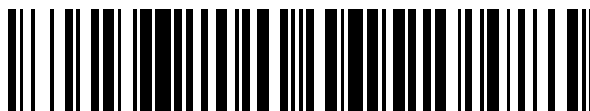


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 430**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2003 E 10161291 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2213730**

54 Título: **Adipocitos primarios cultivados para la terapia génica**

30 Prioridad:

**18.06.2002 JP 2002177648**

**19.08.2002 JP 2002237974**

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

**12.02.2016**

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)**  
**6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku**  
**Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**ITO, MASASHI y**  
**SAITO, YASUSHI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 559 430 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

Adipocitos primarios cultivados para la terapia génica

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a adipocitos primarios cultivados para la terapia génica, a los que se ha o han transferido un gen o genes extraños.

Técnica de Antecedentes

10 Las actuales terapias génicas (Toyooka et al., Folia Pharmacol. Jpn. 116:158-162, 2000) se pueden clasificar en dos grupos: (1) métodos de transferencia de genes terapéuticos a pacientes mediante la administración directa de vectores virales, plásmidos inmunodeficientes o de manera que codifican el gen (*in vivo*), y (2) métodos de separar temporalmente células de pacientes, transferir un gen a estas células y luego devolver estas células al paciente (*ex vivo*).

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

20 El documento WO00/31267-A1 se refiere a la introducción del gen insulina en células musculares mediante retrovirus *in vitro*, y a la re-implantación de las células en el cuerpo, como un tratamiento de la diabetes.

Descripción de la invención

25 Al tiempo que buscaban células adecuadas para la terapia génica *ex vivo*, los presentes autores de la invención desarrollaron la idea de utilizar adipocitos primarios cultivados. El uso de adipocitos tiene las siguientes ventajas:

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

30 (2) los adipocitos se pueden recoger fácilmente, ya que también existen subcutáneamente, y se están desarrollando técnicas relacionadas con su extirpación en el campo de la cirugía plástica y cosmética; además de ello, incluso cuando los adipocitos se injertan en tejido subcutáneo, lo que permite una fácil implantación, estas células no son heterotrópicas, ya que originalmente pertenecían a esta región;

(3) dado que los adipocitos primarios cultivados aislados proliferan activamente, incluso *in vitro*, son apropiados para procedimientos tales como la transferencia de genes;

35 (4) dado que los adipocitos son propensos a permanecer en una zona limitada después de la implantación, las células injertadas pueden ser extirpadas después de la implantación, si se desea (específicamente cuando se quiere eliminar la expresión del gen);

(5) dado que los propios adipocitos producen factores angiogénicos (Mick, G.J., et al., Endocrinology 2002, 143(3):948-53), se puede esperar un alto nivel de injerto después de la implantación;

40 (6) la extirpación o la implantación de los adipocitos tiene un pequeño impacto sobre el cuerpo humano, debido a que el peso de este órgano varía grandemente en los adultos; y

(7) los adipocitos son ampliamente reconocidos como superfluos y obstructivos, y el consentimiento para su recolección se puede obtener fácilmente.

45 A pesar de que están en marcha utilizando actualmente investigaciones con objetivos similares utilizando queratinocitos (J. Gene. Med. enero-febrero de 2001, 3(1):21-31; Histochem. Cell Biol. enero de 2001, 115(1):73-82), la eliminación de la barrera biológica de la piel en el proceso de aislar el cultivo primario es problemático, teniendo en cuenta el riesgo de infección. El dolor del paciente durante la extirpación y la implantación se prevé que sea serio, y la re-extirpación (4, mencionado anteriormente) para eliminar la expresión no es fácil. Además de ello, cuando se utilizan queratinocitos o piel, que sólo pueden ser injertados en dos dimensiones, la cantidad de injerto sólo puede

incrementarse aumentando la superficie específica del injerto. Por lo tanto, los adipocitos, que permiten el trasplante en tres dimensiones, se consideran más útiles.

5 Los presentes autores de la invención diseñaron métodos para la transferencia de genes de manera eficiente en adipocitos primarios cultivados. También confirmaron que los genes transferidos están funcionando después de la implantación, y encontraron que los adipocitos pueden utilizarse eficazmente en la terapia génica. Además de ello, los adipocitos que expresan de forma estable el gen extraño transferido *in vivo* durante un largo período de tiempo pueden obtenerse por los métodos de esta invención. Los adipocitos maduros implantados pueden continuar expresando genes extraños durante un año o más. Además de ello, si la expresión del gen extraño se hace innecesaria después de la implantación de los adipocitos, la expresión se puede detener mediante retirando el injerto.

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

- 15 1. Una composición farmacéutica que comprende un pre-adipocito primario cultivado, en donde el pre-adipocito mantiene de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada en el exterior de la célula, y en donde el gen ha sido insertado en un vector retroviral y ha sido transferido a la célula por el vector retroviral, en donde la proteína es lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT).
- 20 2. Un pre-adipocito primario cultivado, en donde el pre-adipocito mantiene de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada en el exterior de la célula, y en donde el gen ha sido insertado en un vector retroviral y ha sido transferido a la célula por el vector retroviral, para uso en la terapia génica, en donde la proteína es LCAT.
- 25 3. La composición farmacéutica del punto 1, o el pre-adipocito para uso de acuerdo con el punto 2, en donde el pre-adipocito tiene la capacidad de expresar de forma significativa la proteína *in vivo* durante al menos 20 días.
- 30 4. La composición farmacéutica del punto 1 ó 3, o el pre-adipocito para uso de acuerdo con el punto 2 ó 3, en donde el pre-adipocito se utiliza para liberar la proteína en el flujo sanguíneo.
5. Un método *in vitro* de producir un pre-adipocito para uso en la terapia génica, en el que el método comprende las etapas de:  
(1) cultivar de forma primaria un pre-adipocito; y  
(2) transferir y luego mantener de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada fuera de la célula,  
en donde la proteína es LCAT.
6. El método del punto 5, en el que el gen extraño es transferido por un vector retroviral.
7. El pre-adipocito para uso de acuerdo con el punto 2, que ha sido producido por el método del punto 5 ó 6.
8. Una composición de implante, en donde la composición comprende un pre-adipocito primario cultivado que mantiene de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada en el exterior de la célula, y en donde el gen ha sido insertado en un vector retroviral y ha sido transferido a la célula por el vector retroviral, y un soporte farmacéuticamente aceptable, para uso en la terapia génica, en donde la proteína es LCAT.
9. La composición de implante para uso de acuerdo con el punto 8, o la composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1, 3 y 4, que comprende, además, un componente de matriz extracelular.
- 40 10. La composición de implante para uso de acuerdo con el punto 8 ó 9, o la composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 1, 3, 4 y 9, que comprende, además, un factor de angiogénesis.
11. Un animal no humano, en cuyo cuerpo ha sido implantado el pre-adipocito primario cultivado del punto 2.

En lo que sigue se describirá el modo para llevar a cabo esta invención.

En primer lugar, la presente invención proporciona adipocitos primarios cultivados para la terapia génica, en que los adipocitos mantienen de forma estable un gen o genes extraños que codifican una o unas proteínas que son secretadas al exterior de la célula.

5 En esta memoria, un gen extraño se refiere a un gen de lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) transferido en adipocitos primarios cultivados desde el exterior.

Además de ello, células primarias cultivadas se refieren a células no establecidas que son cultivadas a partir de tejidos separados de un cuerpo vivo. Los adipocitos se refieren a adipocitos maduros y células que comprenden la capacidad de diferenciarse en tejido adiposo tales como pre-adipocitos. Más específicamente, a menos que se diga particularmente que los adipocitos son adipocitos "maduros", también incluyen pre-adipocitos. Adipocitos maduros son células esféricas que almacenan grasa y contienen gotitas de lípidos. La grasa almacenada en los adipocitos maduros se puede identificar utilizando la tinción de aceite rojo O. Adipocitos maduros generalmente secretan leptina en respuesta a insulina. Los pre-adipocitos existen normalmente como células del estroma que aún no se han diferenciado en adipocitos maduros. Los pre-adipocitos se pueden aislar mediante el tratamiento de tejido adiposo con colagenasa, o se pueden aislar como resultado de la división de adipocitos maduros, utilizando el método de cultivo de techo descrito más adelante (Sugihara, *et al.* Nippon Rinsho 1995, 53, 115-120; Sugihara, H., *et al.* J. Lipid Res. 1987, 28, 1038-1045; Zhang H.H., *et al.* J. Endocrinol. 2000, 164, 119-128). Aunque no ha sido confirmada la existencia de antígenos de superficie específicos para adipocitos, se han encontrado altos niveles de expresión de CD36 en adipocitos maduros (Abumrad N.A., *et al.* J. Biol. Chem. 25 de agosto de 1993, 268(24):17665-8). Por lo tanto, adipocitos extremadamente puros pueden recogerse mediante el uso de moléculas de este tipo como marcadores. Al inducir la diferenciación tal como se describe más adelante, pre-adipocitos pueden diferenciarse en adipocitos maduros en el espacio de unos pocos días a unas pocas semanas (Hauer H., *et al.*, J. Clin. Invest. 84, 1663-1670, 1989; Marko, *et al.*, Endocrinology 136, 4582-4588, 1994). Adipocitos primarios cultivados se pueden aislar a partir de un tejido deseado, por ejemplo, el tejido adiposo subcutáneo o tejido adiposo visceral tal como el tejido que rodea el epidídimo o tejido mesentérico.

25 La frase "para la terapia génica" se refiere a la utilización de la expresión *in vivo* de una o unas proteínas codificadas por un gen o genes extraños en previsión de un efecto terapéutico. Además de ello, células para la terapia génica se refieren a células que portan un gen o genes extraños, en que las células se utilizan para administrar el gen extraño a un cuerpo mediante la administración *ex vivo*, y las células comprenden la capacidad de expresar la proteína en ese cuerpo. Administración *ex vivo* se refiere a la separación de tejidos adiposos o adipocitos de un individuo, la realización de la transferencia de genes *in vitro* y luego el implante de las células al mismo o a un individuo diferente.

Células para la terapia génica se refieren preferiblemente a las células utilizadas para el tratamiento de trastornos, que son células que se implantan de manera que se produce una proteína específica. Preferiblemente, el tratamiento mediante una proteína específica incluye la terapia de reemplazo, que utiliza una proteína cuya deficiencia física o funcional o ausencia provoca un trastorno.

35 La proteína específica es LCAT que muestra actividad en el torrente sanguíneo, o se suministra a un tejido diana a través del torrente sanguíneo, y funciona en la superficie celular de ese tejido. Se requiere también preferiblemente un suministro continuo de la proteína específica durante un cierto período de tiempo (por ejemplo, durante unos pocos días a unas pocas semanas o más). Factores y trastornos para los que ya se está llevando a cabo la terapia de reemplazo de proteína, o se prevé que sea efectiva, pueden convertirse todos en dianas.

40 En lo que sigue, se enumeran dianas representativas de acuerdo con su clasificación, pero su uso no se ha de entender como limitado a estos ejemplos, y el uso de factores similares para propósitos similares se incluye dentro del alcance de esta invención.

45 La terapia de reemplazo incluye la suplementación contra trastornos que se desarrollan o se ven agravados por la falta o la función reducida de una hormona, la suplementación contra trastornos debidos a un defecto genético congénito, y la suplementación de un factor de mejora patológica:

Aciltransferasa lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT)/deficiencia en LCAT

Además de ello, los adipocitos de la presente invención no se limitan a los utilizados para la denominada "terapia", sino que incluyen células utilizadas para la expresión *in vivo* de una proteína secretora deseada. Por ejemplo, los métodos de esta invención permiten la producción de animales modelo por una expresión *a posteriori* de una proteína particular. Utilizando estos métodos, se pueden producir animales modelo de enfermedad con una expresión *a posteriori* de la patogénesis o factores agravantes, y estos animales se pueden utilizar para el rastreo de

fármacos. Además, mediante la expresión de factores de mejora patológica, estos métodos se pueden utilizar como prueba de hipótesis de trabajo para nuevos descubrimientos de fármacos en donde un factor dado mejora un estado patológico. Los animales que se utilizan incluyen animales no humanos deseados y preferiblemente mamíferos no humanos (incluyendo roedores y primates).

5 Los adipocitos primarios cultivados para las terapias génicas de esta invención mantienen de forma estable un gen o genes LCAT que codifican una proteína o proteínas LCAT que se secreta fuera de la célula. La frase "mantienen de forma estable" significa que el gen extraño es transmitido a las células hijas durante la división celular y, más específicamente, esta frase se refiere a la incorporación del gen extraño en un cromosoma de la célula. Los adipocitos para la terapia génica de esta invención comprenden un gen o genes LCAT, transferidos de forma estable  
10 mediante un vector viral que incorpora cromosoma. El gen LCAT es transferido por un vector retroviral.

El vector retroviral se integra de forma estable en un cromosoma de la célula y comprende la capacidad de expresar un gen transferido durante un largo periodo. La eficiencia de la transferencia del vector y la continuación de la expresión del gen transferido depende del tipo de célula. Por ejemplo, un gen transferido por un vector retroviral puede mostrar expresión continuada mientras que las células están creciendo, pero la expresión se puede detener  
15 cuando el crecimiento celular se detiene (Lund, A.H., *et al.*, J. Biomed. Sci. 1996, 3:365-378; Niwa, O. *et al.*, 1983, Cell, 32:1105-1113). Se observa a menudo que la expresión de genes extraños es suprimida, en particular después de introducir el gen en un cuerpo por métodos *in vivo* o *ex vivo*. Se dice que una supresión de este tipo de la expresión implica la metilación *de novo* del promotor o secuencia codificadora del gen transferido (Jahner, D. y Jaenisch, R., Nature 315:594-597, 1985; Challita, P.-M. y Kohn, D.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2567-2571, 1994; Hoeber, R.C. *et al.*, J. Virol. 65: 904-912, 1991). Además de ello, la desacetilación de histonas está implicada en el silenciamiento del gen transferido (Chen, W.Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 377-382, 2000; Chen, W.Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5798-5803, 1997). Sin embargo, cuando los autores de la presente invención transfirieron un gen extraño en adipocitos primarios cultivados utilizando un vector retroviral, sorprendentemente, se encontró que la expresión del gen transferido persistía de forma extremadamente estable, tanto *in vitro* como *in vivo*.  
20 La expresión de genes transferidos es estable en adipocitos antes de la diferenciación y también en adipocitos maduros. Se confirmó que la expresión del gen transferido persistía durante toda la duración del experimento para cultivos *in vitro* (80 días o más), y durante toda la duración del experimento cuando se implantan en el cuerpo (360 días o más). Por lo tanto, los adipocitos primarios cultivados, a los que un gen o genes LCAT han sido transferidos de forma estable, se pueden utilizar como implantes que expresan de manera estable un gen o genes durante un  
25 largo período.  
30

Los adipocitos para la terapia génica de esta invención comprenden la capacidad de expresar de forma significativa una proteína o proteínas LCAT codificadas por un gen o genes LCAT durante al menos 20 días o más *in vitro*, o más preferiblemente *in vivo*. La frase "expresan de manera significativa" significa, por ejemplo, que la expresión se detecta a un nivel estadísticamente significativo en comparación a cuando el gen extraño no se transfiere (por ejemplo, con un nivel de significancia de 5% o superior). Más preferiblemente, los adipocitos de la presente invención, cuando son trasplantados a un cuerpo, comprenden la capacidad de expresar de manera significativa una proteína o proteínas LCAT codificadas por un gen o genes LCAT en el cuerpo durante al menos 30 días o más, preferiblemente 40 días o más, más preferiblemente 50 días o más, incluso más preferiblemente 60 días o más, todavía más preferiblemente 80 días o más, aún incluso más preferiblemente 100 días o más, aún incluso más preferiblemente 150 días o más, aún incluso más preferiblemente 200 días o más, aún incluso más preferiblemente 250 días o más, aún incluso preferiblemente 300 días o más, y aún incluso más preferiblemente 350 días o más.  
35  
40

Los adipocitos para la terapia génica de esta invención son particularmente útiles como células para la liberación de proteínas LCAT, que son codificadas por genes LCAT portados por las células, en el flujo sanguíneo. Las proteínas LCAT liberadas en el flujo sanguíneo son proteínas secretoras deseadas que demuestran actividad en el torrente sanguíneo o en la superficie de las células de los tejidos diana.  
45

La presente invención también se refiere a métodos de producir adipocitos para uso en la terapia génica, en que los métodos comprenden las etapas de:  
(1) cultivar de forma primaria adipocitos, y  
(2) transferir células con un gen o genes LCAT que codifican una o unas proteínas LCAT que son secretadas al exterior de la célula, preferiblemente utilizando un vector retroviral o un vector viral adeno-asociado, de modo que el gen se mantiene de forma estable.  
50

La presente invención se refiere también a los adipocitos para la terapia génica producidos por este método. "Se mantiene de forma estable" significa la transferencia de un gen o genes exteriores de manera que sean transmitidos a las células hijas cuando la célula se divide, y más específicamente, se refiere a la integración del gen extraño en el cromosoma de las células. La transferencia Southern o la PCR utilizando ADN genómico pueden demostrar biológicamente al nivel molecular que el gen extraño ha logrado la expresión estable mediante la integración en un  
55

cromosoma. Además de ello, para concentrar las células transfectadas de forma estable, por ejemplo, se puede utilizar un método que utiliza la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), que concentra las células por reconocimiento de la GFP co-expresada por las células junto con el gen diana.

