGGGGAAA
 GTGATTAGGTGTATAATGGGGTTCAGTGGGAGGAGCAGTGGGCTTGTGCTTCAA
 GATAAGAGGTTTTAGGTTAATCAGCACCCCTGTGGTGTGTGGATATAAGGAAGCTAA
 CACAGGGTCTTGAAGCAAGATC_3' (-1)

figura 20