1. Métodos de recoger adipocitos primarios cultivados

5 Adipocitos primarios cultivados pueden ser recogidos por los métodos descritos en el informe de Sugihara *et al.* (Sugihara, H. *et al.*, Differentiation, 31:42-49, 1986). Más específicamente, el tejido adiposo, y preferiblemente el tejido adiposo subcutáneo o tejido adiposo visceral tal como el tejido que rodea el epidídimo o tejido mesentérico del propio receptor del implante, se extirpa en condiciones estériles y, por ejemplo, después de lavar con PBS, se morcela utilizando un par de tijeras o un bisturí. Este tejido morcelado es digerido por sacudimiento a 37°C en  
10 medio que comprende una cantidad apropiada de colagenasa, preferiblemente de 1 a 3 mg/mL, para un período de tiempo apropiado, preferiblemente durante 20 a 60 minutos, y luego se separa en un residuo precipitado y capa flotante por centrifugación.

La capa flotante se lava preferiblemente adicionalmente una o dos veces mediante centrifugación, y se añade entonces a un matraz de cultivo llenado con medio. Las burbujas se eliminan, y el matraz se deja reposar en una  
15 incubadora de CO<sub>2</sub> para el cultivo, de manera que la superficie del cultivo convencional es un techo (cultivo de techo). Después de cultivar durante un período adecuado, preferiblemente de diez a 14 días, las células adheridas a la superficie del techo se recogen mediante tratamiento con tripsina. Estas células se sub-cultivan posteriormente en un sistema de cultivo convencional.

Adipocitos primarios cultivados se pueden almacenar por congelación antes o después de la transferencia de genes. Este procedimiento permite el uso múltiple de los adipocitos después de una sola recogida.

2. Transferencia de genes a adipocitos

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

Cuando se realiza la transferencia de genes utilizando un plásmido, el plásmido se transfecta en adipocitos, y se pueden seleccionar aquellos adipocitos que mantienen de forma estable el gen extraño transferido. Estos adipocitos se pueden seleccionar, por ejemplo, equipando el plásmido que codifica el gen extraño con un gen de resistencia a fármacos, o realizando la transfección junto con un plásmido que porta un gen de resistencia a fármacos, y luego seleccionando las células transfectadas utilizando este fármaco. De otro modo, las células pueden ser obtenidas por clonación de las células transfectadas mediante técnicas de dilución limitantes. Además, cuando se realiza la transferencia de genes utilizando un plásmido, se puede utilizar un método de expresar transitoriamente una integrasa derivada del fago para aumentar la eficiencia de la inserción cromosómica (Mol. Cell Biol. junio de 2001, 21(12):3926-34).

En la presente invención, el gen LCAT es transferido a adipocitos utilizando un vector retroviral. Los retrovirus se refieren a los virus que pertenecen a la familia Retroviridae, e incluyen oncovirus, espumavirus (Russell, D.W. y Miller, A.D., J. Virol. 1996, 70:217-222; Wu, M. *et al.*, J. Virol. 1999, 73:4498-4501) y lentivirus (por ejemplo, VIH-1 (Naldini, L. *et al.*, Science 1996, 272:263-267; Poeschla, E. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:11395-11399; Srinivasakumar, N. *et al.*, J. Virol. 1997, 71:5.841-5848; Zufferey, R., *et al.* Nat. Biotechnol. 1997, 15:871-875; Kim, V.N., *et al.*, J. Virol. 1998,72:811-816) y el virus de la inmunodeficiencia felina (Johnston, J.C. *et al.*, J. Virol. 1999, 73:4991-5000; Johnston, J. y Power, C., J. Virol. 1999, 73:2491-2498; Poeschla, E.M. *et al.*, Nat. Med. 1998, 4:354-357)). Un vector retroviral preferible para su uso en esta invención es un vector del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) (T.M. Shinnick, R.A. Lerner y J.G. Sutcliffe, Nature 293, 543-548, 1981).

Los retrovirus pueden ser vectores auto-inactivantes (SIN). Un vector SIN se puede preparar mediante la supresión de una parte de la 3' LTR durante el empaquetamiento viral (Yu S.F. *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3194; Yee, J. K. *et al.*, 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5197-5201; Zufferey, R. *et al.*, 1998, J. Virology, 72, 9873-9880). El gen extraño en el retrovirus puede ser transcrito por LTR, o puede ser expresado a partir de otro promotor dentro del vector. Por ejemplo, se puede utilizar un promotor de la expresión constitutiva tal como promotor CMV, el promotor EF-1 $\alpha$  o el promotor CAG, o un promotor inducible deseado. Además de ello, se puede utilizar un promotor quimérico, en el que una parte de LTR está sustituida con otro promotor.

Para transferir genes utilizando retrovirus, específicamente, un plásmido que porta un gen a transferir, tal como pBabe CL-SEAP-IRES-GFP, es transferido por gen a células de empaquetamiento tales como las células 293-EBNA (Invitrogen), utilizando un reactivo de transferencia de genes y similar. Éste se cultiva luego durante un periodo de tiempo apropiado, preferiblemente uno a tres días, y los virus recombinantes producidos se recogen en el sobrenadante. A continuación, estos virus se infectan en los adipocitos a ser transfectados.

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

El título de los virus producidos se puede determinar mediante la infección de células con disoluciones víricas que han sido diluidas escalonadamente, y contando el número de colonias de células infectadas (para más detalles, véase Ausubel *et al.*) (Ausubel, F.M. *et al.* Comps. (1995) Current Protocols in Molecular Biology. (John Wiley & Sons, NY)). Alternativamente, el título se puede determinar mediante el método de Byun *et al.* (Byun, J. *et al.* (1996) Gene Ther. 33333:1018-1020), Tafuro *et al.* (Tafuro, S. *et al.* (1996) Gene Ther. 33333: 679-684), Miyao *et al.* (Miyao, Y. *et al.* (1995) Cell Struct Func. 20 20:177-183), Claudio *et al.* (Claudio, P. P. *et al.* (2001) Anal. Biochem. 291:96-101), o Cashion *et al.* (Cashion, L. M. *et al.* (1999) Biotechniques 26 26: 924-930).

Adipocitos primarios cultivados se pueden introducir con vectores virales poniendo en contacto los vectores con las células. Por ejemplo, adipocitos primarios cultivados se incuban en una disolución de cultivo que comprende vectores virales. Los adipocitos se infectan preferiblemente en forma de pre-adipocitos. La eficiencia de infección se puede aumentar mediante la adición de 0,5-8 µg/mL o así de polibreno. La multiplicidad de infección (MOI) no está particularmente limitada, sino que puede ajustarse de manera apropiada dentro del intervalo de 0,1 a 100. Células a las que se ha transferido un gen se pueden seleccionar utilizando un gen marcador, por ejemplo. Sin embargo, si la infección se lleva a cabo a una MOI de aproximadamente 2 o más, o preferiblemente de aproximadamente 3, 4, 5 o más, el gen se puede transferir a la mayoría de las células, incluso sin selección. Los adipocitos a los que se ha transferido un gen se pueden utilizar para la implantación sin tratamiento adicional o, en determinados casos, se pueden convertir en adipocitos maduros mediante cultivo en un medio que comprende 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), dexametasona e insulina. En tales casos, ya que IBMX y dexametasona se utilizan principalmente para activar el receptor-γ activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR-γ) de adipocitos, fármacos que activan directamente este receptor (por ejemplo, los derivados de tiazolidina, pioglitazona/Takeda Pharmaceutical Company Limited y rosiglitazona/GlaxoSmithKline) se pueden añadir al mismo tiempo.

Los adipocitos primarios cultivados de esta invención, que portan un gen LCAT terapéutico deseado, se pueden implantar en el cuerpo de un receptor emparentado inmunológicamente, permitiendo así la terapia génica mediante la expresión *in vivo* de la proteína secretora codificada por el gen terapéutico. Los adipocitos primarios cultivados a ser implantados son preferiblemente células del mismo huésped que el receptor. Los métodos de terapia génica en los que se implantan adipocitos primarios cultivados de esta invención pueden ser aplicados mediante la expresión de una proteína secretora de LCAT deseada en un cuerpo, en previsión de los efectos de esa proteína. Por ejemplo, un trastorno puede tratarse o prevenirse mediante la implantación de los adipocitos de esta invención, que mantienen un gen o genes LCAT que codifican una o unas proteínas LCAT que comprenden un efecto terapéutico o preventivo contra el trastorno. Además de ello, la presente invención se refiere a métodos de liberación de proteínas en el flujo de sangre, en donde los métodos comprenden la etapa de administrar los adipocitos primarios cultivados de esta invención en un cuerpo. Utilizando estos métodos, la proteína LCAT codificada por un gen LCAT extraño puede ser secretada de manera significativa en el flujo sanguíneo durante al menos 20 días o más, preferiblemente 30 días o más, más preferiblemente 40 días o más, incluso más preferiblemente 50 días o más, aún más preferiblemente 60 días o más, sin embargo, aún más preferiblemente 80 días o más, aún incluso más preferiblemente 100 días o más, aún incluso más preferiblemente 150 días o más, aún incluso más preferiblemente 200 días o más, aún incluso más preferiblemente 250 días o más, aún incluso más preferiblemente 300 días o más, y aún incluso más preferiblemente 350 días o más. El gen LCAT extraño expresado en un cuerpo puede detectarse y/o cuantificarse, por ejemplo, por inmunoensayos tales como EIA. La separación de las células trasplantadas puede detener en cualquier momento la expresión del gen LCAT extraño administrado. En determinados casos, mediante

la transferencia de un gen suicida inducible (p. ej., HSV-tk) a las células del injerto, las células del injerto pueden ser eliminados mediante la administración de ganciclovir, por ejemplo.

La presente invención también proporciona composiciones de implante para uso en la terapia génica, en donde las composiciones comprenden adipocitos cultivados primarios que contienen de manera estable un gen o genes LCAT extraños que codifican una o unas proteínas LCAT secretada al exterior de la célula, y soportes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de los soportes son solución salina fisiológica, tampón fosfato, disoluciones de cultivo, sueros y fluidos corporales. Estos también se pueden combinar con un soporte sólido o gel que se convierte en un almacén para las células.

Las composiciones de implante de la presente invención comprenden preferiblemente un componente de la matriz extracelular (ECM). Un componente de la matriz extracelular se refiere a un componente tal como una proteína o un mucopolisacárido comprendido en una red insoluble o estructura fibrosa acumulada entre las células. Éstas se pueden aislar a partir de organismos o se pueden reconstruir artificialmente. Componentes de ECM utilizados preferiblemente en esta invención son colágeno, fibronectina, vitronectina, laminina, sulfato de heparán, proteoglicano, glicosaminoglicano, sulfato de condroitina, hialuronato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, elastina, o combinaciones de dos o más de los anteriores. Preferiblemente, estos componentes de la ECM se transforman en un gel y luego se mezclan con los adipocitos. Geles ECM utilizados en esta invención no están particularmente limitados, siempre y cuando esté comprendido al menos uno o más de los componentes anteriormente mencionados, pero preferiblemente comprenden al menos colágeno de tipo IV, laminina y sulfato de heparán. ECMs de este tipo incluyen un sustrato extraído del tumor de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (Matrigel®) (Becton Dickinson Labware) (Patente de EE.UU. N° 4.829.000). La estructura de las composiciones que comprenden el componente de ECM y adipocitos utilizadas en la presente invención no está particularmente limitada, y puede ser, por ejemplo, una estructura de red de gel o pasta, una estructura fibrosa, una estructura plana (disco), estructura de panal y una estructura similar a una esponja. Componentes de la ECM pueden ser gelificados de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, la gelificación puede llevarse a cabo mediante la incubación de una disolución acuosa que comprende aproximadamente 0,3 a 0,5% de colágeno a 37°C durante diez a 30 minutos. De lo contrario, los componentes de ECM pueden ser gelificados utilizando un agente de gelificación.

Además de ello, las composiciones de implante de la presente invención comprenden preferiblemente un factor de la angiogénesis. Las composiciones de implante de esta invención que comprenden un factor de la angiogénesis provocan que se formen vasos sanguíneos alrededor de ellos después de la implantación, y pueden secretar una proteína extraña en el flujo sanguíneo con una mayor eficiencia. Los factores de angiogénesis no están particularmente limitados, siempre y cuando sean factores que pueden inducir la angiogénesis *in vivo*, y ejemplos son factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), osteonectina, angiopoyetina y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). El ejemplo más preferido es bFGF. bFGFs, que también se denominan FGF2, no son sólo factores de crecimiento de fibroblastos, sino que también comprenden la actividad de fomentar el crecimiento de diversas células tales como células endoteliales vasculares, cartílago, osteoblastos y células epidérmicas (Abraham *et al.*, EMBO J., 5, 2523-2528, 1986; Prats *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1836-1840, 1989). Los bFGFs utilizados en la presente invención no son sólo proteínas naturales, sino que también pueden ser producidos por ingeniería genética mediante tecnología de ADN recombinante, y formas modificadas de los mismos. Ejemplos de bFGFs son los descritos en los documentos WO87/01728, WO89/04832, WO86/07595, WO87/03885, las Publicaciones de Solicitud de Patente Europea N°s 237966, 281822, 326907, 394951 y 493737. Alternativamente, otro vector de expresión que expresa transitoriamente un factor de la angiogénesis puede ser introducido en los adipocitos (véase el documento WO97/49827). El principal objetivo de factores de la angiogénesis utilizados de esta manera es el de formar vasos sanguíneos alrededor de las células trasplantadas, de modo que la proteína extraña puede ser secretada de manera eficiente en el flujo sanguíneo a partir de los adipocitos de esta invención. Por lo tanto, cuando se utiliza un vector que codifica un factor de inducción vascular para expresar el factor de inducción vascular de los adipocitos, se prefiere el uso de un vector de expresión transitoria (más específicamente, un vector que no está incorporado en el cromosoma). Cuando los adipocitos expresan un factor de inducción vascular durante un largo período, las cantidades en exceso de los vasos sanguíneos se forman alrededor de los adipocitos implantados, que pueden provocar efectos secundarios sistémicos. Por lo tanto, es preferible que el gen extraño que codifica un factor de la angiogénesis no se transfiera de forma estable a los adipocitos de cultivo primario de esta invención.

### 3. Implantación de adipocitos

Adipocitos transferidos con genes se preparan a una concentración celular apropiada, preferiblemente  $0,2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^7$  células/mL, o  $0,2 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL cuando se transfecta con un retrovirus. Estos se infunden tal como en el tejido subcutáneo o tejido adiposo, preferiblemente el tejido subcutáneo, o por mezclas con un medio efectivo,



preferiblemente una disolución que comprende una matriz extracelular tal como colágeno. La inyección en el tejido adiposo se puede realizar haciendo una incisión y exponiendo el tejido adiposo. Las células que se han diferenciado terminalmente en adipocitos maduros no proliferarán después del trasplante, y expresarán el gen extraño durante un largo periodo a un nivel constante. El nivel de expresión de un gen extraño en un cuerpo que recibe un implante es proporcional al número de células implantadas. Por lo tanto, al realizar un implante, un nivel de expresión deseado se puede mantener durante un largo periodo en un cuerpo receptor de un implante mediante ajustando la cantidad de adipocitos que se implantan para alinearse con un nivel de expresión de genes extraños pre-medidos *in vitro*.

Breve Descripción de los Dibujos

La Fig. 1 es un conjunto de microfotografías de adipocitos primarios cultivados, aislados de la grasa subcutánea de ratones ICR de tres semanas de edad. (A) muestra los adipocitos que se adhirieron a la superficie de cultivo del lado del techo después de 14 días de cultivo de techo, (B) muestra los adipocitos primarios cultivados desarrollados en un cultivo normal, (C) muestra adipocitos maduros que han almacenado gotitas de lípidos debido a la inducción de la diferenciación y (D) muestra una imagen teñida con aceite rojo O de células en las que se ha inducido la diferenciación.

La Fig. 2 muestra la actividad de fosfatasa alcalina (AP) de plasma, obtenida mediante la implantación de ratones ICR inmunodeficientes con adipocitos primarios cultivados (derivados de la grasa subcutánea de ratones ICR) que son transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión de AP pcDNA3.1-SEAPmh.

La Fig. 3 muestra una comparación de la eficiencia de la transferencia de genes cuando el vector retroviral MLV (VSV) / pBabeCL (PLAP) IP es transducido a adipocitos primarios cultivados derivados de diversos tejidos adiposos.

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

La Fig. 5 muestra la duración de la expresión de AP en subcultivos de adipocitos primarios cultivados transducidos con un vector viral de la expresión de AP. (A) muestra el resultado de transferir el gen SEAP (MLV (VSV) / pBabeCL (SEAPmh) I2G) o el gen PLAP (MLV (VSV) / pBabeCL (PLAP) IP) a células derivadas de grasa subcutánea de ratones C57BL/6. (B) muestra el resultado de transferir el gen PLAP (MLV (VSV) / pBabeCL (PLAP) IP) o el gen GFP (MLV (VSV) / pBabeCL (GFP) IP) en adipocitos derivados de ratones ICR.

La Fig. 6 es un conjunto de fotografías y un gráfico que muestra el cambio en la expresión de adipocitos transferidos con genes e inducidos por la diferenciación. (A) muestra una imagen de microscopio óptico GFP de adipocitos primarios cultivados en condiciones no inductoras de diferenciación, en donde los adipocitos transfectadas con MLV (VSV) / pBabeCL (GFP) IP se derivan de grasa subcutánea de ICR. (B) muestra una imagen similar al microscopio de GFP tomada bajo condiciones que inducen la diferenciación. (C) muestra la producción de AP por parte de adipocitos primarios cultivados transfectados con MLV(VSV) / pBabeCL (PLAP) IP (derivados de grasa subcutánea de ICR) bajo condiciones no inductores de diferenciación (sin diferenciación) y condiciones que inducen la diferenciación (diferenciación).

La Fig. 7 muestra la producción de (pro)insulina por transfección del plásmido a adipocitos primarios cultivados.

La Fig. 8 muestra la expresión estable de AP en adipocitos primarios cultivados (derivados de grasa subcutánea de ratones C57BL/6) transfectados con AAV que expresa AP.

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

La Fig. 10 muestra la expresión de GLP-1(7-37) en adipocitos primarios cultivados transfectados con vector retroviral que expresa GLP-1(7-37). Las mediciones se realizaron por triplicado, y se muestran sus valores medios y las desviaciones estándar.

La Fig. 11 muestra el efecto de la presencia o ausencia de estimulación de pre-implantación de inducción de la diferenciación en la expresión de AP *in vivo* en la implantación de adipocitos primarios cultivados que expresan AP.

5 La Fig. 12 es un conjunto de gráficos y una fotografía. (A) muestra el cambio en la actividad de AP en plasma cuando se implantan adipocitos primarios cultivados que expresan AP en presencia de estimulación de la diferenciación utilizando un Matrigel suplementado con FGF básico. (B) muestra la pérdida de actividad de AP en plasma en la extirpación del Matrigel implantado (A individual). (C) muestra una imagen de microscopio óptico GFP del Matrigel extirpado del grupo de control que recibió células GFP transfectadas. Para el grupo implantado con PLAP mostrado en (A), los valores mostrados son la media del grupo y la desviación estándar de los valores medidos para cada uno de los individuos hasta el día 32°. Los valores restantes son valores medios.

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

10 La Fig. 14 muestra los resultados de realizar un ensayo de extirpación similar al de la Fig. 12(B) en la etapa tardía de trasplante.

La Fig. 15 muestra la dependencia de la actividad de AP en sangre del número de células implantadas cuando se implantan los adipocitos que expresan AP. Los valores indicados son la media del grupo y la desviación estándar de las mediciones de cada uno de los individuos.

15 La Fig. 16 muestra el efecto de implantar adipocitos que expresan insulina s1s2B10 a ratones diabéticos inducida por STZ. (A) muestra el efecto sobre el nivel de glucosa en plasma en ayunas, y (B) muestra el efecto sobre el peso corporal. Los valores indicados son la media del grupo y la desviación estándar de las mediciones de cada uno de los individuos.

#### Mejor Modo de Llevar a cabo la Invención

20 La presente invención se describirá en detalle a continuación con referencia a los Ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos. Todas las referencias citadas en esta memoria se incorporan en esta descripción.

[Ejemplo 1] Cultivo primario de los adipocitos murinos  
[Métodos]

25 Ratones ICR machos tres semanas de edad o ratones C57BL/6 machos de cuatro a cinco semanas de edad (ambos de Charles River) fueron anestesiados con dietiléter y se sacrificaron mediante la recogida de sangre entera del corazón. A continuación, la grasa subcutánea inguinal, o la grasa que rodea el epidídimo, y el tejido adiposo mesentérico fueron extirpadas individualmente bajo condiciones estériles. Los tejidos extirpados se lavaron con PBS, y luego se morcelaron utilizando un par de tijeras o un bisturí. Este tejido morcelado se digirió con sacudimiento a 37°C durante 20 a 60 minutos en medio normal (DMEM-alto contenido en glucosa/SIGMA, FCS al 10%) que comprende 1 mg/mL de colagenasa (fracción S1/gelatina Nitta), y luego se separó en precipitado y capa suspendida mediante centrifugación (300 g, cinco minutos).

30 La capa flotante se centrifugó adicionalmente una vez o dos veces para separar la colagenasa mediante dilución, y luego se añadió a una matraz T-25 (IWAKI) lleno con el medio. Se eliminaron las burbujas y esto se cultivó bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C, de modo que se invirtió la superficie de cultivo convencional (cultivo de techo). Diez a 14 días después del cultivo, las células que se adhieren a la superficie del techo se recogieron mediante tratamiento con tripsina y se transfirieron a un sistema de cultivo normal. El subcultivo se realizó a continuación, en una relación de 1:3 a 1:10.

35 Para inducir la diferenciación, el medio de las células cultivadas hasta la confluencia en una placa de 6 pocillos se transfirió a un medio de inducción (medio normal suplementado con IBMX 0,5 mM, dexametasona 0,25 μM y 10 μg/mL de insulina). Esta estimulación se continuó durante 48 horas. A continuación, las células se diferenciaron en un medio de maduración (medio normal suplementado con 10 μg/mL de insulina). El medio de maduración se intercambiaba cada tres días.

40 Disolución de tinción aceite rojo O se preparó mezclando una disolución madre, preparada mezclando 0,3 g de aceite rojo O en 100 mL de isopropanol (al 99%), con agua destilada en una relación de 3:2 en el momento de uso. Las células se lavaron con PBS y después se fijaron con disolución al 10% de formalina neutra (WAKO). Después de lavar de nuevo con PBS, las células se tiñeron con disolución de tinción aceite rojo O a temperatura ambiente durante diez minutos. Las células se lavaron con PBS de nuevo y luego se examinaron al microscopio.

## [Resultados]

La Fig. 1 es un conjunto de microfotografías de adipocitos primarios cultivados, aislados de la grasa subcutánea de ratones ICR de tres semanas de edad. Después de 14 días de cultivo de techo, se observó la adherencia de los adipocitos que portan gotitas de lípidos en la superficie del cultivo del lado del techo (A). Cuando estas células se transfirieron a un sistema de cultivo normal, mostraron crecimiento similar a fibroblastos tal como se muestra en (B). Sin embargo, cuando la diferenciación se indujo por parte de IBMX, dexametasona e insulina, las células se diferenciaron de nuevo en adipocitos maduros que portan gotitas de lípidos (C). La grasa almacenada se tiñó con tinción de aceite rojo O (D). Las células aisladas mediante este método mostraron ser adipocitos primarios cultivados que comprenden la capacidad de diferenciarse.

[Ejemplo 2] Transferencia transitoria del gen fosfatasa alcalina (AP) secretor termoestable a adipocitos primarios cultivados e implantación de adipocitos transfectados en ratones

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

## [Métodos]

(1) Producción de adipocitos primarios cultivados transitoriamente transfectados con el gen SEAP

El plásmido que expresa AP (pcDNA3.1-SEAPmh) se construyó insertando la secuencia de SEAP, obtenido por doble digestión de vector pSEAP2-básico (Clontech) con las enzimas de restricción HindIII-XbaI, en el sitio HindIII-XbaI de pcDNA3.1Myc-HisA (Invitrogen), que es un vector para la expresión en células de mamífero.

Para cada una de las transferencias de genes a una placa de 10 cm, se mezclaron 500  $\mu$ L de medio DMEM exento de FCS y 15  $\mu$ L de reactivo Fugene 6 (Roche), a continuación se añadieron 5  $\mu$ g de pcDNA3.1-SEAPmh. Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Esta mezcla se añadió a células primarias cultivadas (derivadas de la grasa subcutánea de ICR) cultivadas a 70 a 80% de confluencia en una placa de 10 cm. Esto se cultivó después durante 24 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>.

(2) Implantación a ratones con adipocitos primarios cultivados de genes transferidos con el gen fosfatasa alcalina

Células transferidas con genes se recogieron por tratamiento con tripsina, y se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación. Las células se suspendieron a continuación en PBS a  $1 \times 10^7$  células/mL. Los animales (ratones inmunodeficientes ICR, de cinco semanas de edad en el momento de la operación) se anestesiaron mediante administración intraperitoneal de 50 mg/kg de pentobarbital sódico (Nembutal; Dainippon Pharmaceutical). Después de la desinfección de la zona a operar con una disolución diluida de Hibitane (Sumitomo Pharmaceuticals) se practicó una incisión a 3 mm a 5 mm en la piel cerca de la base de la pata trasera derecha, y se expuso la grasa subcutánea inguinal. 0,55 mL de la disolución de suspensión celular preparada ( $5,5 \times 10^6$  células/cabeza) se cargaron en una jeringa de 1 mL y esto se inyectó en la grasa subcutánea utilizando una aguja de inyección de 22 G. Como control se inyectó PBS al mismo sitio. Para comparar esto con el método de suplementación de proteínas, 1  $\mu$ g de AP purificada (Roche) se disolvió en PBS en condiciones estériles, y esto se inyectó de una manera similar. La piel en la que se hizo la incisión se suturó y el sitio operado se desinfectó con Isodine quirúrgica (Meiji Seika).

La sangre se recogió utilizando un capilar recubierto de heparina (Dramond) del plexo venoso post-orbital antes de la implantación (día 0) y después de la implantación a lo largo del tiempo. Se obtuvo plasma de la sangre entera mediante centrifugación a 2000 g durante 15 minutos. La actividad de AP en este plasma se midió utilizando un kit de ensayo (kit de ensayo de gen informador SEAP, Roche) siguiendo las instrucciones adjuntas.

## [Resultados]

La Fig. 2 muestra la actividad de AP en plasma lograda mediante la implantación de ratones con células primarias cultivadas, que han sido transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA3.1-SEAPmh que expresa fosfatasa alcalina (AP). Para fines de comparación, a los ratones se les administró 1  $\mu$ g de proteína AP purificada (Roche) mediante inyección. Siete días después de la administración, la actividad AP en la sangre en estos ratones disminuyó hasta el nivel del control. Por otro lado, la actividad de AP en sangre en ratones que recibieron un implante de células que contienen genes transitoriamente transferidos se confirmó en el pico el cuarto día después

del implante, y la duración de la expresión era de 14 días. La duración de la expresión *in vivo* mediante la implantación de células que portan el gen transferido transitoriamente era corto, y se encontró que la concentración en sangre variaba en gran medida, aunque se mantuvo más tiempo que mediante la inyección de proteína.

[Ejemplo 3] Producción, mediante el uso de un vector viral, de los adipocitos que expresan AP de forma estable

5 [Métodos]

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

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

- 10 El plásmido, pBabeCLX12G, utilizado para la producción de vector viral, se produjo sobre la base de pBabePuro (Morgenstern, J.P. *et al.* Nucleic Acids Res. vol.18, 3587-3596 (1990)), mediante la escisión de su promotor SV40 y genes de resistencia a neomicina utilizando *SalI*-*ClaI*, y haciendo romos esos extremos con fragmentos de Klenow, a continuación reemplazando éstos con el sitio de re-entrada al ribosoma interno (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), que se escindió de pIRES2-EGFP mediante *HincII*-*HincII*, y la proteína verde fluorescente (GFP); a continuación, reemplazando la porción de la repetición terminal larga (LTR) por el sitio de inserción del gen extraño (sitio de multiclonación) (*SspI*-*BamHI*) con una secuencia correspondiente (*SspI*-*BamHI*) de pCLXSN (IMGENEX). Además de ello, también se utilizó pBabeCLXIP, en el que la porción IRES-GFP de pBabeCLX12G había sido reemplazada por el gen de resistencia a puromicina IRES.

- 20 Cada uno de los fragmentos de ADN de PLAP, SEAP y GFP arriba mencionados se hicieron romos con fragmentos de Klenow, y luego se insertaron en el vector pBabeCLXIP o pBabeCLX12G escindido con *Hpa* I, proporcionando pBabeCL(PLAP)IP, pBabeCL(SEAPmh)12G y pBabeCL(GFP)IP, respectivamente.

(2) Producción de vectores virales

- 25 Cada una de las transferencias de genes a una placa de 10 cm se realizó como sigue: 30 µl de reactivo de transfección de plásmidos TransIT (MIRUS) se mezcló en 500 µl de medio DMEM exento de FCS, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante cinco minutos (disolución mixta de DMEM/TransIT). En un tubo separado, 3,3 µg de un vector que codifica VSV-G (pCALG, modificado de acuerdo con Arai, T. *et al.*, J. Virol., 1998, 72, págs. 1115-21), 3,3 µg de un vector que codifica Gag-Pol (sistema pCLAmpho/RetroMax (IMGENEX)) y se mezclaron 3,3 µg de un vector que comprende una señal de empaquetamiento y el gen transferido (pBabeCL(PLAP)IP, pBabeCL(SEAPmh)12G o pBabeCL(GFP)IP), para un total de 9,9 µg (disolución de plásmido). La disolución de plásmido se añadió a la disolución mixta de DMEM/TransIT, se mezcló a fondo y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Esto se añadió después a células 293-EBNA (Invitrogen), cultivadas durante la noche de  $2 \times 10^6$  células/placa de 10 cm el día anterior.

- 35 El medio se intercambió ocho horas después de la adición, y el sobrenadante del cultivo se recogió después de cultivar durante otros dos días. El sobrenadante del cultivo recogido se centrifugó (300 g, cinco minutos) o se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm (Millipore) para separar los contaminantes, y este sobrenadante se utilizó como la disolución de virus (MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP, MLV(VSV)/pBabeCL(SEAPmh)12G y MLV(VSV)/pBabeCL(GFP)IP, respectivamente). Algo de la disolución de virus se concentró mediante ultracentrifugación (19.500 rpm, 100 minutos) y luego se utilizó.

(3) Transferencia de genes a y cultivo de adipocitos primarios cultivados

- 40 Los adipocitos a utilizar para la transferencia de genes (derivados de grasa subcutánea, grasa que rodea el epidídimo y grasa mesentérica de ratones ICR, y la grasa subcutánea de ratones C57BL/6) se prepararon en placas de 6 pocillos o de 96 pocillos, de modo que eran 50 a 80% confluentes el día antes de la transfección. El medio se desechó, y cantidades iguales de 4 µg/mL de disolución de Polybrene (SIGMA) y disolución de virus se añadieron a las células para transducir el vector viral. Ocho horas después de la transducción, el medio se cambió a un medio normal y se realizó un cultivo y un subcultivo adicionales. La actividad de AP de una porción de las células se midió recogiendo el sobrenadante del cultivo de 24 horas en el cuarto día después de la transfección (Fig. 3).

El subcultivo se realizó de acuerdo con el método del Ejemplo 1 en una escala de placa de 10 cm. Las células se cultivaron durante cuatro a siete días, y se intercambió el medio tras alcanzar la confluencia. La actividad de AP se

midió en el sobrenadante del cultivo 17 horas más tarde. Estas células se subcultivaron de forma continua y al realizar apropiadamente manipulaciones similares, se examinó el mantenimiento de la expresión (Figs. 5 y 6). La actividad de AP no se midió cada vez que se realizó el subcultivo.

5 La diferenciación se indujo en placas de 6 pocillos de acuerdo con el método del Ejemplo 1. Sin embargo, el tratamiento se llevó a cabo durante tres días con medio de inducción, que fue reemplazado por medio de maduración cada tres días a partir de entonces. La actividad AP del sobrenadante del cultivo se midió utilizando el sobrenadante del cultivo obtenido cada tres días, y los ejes x en las figuras muestran el día en que se recogió el sobrenadante. Para las células transfectadas con GFP, se tomaron microfotografías bajo luz GFP adecuada (Figs. 4 y 6). Condiciones no inductoras de diferenciación se refieren a condiciones en las que el cultivo se continúa en un medio normal en lugar de un medio de inducción o medio maduro.

[Resultados]

15 La Fig. 3 es una comparación de la eficiencia de transferencia de genes para cada uno de los tipos de células derivadas de tejido cuando se utilizan vectores retrovirales. La actividad AP se confirmó en el sobrenadante de cultivo de todas las células cuando la transferencia génica se realizó en los adipocitos primarios cultivados, aislados de cada uno de los tejidos adiposos existentes en el tejido inguinal subcutáneo, zona alrededor del epidídimo y el mesenterio de ratones ICR. Esto mostró que los vectores retrovirales pueden transferir genes independientemente del sitio del origen celular.

20 La Fig. 4 es un conjunto de microfotografías que muestra imágenes de la inducción por diferenciación de células transducidas con un vector retroviral que expresa GFP. La inducción de la diferenciación se inició 13 días después de la transferencia de genes, y las fotografías se tomaron tres semanas más tarde. La fluorescencia de GFP se observó en células que contienen gotitas de lípidos, que mostraron que el vector viral puede transferir genes en pre-adipocitos que poseen la capacidad de diferenciarse, y que la transferencia de genes por parte del vector no afecta a su capacidad de diferenciarse.

25 La Fig. 5 muestra la continuidad de expresión en los subcultivos de adipocitos primarios cultivados transfectados con un vector viral que expresa AP. La actividad de AP se midió en el sobrenadante del cultivo tomada 17 horas después de que las células alcanzaran la confluencia en una placa de 10 cm. La producción continua de AP fue confirmada a lo largo de los 87 días durante los cuales se examinaron (A) adipocitos primarios cultivados, derivados de la grasa subcutánea de ratones C57BL/6, y a lo largo de los 63 días durante los cuales se examinaron (B) adipocitos primarios cultivados, derivados de la grasa subcutánea de ratones ICR. Estos resultados demostraron que la transducción del vector viral a adipocitos primarios cultivados puede producir células de expresión estable que mantienen los genes extraños en las células hijas producidas después de la división.

35 La Fig. 6 es un conjunto de fotografías y un gráfico que muestra cambios de la expresión en los adipocitos transferidos con genes inducidos por diferenciación. Adipocitos que expresan GFP derivados de grasa subcutánea de ICR mostraron una fuerte expresión de GFP tanto en condiciones de cultivo normales (A) como en condiciones que inducen la diferenciación (B). Además de ello, adipocitos que expresan AP derivados de grasa subcutánea de ICR mostraron la expresión continua de AP bajo condiciones inductoras de no diferenciación (no-diferenciación) y condiciones inductoras de diferenciación (diferenciación) (C). Se encontró que los adipocitos primarios cultivados que fueron transferidos con genes por los vectores virales expresan de forma estable genes en cualquier fase, no sólo en las condiciones de proliferación descritas en la Fig. 5, sino también en condiciones inductoras de no diferenciación, o más específicamente en condiciones no proliferativas o condiciones maduras.

[Ejemplo 4] Producción, utilizando un vector de plásmido, de adipocitos que expresan insulina de forma estable

Métodos de transferencia de genes incluyen métodos que utilizan vectores de plásmidos.

[Métodos]

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

45 La PCR se realizó en un banco de ADNc derivado de páncreas humano (Stratagene), utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 1 (insulina Fw (directa) y Rv (inversa)). Se obtuvo un fragmento de gen de la insulina humana. Se determinó la secuencia de nucleótidos de este fragmento de 354 pb obtenido, y el fragmento se subclonó en el vector pCR2.1TOPO (Invitrogen) como insulina nativa.

Tabla 1

Secuencias de cebador utilizadas para la PCR

Cebador	Secuencia de nucleótidos (5' -)
Insulina Fw	CATAAGCTTACC <b>AT</b> GGCCCTGTGGATGCGC (SEQ ID NO: 1)
Insulina Rv	CATTCTAGACT <b>AG</b> TTCAGTAGTTCTCCAG (SEQ ID NO: 2)
sitio 1	CTTCTACACACCCAGG <b>ACCAAG</b> CGGGAGGCAGAGGAC (SEQ ID NO: 3)
sitio 2	CCCTGGAGGG <b>AT</b> CCCGGCAGAAAGCGTGG (SEQ ID NO: 4)
B10	CACCTGTGCGG <b>AT</b> CCGACCTGGTGGAAGC (SEQ ID NO: 5)
sPL-GLP-1Fw	TTCCACC <b>AT</b> GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCCTGAGGCTACAGCTCT- -CCCTGGGCCATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTG (SEQ ID NO: 6)
sPL-GLP-1Rv	A <b>ATT</b> ATCCTCGGCCTTTCACCAGCCAAGCAATGAACTCCTTGGCAGCTTG- -GCCTTCCAATAAGAACTTACATCACTGGTAAAGGTCCCTTCAGC (SEQ ID NO: 7)
GLP-5'	TTCCACC <b>AT</b> GCTGCTGCTGC (SEQ ID NO: 8)
GLP-3'	A <b>ATT</b> ATCCTCGGCCTTTCACCAG (SEQ ID NO: 9)

5 (Las letras en negrita designan el codón de iniciación en Fw y el antisentido del codón de parada en Rv El subrayado indica porciones mutadas).

A continuación, con el fin de expresar insulina madura en los adipocitos, se realizó una modificación genética basada en la bibliografía (JBC, 1994, 269(8), 6241-). Más específicamente, cebadores de ambas direcciones se sintetizaron individualmente para que contuvieran mutaciones en cada uno de los sitios de unión entre la cadena B de insulina humana y el péptido C (sitio1), entre el mismo péptido C y una cadena A (sitio 2), y el 10º residuo de histidina de la cadena B (B10) (Tabla 1). Los mutantes se obtuvieron utilizando un kit de mutagénesis Quikchange (Stratagene). Al realizar esta reacción en el sitio 1 y el sitio 2 se proporcionó el mutante s1s2. Al realizar la reacción en el sitio 1, el sitio 2 y B10 proporcionó insulina mutante s1s2B10. Después de confirmar la secuencia de nucleótidos del gen de la insulina humana modificado obtenido, el gen fue incorporado en el vector pcDNA3.1, y luego se utilizó para la transferencia de genes.

(2) Transferencia de genes en adipocitos primarios cultivados

Después de mezclar 500 µL de medio DMEM exento de FCS y 15 µL de reactivo Fugene 6 (Roche), se añadieron 5 µg de plásmido de transfección y luego esto se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La disolución mixta se añadió a adipocitos primarios cultivados (derivadas de tejido adiposo alrededor del epidídimo de ratones C57BL/6), que habían sido cultivados a 70 a 80% de confluencia en una placa de 10 cm. Esto se cultivó durante 24 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Cuatro días después de la transferencia de genes, las células se subcultivaron en un matraz T225, y se cultivaron durante la noche. El medio se intercambió entonces por un medio que comprendía 0,2 mgU/mL de G418 (SIGMA), y se continuó el cultivo durante tres semanas, después de lo cual se seleccionaron las células transferidas con genes. Las células resistentes a G418 obtenidas se sembraron en una placa de 10 cm, y la cantidad de insulina en el sobrenadante del cultivo se midió utilizando un kit EIA de insulina ultrasensible (Morinaga). Este kit EIA detecta tanto la proinsulina, que todavía no ha sido procesada, como la insulina madura.

[Resultados]

La Fig. 7 muestra la producción de (pro)insulina por la transfección del plásmido en adipocitos primarios cultivados. Cada uno de los vectores pcDNA3.1Myc-His que incorporan individualmente el gen de la insulina humana nativa (nativo) y sitio 1/sitio 2/forma modificada B10 (s1s2B10), o un vector vacío (testigo), se transfectó en adipocitos derivados del tejido adiposo que rodea al epidídimo de los ratones C57BL/6. (Pro)insulina humana se detectó en el

sobrenadante del cultivo de células resistentes obtenidas mediante selección con G418. Esto demostró que también es posible la transferencia de genes estable a adipocitos primarios cultivados utilizando un vector de plásmido.

[Ejemplo 5] Producción, utilizando un virus adeno-asociado, de adipocitos que expresan AP de forma estable

Métodos de transferencia de genes incluyen métodos que utilizan virus adeno-asociados (AAV).

#### 5 [Métodos]

El estudio se llevó a cabo utilizando el sistema exento de helper AAV (Stratagene). El fragmento PLAP del Ejemplo 2 (un fragmento escindido mediante el uso de *HindIII* y *BglII*) fue insertado en el mismo sitio de la enzima de restricción del vector pAAV-MCS, proporcionando pAAV-PLAP.

10 La producción del vector AAV se realizó como sigue: 1,75 mL de OPTI-MEM (Invitrogen) se mezclaron con 220  $\mu$ L del reactivo de transfección de plásmido Fugene, a continuación se incorporaron por mezcla 25  $\mu$ g de cada uno de pAAV-PLAP, pAAV-RC y pHelper, y éstos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos (disoluciones de Fugene/plásmido). Mientras tanto, se prepararon células 293-EBNA cultivadas hasta un 60 a 70% de confluencia en una placa de 15 cm. La disolución de cultivo se cambió a DMEM exento de FCS, a continuación se instiló de manera uniforme disolución de Fugene/plásmido, y esto se cultivó durante dos a tres horas. A 15 continuación, se añadió FCS a una concentración final de 10%, y esto se cultivó durante dos días más. Las células se recogieron mediante tratamiento con tripsina y centrifugación, y luego se suspendieron en disolución de Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM de modo que el volumen final era de 3 mL. Las células se rompieron realizando tres ciclos de congelación-descongelación con hielo seco-etanol/37°C en esta disolución de suspensión. Además de ello, después de degradar el ADN genómico huésped utilizando Benzonase (SIGMA), la disolución del virus se produjo por 20 centrifugación a 9.000 rpm durante 30 minutos, seguido de filtración del sobrenadante.

Adipocitos primarios cultivados (derivadas de grasa subcutánea de ratones C57BL/6) se sembraron en una placa de 12 pocillos a razón de  $1 \times 10^4$  células/pocillo el día antes de la transferencia del gen, y se cultivaron. Luego fueron tratados durante seis horas en un medio que contenía 40 mM de hidroxurea y 1 mM de ácido butírico (ambos de SIGMA). Después de retirar este medio, se añadieron 0,5 mL/pocillo de la disolución de virus y se diluyó a 1/100 con 25 DMEM exento de FCS. Después de cultivar durante una hora, se añadió medio que contiene FCS a una concentración final de 10%, y esto se cultivó durante la noche. Después de ello, se realizaron intercambios de medio normal y el subcultivo se realizó el día 24.

El medio se intercambió en el primero, séptimo y 25º día de la transferencia, y el sobrenadante del cultivo recogido dos días después de cada cambio se utilizaron para los ensayos de AP. 10  $\mu$ L del sobrenadante, que se diluyó en caso necesario, se calentó a 65°C durante 20 minutos, a continuación se mezclaron 50  $\mu$ L de tampón de ensayo (NaHCO<sub>3</sub> 16 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 12 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM) y 50  $\mu$ L de reactivo de tinción luminiscente (CDP-Star Ready para uso con Sapphire II, TROPIX), se hizo reaccionar en la oscuridad durante 30 minutos, y luego se midió con un 30 luminómetro.

[Resultados]

35 La Fig. 8 muestra la expresión estable de AP en adipocitos primarios cultivados (derivados de grasa subcutánea de ratones C57BL/6) transfectados con AAV que expresa AP. La actividad de AP se detectó en el sobrenadante del cultivo durante todo el período de examen. Esto demostró que la transferencia génica estable a adipocitos primarios cultivados se puede lograr utilizando un vector AAV.

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

[Métodos]

45 El gen de la insulina humana modificada construido en el Ejemplo 4 (s1s2B10Ins) se insertó en el vector pBabeCLX12G siguiendo el método del Ejemplo 3 (pBabeCL (s1s2B10Ins)I2G). Este plásmido, junto con un vector que codifica VSV-G (pVPack-VSV-G/Stratagene), y el vector que codifica Gag-Pol (modificado de pVPack-gp/Stratagene) se introdujeron en células 293-EBNA de acuerdo con el método del Ejemplo 3, produciendo así el vector retroviral que expresa insulina modificada (MLV(VSV)/pBabeCL (s1s2B10Ins)I2G). Se recogió el sobrenadante del cultivo (aproximadamente 200 mL) de células 293-EBNA de veintidós placas de 10 cm, el material insoluble se separó mediante tratamiento de centrifugación/filtración, y después se proporcionó mediante

ultracentrifugación la disolución de virus concentrado (19.500 rpm, 100 minutos). Este fue transferido a adipocitos primarios cultivados (derivadas de grasa subcutánea de ratones C57BL/6), que había sido sembrada en una placa de 6 pocillos el día anterior.

5 Las células transferidas con genes se volvieron a sembrar en una placa de 6 pocillos, y la diferenciación se indujo de acuerdo con el método del Ejemplo 1. Cada uno de los sobrenadantes del cultivo se recogieron en cada caso durante tres días, a partir de tres días antes de la inducción hasta el día del inicio de la inducción (pre-inducción), y durante tres días a partir del 14° al 17° día de la inducción (post-inducción). La cantidad de insulina se ensayó por el mismo método que en el Ejemplo 4. Además de ello, para confirmar que el procesamiento se produjo en los sitios deseados, y que se produjo la insulina madura, se realizaron mediciones utilizando el kit de EIA de insulina (IBL),  
10 que sólo reconoce insulina madura. Se utilizó como control el sobrenadante del cultivo de las células no transferidas con genes, las cuales fueron sometidas simultáneamente a la inducción de la diferenciación.

#### [Resultados]

15 La Fig. 9 muestra la expresión de insulina en el momento de inducción de la diferenciación en adipocitos primarios cultivados transducidos con el vector retroviral s1s2B10 que expresa insulina. (A) muestra los resultados de utilizar EIA producido por Morinaga, y (B) muestra los resultados de utilizar EIA producido por IBL. Estos resultados demuestran que la insulina es secretada de forma estable tanto antes como después de la inducción de diferenciación, y que la transferencia del gen de la insulina mutante puede provocar la producción de insulina madura a partir de adipocitos.

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

25 GLP-1 es un péptido que se produce a partir de pequeñas células L intestinales durante la ingesta de alimentos, y comprende el efecto de la secreción de insulina estimulante al actuar sobre células  $\beta$  pancreáticas. También se sabe que GLP-1 tiene una diversidad de otros efectos anti-diabéticos y anti-obesidad tales como un efecto de regeneración en células  $\beta$  pancreáticas, un efecto supresor del apetito y un efecto inhibitor sobre el vaciado gástrico (Meier, J.J. *et al.* Eur. J. Pharmacol. 2002, 12; 440(2-3):269-79; Drucker, D.J. Gastroenterology 2002; 122(2):531-544). Un péptido que comprende las posiciones 7 a 37 de la secuencia de aminoácidos de GLP-1 (o hasta la posición 36 en la forma amida), se forma por el procesamiento específico para el tejido del polipéptido producido a partir del gen de preglucagón, y se sabe que comprende la actividad farmacológica principal (Drucker, D.J. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. mayo de 1987; 84(10): 3434-3438; Kreymann, B. *et al.* Lancet. 1987, 5; 2(8571): 1300-1304; Mojsov, S. *et al.* J. Clin. Invest. febrero de 1987; 79(2):616-619). Se llevó a cabo el examen siguiente con el fin de producir este factor de adipocitos.

#### [Métodos]

35 Se diseñó una secuencia de nucleótidos con un total de 156 pares de bases, que comprende una secuencia (SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia codificadora), en la que GLP-1 humano (7-37) y un codón de parada están enlazados al péptido señal (17 aminoácidos) del gen PLAP utilizado en el Ejemplo 3. Los nucleótidos se sintetizaron de manera que un solapamiento 22mero estaba compuesto en el centro (sPL-GLP-1Fw y sPL-GLP-1Rv en la Tabla 1). Estos fueron re-asociados y se formó una doble hebra utilizando Pfu polimerasa (Strataqene). A continuación, el fragmento diana se amplificó mediante PCR utilizando cebadores 5'-extremo y 3'-extremo (GLP-5' y GLP-3' en la Tabla 1). Este fragmento fue subclonado en el vector pCR2.1 y después se escindió utilizando enzimas de restricción, y subsiguientemente se insertó en el vector pBabeCLX12G, como en el Ejemplo 3 (pBabeGL(sPL-GLP1)12G). Éste se transfectó en células 293 EBNA por un método similar al del Ejemplo 6, produciendo un vector retroviral que expresa GLP-1 (MLV(VSV)/pBabeCL(sPL-GLP-1)12G). Se recogieron aproximadamente 90 mL del sobrenadante del cultivo de células 293-EBNA a partir de nueve placas de 10 cm. El material insoluble se separó mediante tratamiento de centrifugación/filtración, y luego el sobrenadante se ultracentrifugó (19.500 rpm, 100 minutos) para producir una disolución concentrada de virus. Ésta fue transducida en adipocitos primarios cultivados (derivados de grasa subcutánea de ratones C57BL/6) que había sido sembrada en una placa de 6 pocillos el día anterior. Los adipocitos transfectados se sembraron de nuevo en una placa de 12 pocillos, y la inducción de la diferenciación se llevó a cabo de acuerdo con el método del Ejemplo 1. "No inducida" se refiere a una condición en la cual se continuó el cultivo en un medio normal en vez de en un medio de inducción o medio maduro. Siete días más tarde, se cambió el medio a medio DMEM exento de FCS que comprende Valina-pirrolidina 1 mM (inhibidor de la enzima de degradación GLP-1; sintetizado en Eisai). El sobrenadante del cultivo se recogió 18 horas más tarde, y la cantidad de GLP-1 activa (7-37) se midió utilizando ELISA (LINCO).



## [Resultados]

La Fig. 10 muestra el nivel de expresión en adipocitos primarios cultivados, transfectados con el vector retroviral que expresa GLP-1(7-37). Se observó la expresión de la forma activa de GLP-1(7-37) en el sobrenadante de cultivo de adipocitos tanto inducidos por no diferenciación como inducidos por diferenciación. Esto demostró que incluso cuando se produce un factor como el de tipo prepro y luego se corta mediante procesamiento, este método permite la producción de solamente el factor de los adipocitos.

[Ejemplo 8] Implantación a ratones de células que expresan AP de forma estable (Ensayo 1)

## [Métodos]

Después de cultivar las adipocitos que expresan AP (transducidos con MLV(VSV)pBabeCL(PLAP)IP; derivados de grasa subcutánea de C57BL/6) producidos por el método del Ejemplo 3 hasta confluencia, las células se recogieron mediante tratamiento con tripsina, se lavaron con PBS y se suspendieron a razón de  $5 \times 10^7$  células/mL en Matrigel enfriado con hielo (Becton Dickinson). La implantación se realizó mediante la inyección de esto en la zona dorsal subcutánea (Sc) de ratones C57BL/6 (de ocho semanas de edad en el momento de la operación; Charles River) a una dosis de 0,2 mL por ratón ( $1 \times 10^6$  células/cabeza) (sin inducción de la diferenciación). Por otro lado, las mismas células se cultivaron hasta confluencia, después se cultivaron durante tres días en el medio de inducción del Ejemplo 1, y luego se implantaron por métodos similares (con inducción de la diferenciación). Se recogió sangre con el tiempo por el método indicado en el Ejemplo 2, y se midió la actividad de AP en el plasma.

## [Resultados]

La Fig. 11 muestra el cambio en la actividad de AP en plasma en ratones a los que se implantaron adipocitos primarios cultivados que expresan AP. Los individuos que recibieron un implante de células sometidas a estimulación inductora de diferenciación durante tres días antes de la implantación ("con inducción de diferenciación") mostraron una menor fluctuación en la expresión continuada que los individuos que recibieron un implante de células que no fueron inducidas. Sin embargo, ambos métodos de implantación mostraron una expresión continuada sobre la totalidad de los 50 o así días de examen. Esto demuestra que la tasa de supervivencia después del trasplante de las células puede mejorarse proporcionando una estimulación inductora de la diferenciación.

[Ejemplo 9] Implantación a ratones de células que expresan AP de forma estable (Ensayo 2)

## [Métodos]

## (1) Implantación

Los adipocitos que expresan AP (transducidos con MLV(VSV)pBabeCL(PLAP)IP; derivados de grasa subcutánea de ICR) producidos en el Ejemplo 3 se cultivaron hasta confluencia. Las células se recogieron mediante tratamiento con tripsina, se lavaron con PBS y se suspendieron en  $5 \times 10^7$  células/mL en un Matrigel enfriado con hielo (Becton Dickinson) al que se añadió 1  $\mu\text{g/mL}$  de bFGF (Genzyme Techne). La implantación se realizó mediante la inyección de éste a una dosis de 0,2 mL por ratón ( $1 \times 10^6$  células/cabeza) a cada uno de los sitios (zona subcutánea dorsal (Sc), grasa subcutánea inguinal (grasa) y la región intraperitoneal (ip)), de los ratones ICR inmunodeficientes (de seis semanas de edad en el momento de la operación, Charles River). Como control, adipocitos que expresan GFP fueron tratados de manera similar y fueron implantados en el tejido subcutáneo.

Algunas de las células que expresan AP-se cultivaron durante tres días mediante el medio de inducción del Ejemplo 1, y luego se recogieron y se implantaron de la misma manera (Dif). Después de utilizar el medio de inducción, algunas de estas células se cultivaron durante cuatro días en un medio de maduración y luego se recogieron e implantaron de la misma manera (Mat).

Además de ello, algunas de las células que expresan AP se sembraron en una cámara Labteck de 8 pocillos (Nunc) en las mismas condiciones a las utilizadas para la implantación ( $1 \times 10^6$  /0,2 mL de Matrigel al que añadió bFGF) y las células se solidificaron por calentamiento a  $37^\circ\text{C}$ . La implantación se consiguió mediante la inserción de este gel solidificado en la zona subcutánea del ratón. En esta memoria, a las células cultivadas en un medio normal después de la solidificación se las alude como pre-fijadas (pf)/gr, y a las células cultivadas en un medio inductor de la diferenciación se las alude como pf/dif. La implantación se llevó a cabo después de siete días de cultivo.

La actividad AP en el plasma se midió a lo largo del tiempo, antes de la implantación (día 0) y después de la implantación, de acuerdo con el método del Ejemplo 2.

(2) Extirpación

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

[Resultados]

15 La Fig. 12 (A) muestra el resultado de examinar el cambio en la actividad de AP en plasma a lo largo de 50 días, cuando se implantaron adipocitos primarios cultivados que expresan AP utilizando Matrigel al que se añadió FGF básico, en presencia de estimulación de diferenciación (grupo Dif/Sc). El cambio en la actividad de AP en sangre era estable durante 49 días a lo largo de un intervalo de aproximadamente 5 veces. Esto demostró que la adición de bFGF en el momento de la implantación puede mejorar adicionalmente la tasa de injerto post-implantación. (B) muestra la desaparición de la actividad de AP en plasma debido a la extirpación del Matrigel implantado (individuo A) durante el mismo período. La actividad de AP en los individuos extirpados se disminuyó significativamente en comparación con el valor promedio del grupo transducido con PLAP. Esto demostró que AP de la sangre se deriva de las células implantadas, y que la extirpación del injerto puede eliminar rápidamente la expresión génica. En este momento, se realizó también la extirpación de una porción del grupo de control, al cual se implantaron células transfectadas con GFP. Se encontraron células GFP-positivas en el Matrigel extirpado, y muchas de ellas mostraron una imagen vacuola (C) similar a la mostrada en la Fig. 6(B). Esto demostró que los adipocitos de cultivo primario implantados por este método pueden ser injertados como tejido adiposo maduro *in vivo*.

25 La Fig. 13 muestra el resultado de un examen a largo plazo de la actividad de AP en sangre en los ratones implantados de la Fig. 12(A), y en ratones que recibieron un implante por una diversidad de otros métodos. En el grupo implantado con células transfectadas con PLAP, se confirmó un claro incremento de la actividad de AP en sangre para todos los sitios de implantación y métodos de implantación. La actividad de AP en sangre se mantuvo durante un largo período y, en particular, se observó una expresión estable de AP durante un año durante el periodo de ensayo del grupo Dif/Sc (el grupo descrito en la Fig. 12(A)). La producción continua de AP también fue confirmada para los otros métodos de implantación, todos durante el período de examen (316 días para el grupo ip, 54 días para el grupo de grasa, 225 días para el grupo Sc, 317 días para el grupo Mat/Sc y 314 días para los dos grupos de pre-fix). El pico de actividad observada en el espacio de una semana de la implantación era el más alto en el grupo de ip. Los valores más altos estaban entonces en el orden de Sc>grasa>Dif/Sc≅pf-dif>pf-gr≅Mat/Sc. El intervalo de variación después de la implantación se observó como una relación entre la actividad después de 13 semanas y la actividad pico, que se puede comparar en todos los grupos. La varianza era la más pequeña, aproximadamente tres veces, en los dos grupos de pre-fix, aproximadamente cinco veces en los grupos de ip, Dif/Sc y Mat/Sc, y aproximadamente diez veces en los grupos Sc y grasa. El valor de pico inmediatamente después de la implantación y el intervalo de variación después de la implantación diferían para cada uno de los métodos de implantación. Por lo tanto, se puede utilizar cualquiera de estos métodos de acuerdo con las características del producto génico utilizado, las características patológicas y la simplicidad de la técnica. Esto demostró que la implantación de adipocitos primarios cultivados, a los que se introdujeron de manera estable genes *ex vivo*, puede ser realizada por una diversidad de métodos, y es posible después de la implantación esa expresión génica *in vivo* estable a largo plazo.

45 La Fig. 14 muestra el resultado de realizar un experimento de extirpación, similar al descrito en la Fig. 12(B), en la etapa posterior de la implantación. Se confirmó que la actividad de AP en sangre después de la extirpación desaparecía rápidamente, no sólo en individuos en los que se realizó la extirpación en las etapas tempranas de la implantación (individuo A), sino también en individuos en los que se realizó la extirpación en las últimas etapas de la implantación (individuo B). Esto demostró que los adipocitos implantados por este método están localizados en el sitio implantado durante un largo periodo después de la implantación, y su extirpación, cuando sea apropiado, puede eliminar la expresión génica independientemente del momento.

[Ejemplo 10] Trasplante de ratones con células que expresan AP de forma estable (Ensayo 3)

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

[Métodos]

5 Los adipocitos que expresan AP producidos en el Ejemplo 3 (transfectados con MLV(VSV)/pBabeCL(PLAP)IP; derivados de grasa subcutánea de ICR) se cultivaron hasta confluencia. Las células se cultivaron durante tres días en el medio de inducción indicado en el Ejemplo 1, y luego se recogieron mediante tratamiento con tripsina. Después de lavar con PBS, las células se suspendieron a razón de  $5 \times 10^7$  células/mL en Matrigel. Se llevó a cabo escalonadamente una dilución quintuple en la disolución de suspensión de células AP utilizando Matrigel, y se prepararon  $1 \times 10^7$  células/mL y  $2 \times 10^6$  células/mL, respectivamente. bFGF se añadió a estas disoluciones a una  
10 concentración final de  $1 \mu\text{g/mL}$ , y fueron luego implantadas en la zona subcutánea dorsal de ratones inmunodeficientes ICR a una dosis de 0,2 mL por ratón (dosis alta:  $1 \times 10^6$  células/cabeza; dosis del medio:  $2 \times 10^5$  células/cabeza, dosis baja:  $4 \times 10^4$  células/cabeza). Como control, los adipocitos que expresan GFP fueron tratados de manera similar, y se implantaron en el tejido subcutáneo en las mismas condiciones que para las condiciones de dosis alta ( $1 \times 10^6$  células/cabeza).

15 [Resultados]

La Fig. 15 muestra la dependencia de la actividad de AP en sangre del número de células implantadas cuando se implantan los adipocitos que expresan AP. La actividad de AP en sangre dependiente de la dosis se observó al cambiar el número de células implantadas, y esto no fue influenciado por la duración. Más específicamente, los grupos de dosis media o baja no mostraron un pico en la etapa temprana de la implantación, que se observó en el grupo de dosis alta, y la gama de fluctuación era más estrecha. Esto demostró que el nivel de expresión *in vivo* se puede ajustar fácilmente utilizando el número de células implantadas, y que mediante el ajuste del número óptimo de células, se puede estabilizar la concentración en sangre post-implantación (nivel de expresión).

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

25 [Métodos]

Ratones diabéticos fueron producidos por la administración por vía intravenosa a ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad de 10 mg/kg de 170 mg/kg de estreptozotocina (STZ, SIGMA). Niveles de glucemia en ayunas (FBG) se midieron de forma individual a las una y dos semanas después de la administración de STZ, y se determinó que los individuos con una FBG de 300 mg/dl o más tenían diabetes. El nivel de azúcar en sangre se midió realizando un tratamiento con perclorato inmediatamente después de la recogida de sangre entera, y luego utilizando glucosa Test-II (WAKO).

Los adipocitos transfectados con MLV(VSV)/pBabeCL(s1s2B10Ins)I2G, producidos en el Ejemplo 6 se sometieron a la estimulación mediante inducción de la diferenciación utilizando el mismo método que en el Ejemplo 10, y luego suspendiendo a razón de  $5 \times 10^7$  células/mL en Matrigel al que se había añadido  $1 \mu\text{g/mL}$  de bFGF. Esta disolución de suspensión se implantó en la zona subcutánea dorsal de cada uno de los ratones diabéticos, a razón de 0,2 mL por sitio, para un total de cuatro sitios ( $4 \times 10^6$  células/cabeza). Para el grupo de control, los adipocitos no transferidos con genes se implantaron por el mismo método. La implantación se realizó 19 días después del tratamiento con STZ, y después de ello, el nivel de FBG se midió a lo largo del tiempo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante comparación con el grupo control (ensayo t no pareado).

40 [Resultados]

La Fig. 16 muestra el efecto de la implantación de adipocitos que expresan insulina s1s2B10 en ratones diabéticos inducidos con STZ. Las células no transferidas con genes se implantaron como control. El nivel de glucosa en sangre del grupo implantado con células que expresan insulina tendió a disminuir a partir del séptimo día de la implantación, y un efecto hipoglucémico significativo se indicó el día 13<sup>o</sup> y 21<sup>o</sup> de la implantación (A). Por consiguiente, el peso corporal de 20 días después de la implantación era significativamente mayor en el grupo implantado con células que expresan insulina que en el grupo de control y, por lo tanto, la pérdida de peso debido a la diabetes se ha mejorado (B). Los resultados del examen utilizando AP sugieren que este efecto hipoglucémico se mantendrá durante un largo período. Por lo tanto, el producto génico extraño producido a partir de los adipocitos primarios cultivados implantados ha demostrado ser capaz de contribuir a la modificación de la patología del receptor, indicando que este método puede ser capaz de tratar la diabetes.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención estableció métodos de transferencia *ex vivo* de un gen extraño en adipocitos primarios cultivados, adecuados para la terapia génica establecida, y estableció adipocitos primarios cultivados que mantienen de forma estable un gen extraño.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EISAI CO., LTD.

<120> ADIPOCITOS PRIMARIOS CULTIVADOS PARA LA TERAPIA GÉNICA

<130> K2989 EP/1 S3

<150> JP 2002-177648

10 <151> 18-06-2002

<150> JP 2002-237974

<151> 19-08-2002

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para amplificar el gen de insulina humano

<400> 1

cataagctta ccatggccct gtggatgcgc

30

<210> 2

<211> 30

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

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

<400> 2

30 cattctagac tagttgcagt agttctccag

30

<210> 3

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la mutagénesis

<400> 3

cttctacaca cccaggacca agcgggaggc agaggac

37

<210> 4

# ES 2 559 430 T3

	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la mutagénesis		
	<400> 4		
	ccctggaggg atcccggcag aagcgtgg		28
	<210> 5		
	<211> 29		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la mutagénesis		
	<400> 5		
15	cacctgtgcg gatccgacct ggtggaagc		29
	<210> 6		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para construir una gen que codifica una GLP-1 humana secretora		
	<400> 6		
	ttccaccatg ctgctgctgc tgctgctgct gggcctgagg ctacagctct ccctgggcca		60
	tgctgaaggg acctttacca gtg		83
25	<210> 7		
	<211> 95		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para construir una gen que codifica una GLP-1 humana secretora		
	<400> 7		
	aattatcctc ggcctttcac cagccaagca atgaactcct tggcagcttg gccttccaaa		60
	taagaactta catcactggt aaaggtccct tcagc		95
	<210> 8		
35	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la PCR		
40	<400> 8		
	ttccaccatg ctgctgctgc		20

ES 2 559 430 T3

<210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la PCR

<400> 9  
 aattatcctc ggcctttcac cag 23

10 <210> 10  
 <211> 144  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> un gen que codifica una GLP-1 humana secretora

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).....(144)  
 <223>

20 <400> 10

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

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

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

25 <210> 11  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> una GLP-1 humana secretora

<400> 11  
 Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu  
 20 25 30  
 Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
 35 40 45

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un pre-adipocito primario cultivado, en donde el pre-adipocito mantiene de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada en el exterior de la célula, y en donde el gen ha sido insertado en un vector retroviral y ha sido transferido a la célula por el vector retroviral, en donde la proteína es lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT).
2. Un pre-adipocito primario cultivado, en donde el pre-adipocito mantiene de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada en el exterior de la célula, y en donde el gen ha sido insertado en un vector retroviral y ha sido transferido a la célula por el vector retroviral, para uso en la terapia génica, en donde la proteína es LCAT.
- 10 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, o el pre-adipocito para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el pre-adipocito tiene la capacidad de expresar de forma significativa la proteína *in vivo* durante al menos 20 días.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 3, o el pre-adipocito para uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en donde el pre-adipocito se utiliza para liberar la proteína en el flujo sanguíneo.
- 15 5. Un método *in vitro* de producir un pre-adipocito para uso en la terapia génica, en el que el método comprende las etapas de:  
(1) cultivar de forma primaria un pre-adipocito; y  
(2) transferir y luego mantener de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada fuera de la célula,  
20 en donde la proteína es LCAT.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el gen extraño es transferido por un vector retroviral.
7. El pre-adipocito para uso de acuerdo con la reivindicación 2, que ha sido producido por el método de la reivindicación 5 ó 6.
- 25 8. Una composición de implante, en donde la composición comprende un pre-adipocito primario cultivado que mantiene de forma estable un gen extraño que codifica una proteína que es secretada en el exterior de la célula, y en donde el gen ha sido insertado en un vector retroviral y ha sido transferido a la célula por el vector retroviral, y un soporte farmacéuticamente aceptable, para uso en la terapia génica, en donde la proteína es LCAT.
9. La composición de implante para uso de acuerdo con la reivindicación 8, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, que comprende, además, un componente de matriz extracelular.
- 30 10. La composición de implante para uso de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 9, que comprende, además, un factor de angiogénesis.
11. Un animal no humano, en cuyo cuerpo ha sido implantado el pre-adipocito primario cultivado de la reivindicación 2.

FIG. 1

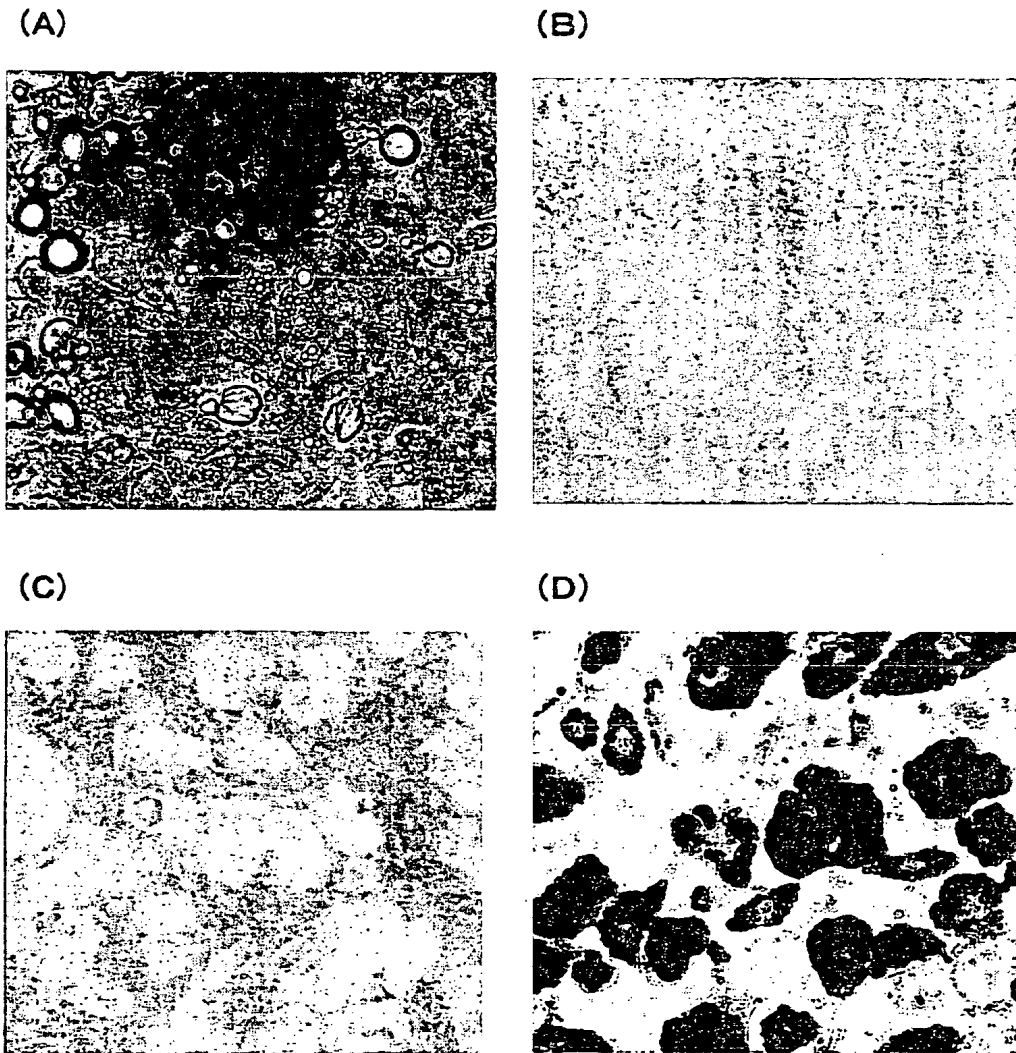




FIG. 2

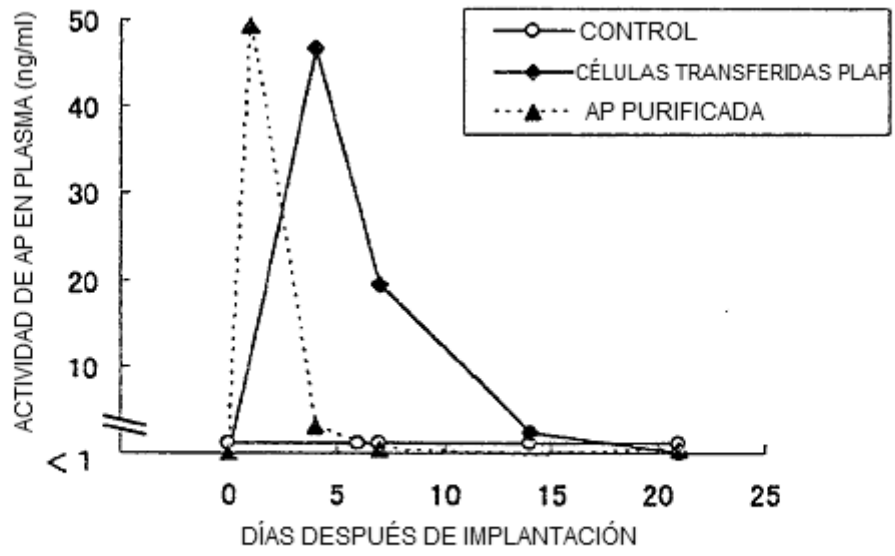


FIG. 3

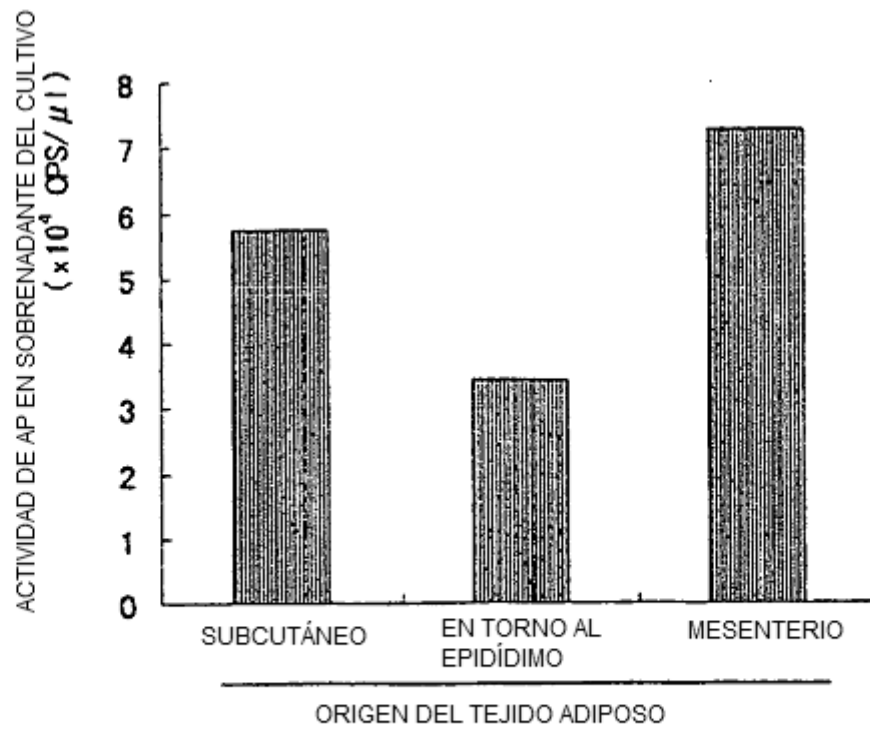
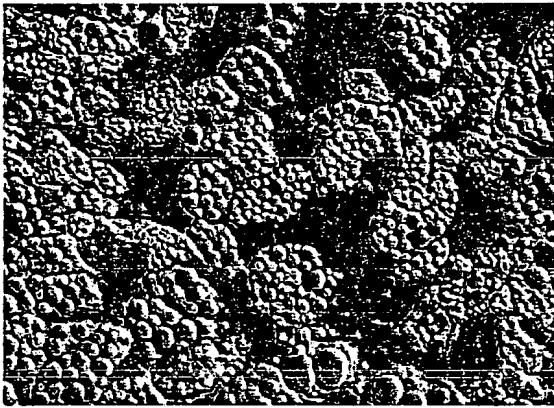


FIG. 4

(A)



(B)

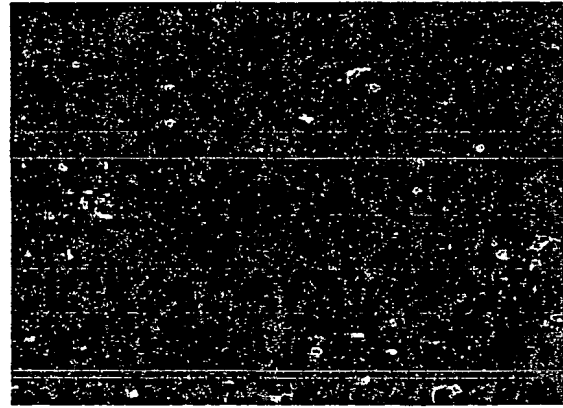


FIG. 5

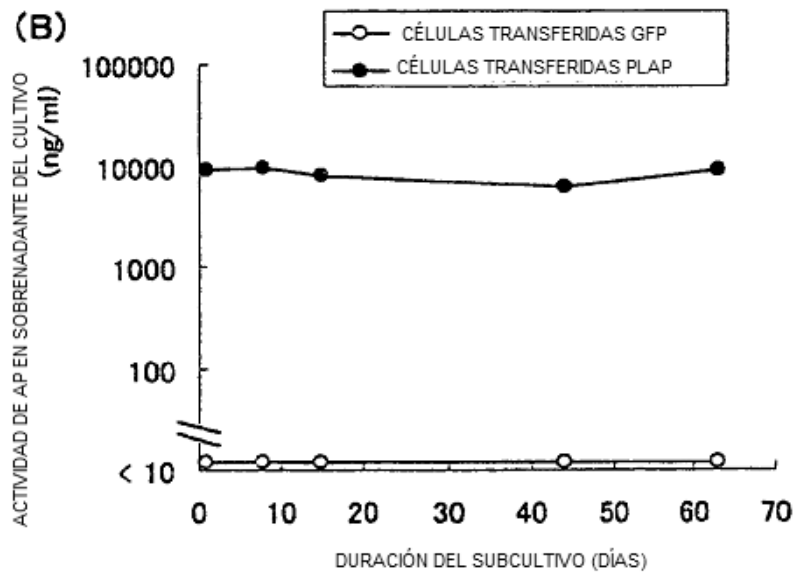
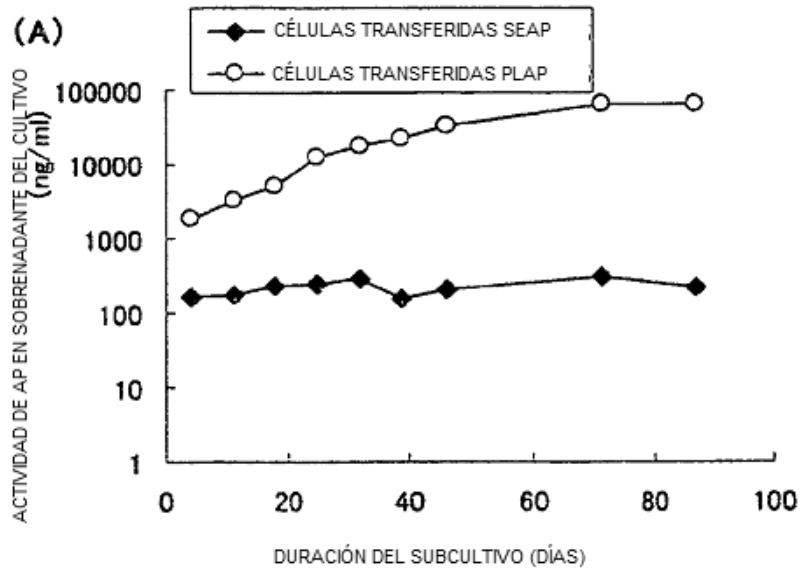


FIG. 6

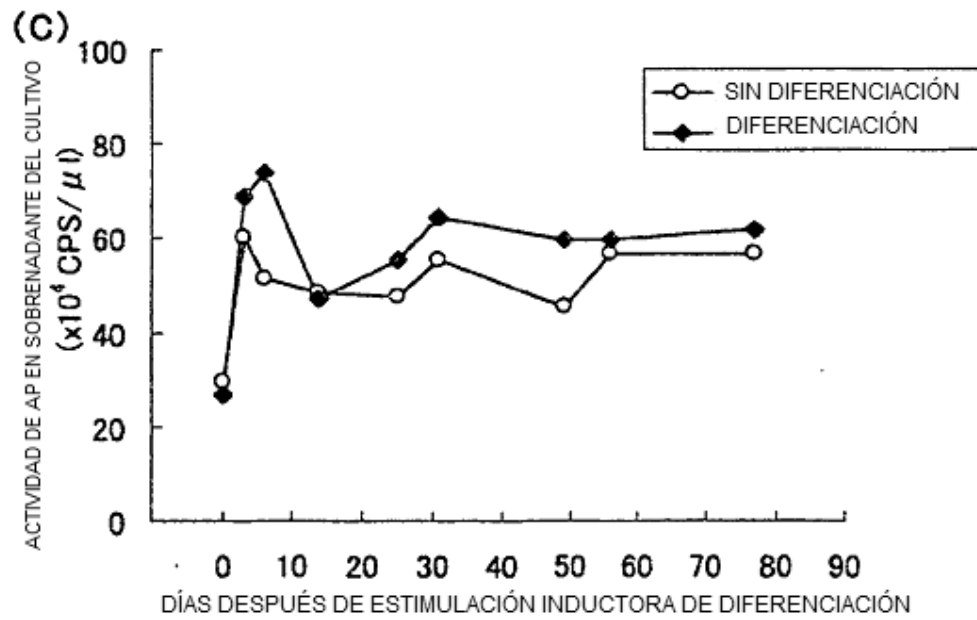
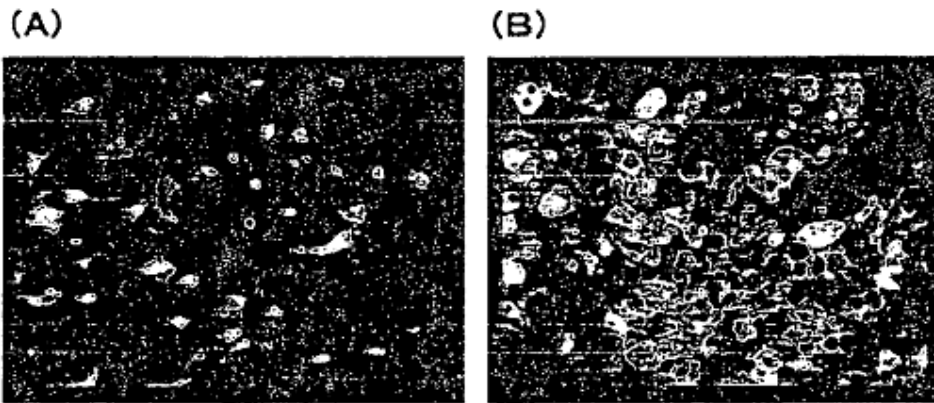


FIG. 7

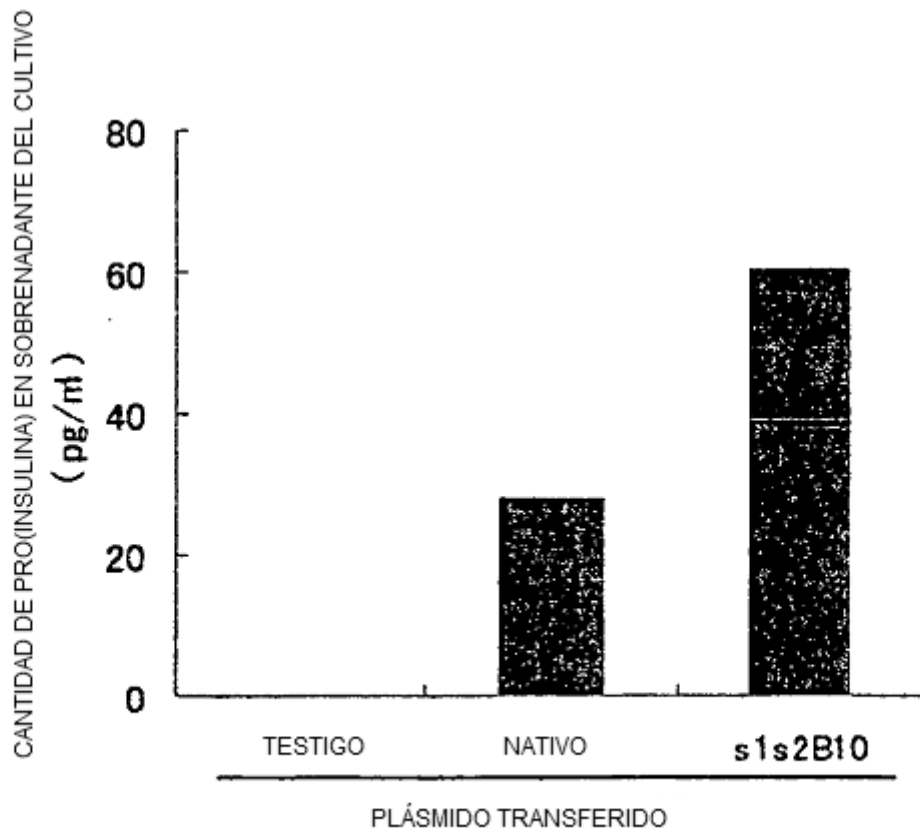


FIG. 8

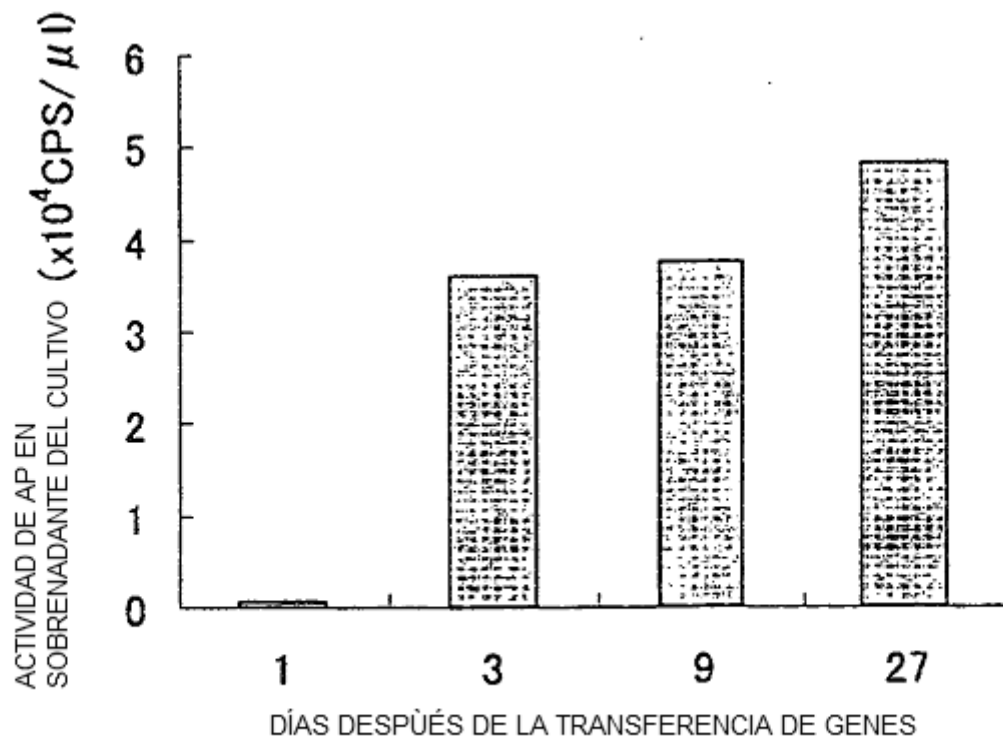


FIG. 9

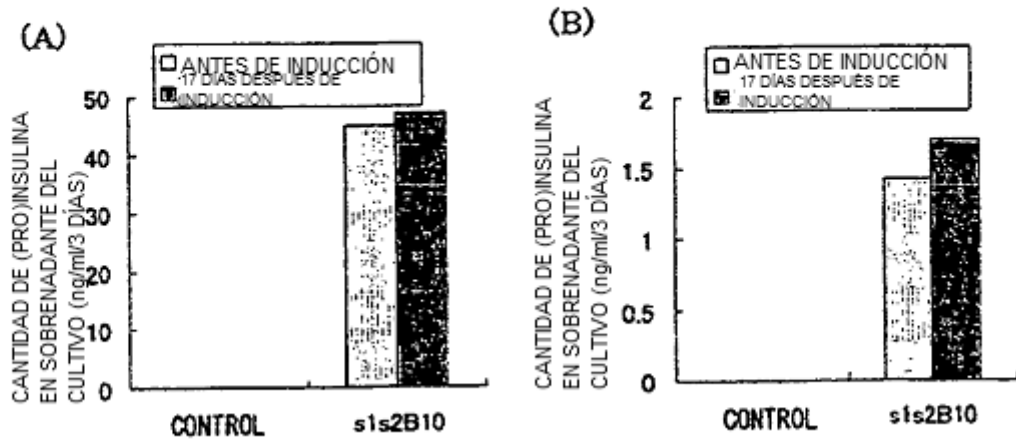




FIG. 10

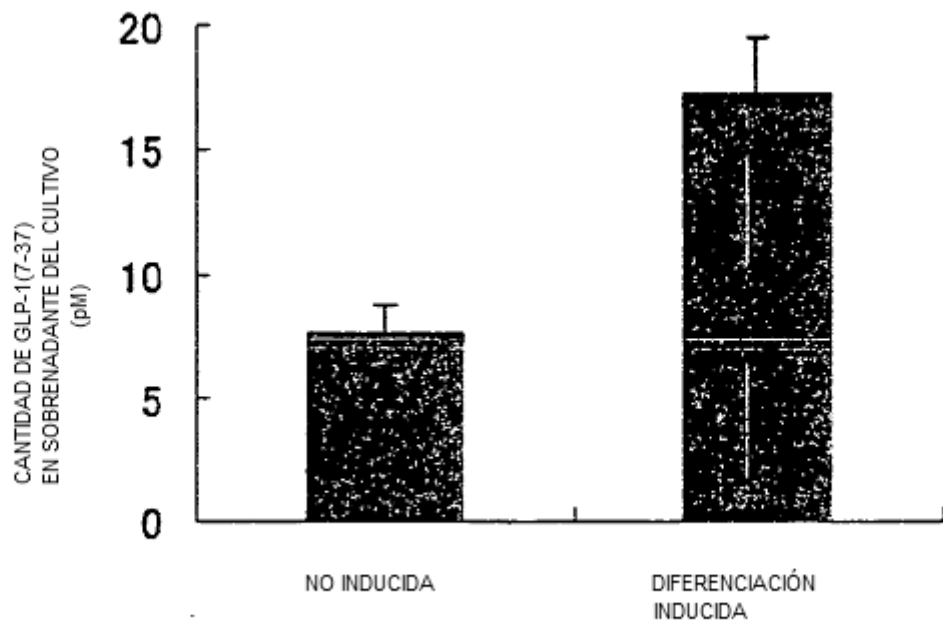


FIG. 11

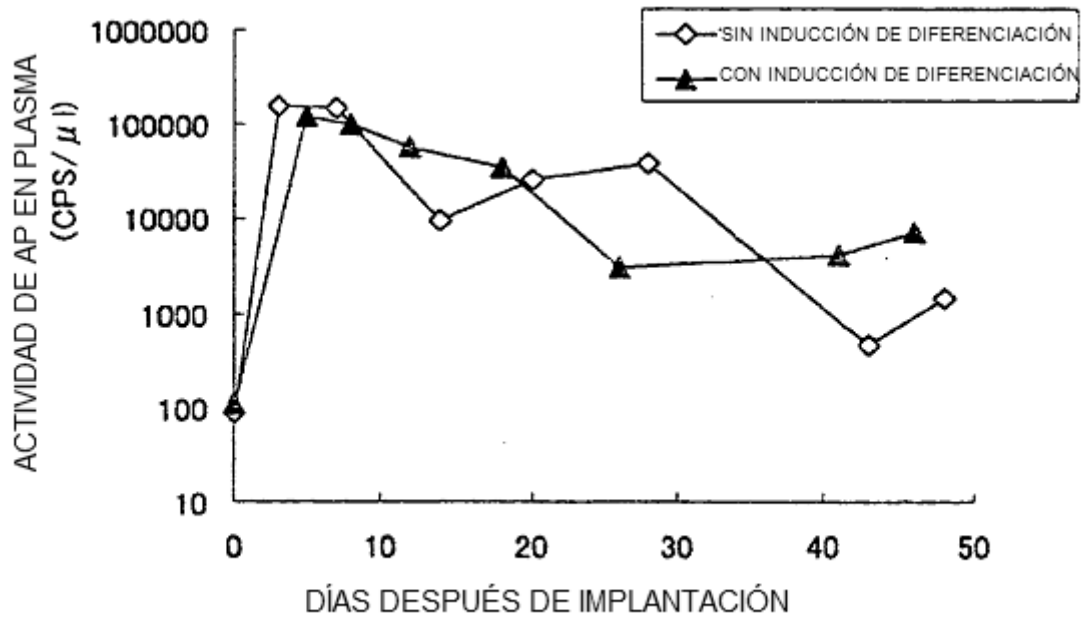
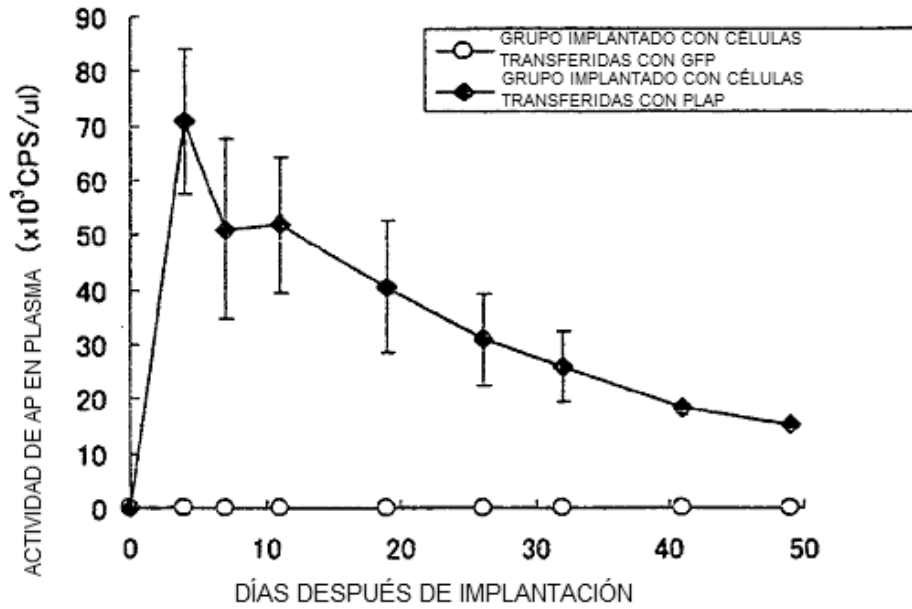
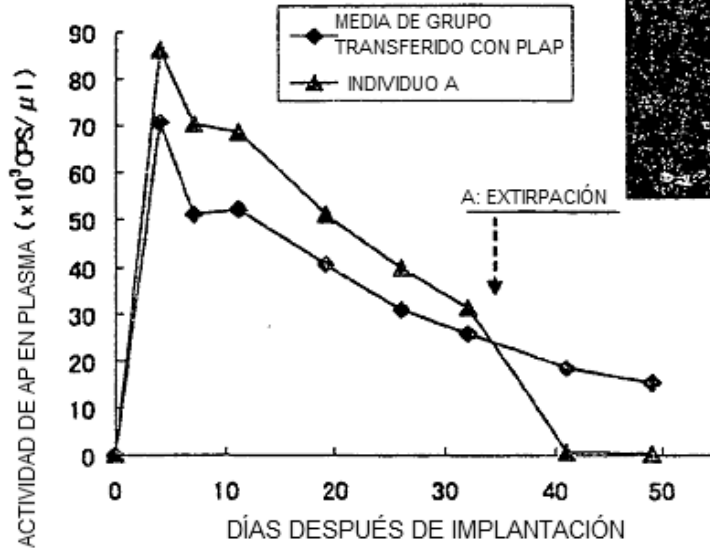


FIG. 12

(A)



(B)



(C)



FIG. 13

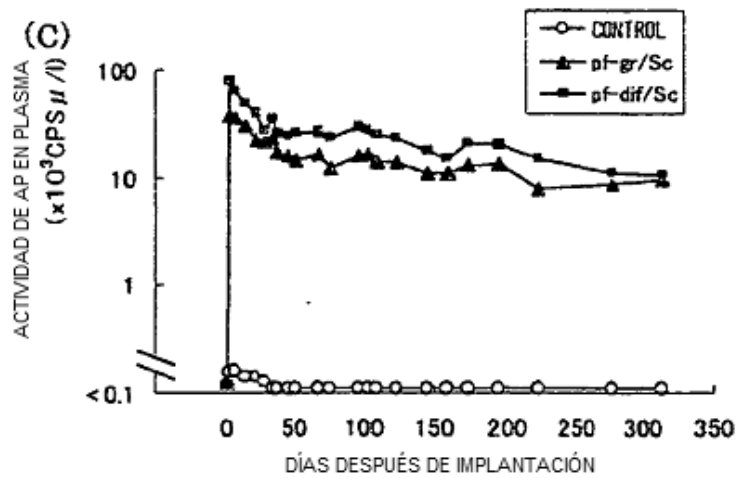
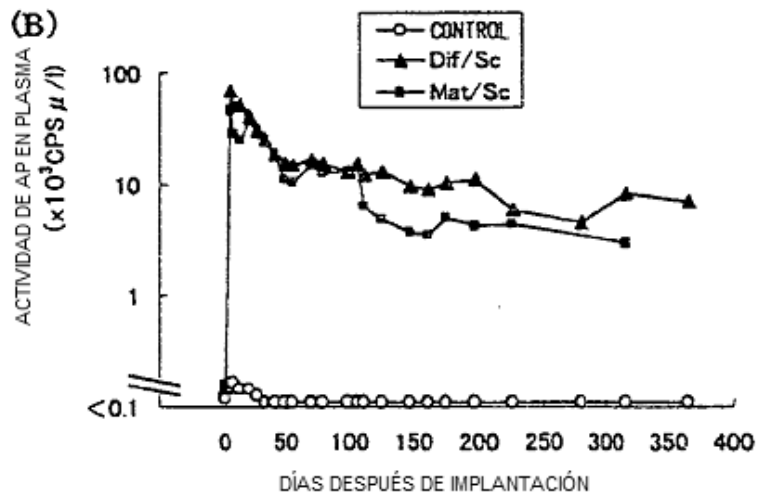
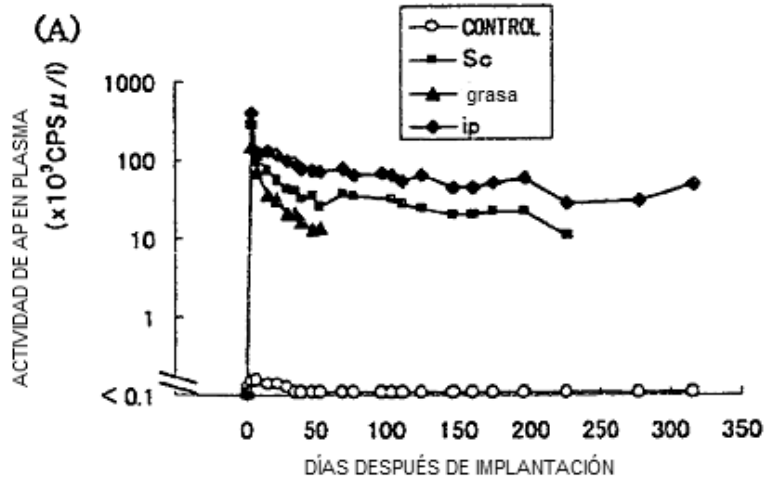


FIG. 14

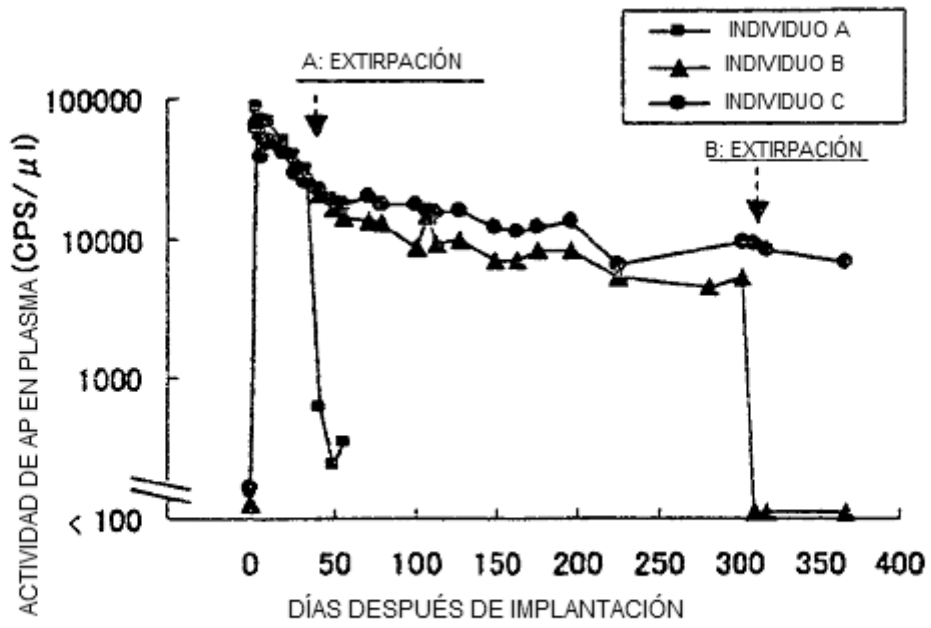


FIG. 15

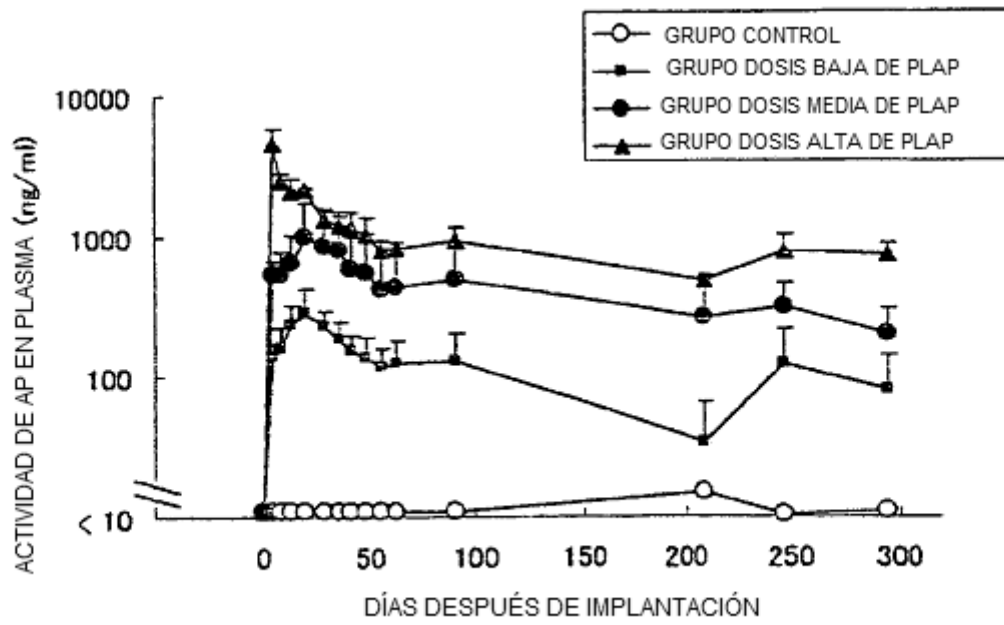


FIG. 16

