

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 021**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)
A61K 38/45	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2010 PCT/CN2010/070038**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10078842**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2010 E 10729101 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2388317**

54 Título: **Un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, y usos del mismo en el tratamiento o la prevención de una enfermedad**

30 Prioridad:

07.01.2009 CN 200910000087

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

09.01.2018

73 Titular/es:

**YIYUAN (SHENZHEN) BIOTECH LIMITED (100.0%)
RM 202, Building A1, 140 Jinye Blvd, Kuiyong
Subdistrict, Dapeng District, SHENZHEN
GUANGDONG PROVINCE 518000, CN**

72 Inventor/es:

HUANG, HAIDONG

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 649 021 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

Un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, y usos del mismo en el tratamiento o la prevención de una enfermedad

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, un vector recombinante que porta el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, un huésped que comprende el vector recombinante, una composición farmacéutica que comprende uno o más seleccionados entre el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, el vector recombinante y el huésped, uso del gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, el vector recombinante y el huésped en la fabricación de un medicamento para controlar la glucemia o un medicamento para prevenir y tratar alteraciones del metabolismo de carbohidratos, uso del gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, el vector recombinante y el huésped en la fabricación de un medicamento para prevenir y tratar diabetes mellitus, un procedimiento para controlar la glucemia o prevenir y tratar alteraciones del metabolismo de carbohidratos mediante el uso de estos, y un procedimiento para prevenir y tratar la diabetes mellitus mediante el uso de los mismos.

TÉCNICAS ANTECEDENTES

20

[0002] La glucoquinasa (GK) es un importante miembro de la familia de hexosa quinasa, cuya actividad biológica básica es catalizar la fosforilación de glucosa. El gen que codifica glucoquinasa humana está ubicado en el brazo corto del Cromosoma 7 y comprende diez exones. La GK consiste en 465 aminoácidos, está presente específicamente en hepatocitos maduros y células beta de los islotes de Langerhans, e implicada en muchas de etapas clave en el glucometabolismo y la secreción de insulina.

25

[0003] Actualmente, se ha demostrado que la intensidad en la respuesta de secreción de insulina *in vivo* es proporcional a la tasa metabólica para glucosa en células beta de insulina. De este modo, la enzima que controla la tasa de flujo de entrada de glucosa en las células se considera un sensor de glucosa que regula la liberación de insulina, y la GK es el sensor de glucosa en células beta de los islotes de Langerhans. Cuando es transferida al interior de una célula beta a través del transportador 2, la glucosa es fosforilada bajo la acción de la glucoquinasa e introducida en la ruta glucolítica para dar ATP, cuya cantidad es proporcional a la cantidad de glucosa introducida en la célula beta; El ATP puede cerrar el canal de iones potasio en la membrana plasmática de la célula beta, causando despolarización, que, a su vez, da como resultado flujo de entrada de iones calcio y eventualmente secreción de insulina. Dado que la actividad de GK está controlada directa o indirectamente por la concentración de glucosa en sangre, la alteración de la tasa metabólica para glucosa dentro de la célula beta puede regular la secreción de insulina. Además, dado que la enzima solamente puede controlar la concentración de glucosa en sangre facilitando la síntesis de glucógeno hepático y catalizando la conversión en glucosa en glucosa-6-fosfato, la anomalía de actividad de GK desempeña un papel clave en la aparición y desarrollo de alteraciones del metabolismo de carbohidratos.

30

[0004] Se descubrió mediante algunas investigaciones que en pacientes y algunos modelos animales (por ejemplo, ratas en ayunas) que padecían diabetes mellitus de tipo 2, la actividad GK en hepatocitos de ratas con diabetes mellitus de tipo 2 inducida por una dieta rica en grasa se reduce significativamente en comparación con el control normal; se demostró además mediante otros resultados de investigación que el aumento de la actividad GK puede reducir el nivel de glucemia significativamente. Se confirmó en el presente estudio que la variación del gen GK está asociada estrechamente con la aparición de un subtipo de diabetes mellitus de tipo 2, es decir, *diabetes juvenil de aparición tardía (MODY)*, en la que la mutación del gen desempeña un papel principal en la aparición de MODY.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0005] El objetivo técnico a resolver por la presente invención es cómo proporcionar un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana a partir del cual el mutante de glucoquinasa humana se expresa con actividad GK mayor que la de tipo silvestre, de modo que se proporcionará una manera novedosa para controlar la glucemia, tratando alteraciones del metabolismo de carbohidratos, así como diabetes mellitus, particularmente diabetes mellitus de tipo 2.

40

[0006] La presente invención proporciona un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, en el

que el gen tiene:

(1) una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2; o

5 (2) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 excepto el marco abierto de lectura (ORF) que va desde la posición 487 a la 1884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y cuyo ORF codifica la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por el ORF de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

10 **[0007]** En la técnica anterior se cree, en general, que, debido a la mutación de sentido erróneo, mutación sin sentido, y mutación del marco de lectura en bases en el ORF de un gen que codifica una proteína, puede alterar la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos de un producto proteico codificado por el gen, solamente la mutación que se produce dentro de un exón del gen que codifica una proteína puede dar como resultado habitualmente cambios relativamente destacables del rendimiento del producto proteico. Actualmente, la función para un intrón del gen que codifica una proteína aún no está clara, y en términos generales, la alteración del intrón
15 puede tener apenas un efecto esencial sobre el rendimiento del producto proteico. Los inventores de la presente invención han descubierto inesperadamente que un gen de glucoquinasa humana mutante que tiene una mutación que se produce dentro de una región intrónica del gen de glucoquinasa humana de tipo silvestre puede expresar un mutante de glucoquinasa humana que muestra una actividad GK aumentada significativamente en comparación con la del tipo silvestre.

20 **[0008]** La presente descripción también proporciona un mutante de glucoquinasa humana, en el que el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana es el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención.

25 **[0009]** La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende un vector y un gen de interés portado en éste, en el que el gen de interés es el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención.

30 **[0010]** La presente invención también proporciona un huésped, en el que el huésped comprende el vector recombinante descrito en la presente invención.

[0011] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más seleccionados entre un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un vector recombinante descrito en la presente invención, y
35 un huésped descrito en la presente invención.

[0012] La presente invención también proporciona el uso de un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención en la fabricación de un medicamento para controlar la glucemia o un medicamento
40 para prevenir y tratar alteración del metabolismo de carbohidratos.

[0013] La presente invención también proporciona el uso de un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención en la fabricación de un medicamento para prevenir y tratar diabetes mellitus.
45

[0014] La presente descripción también proporciona un procedimiento de control de la glucemia o de prevención y tratamiento de alteraciones del metabolismo de carbohidratos, en el que un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un vector recombinante descrito en la
50 presente invención, y un huésped descrito en la presente invención es administrado al paciente que lo necesita.

[0015] La presente descripción también proporciona un procedimiento de prevención y tratamiento de diabetes mellitus, en el que un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un mutante de glucoquinasa humana descrito en la
55 presente invención, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención es administrado al paciente que lo necesita.

[0016] El mutante de glucoquinasa humana expresado por un gen de la presente invención muestra una actividad significativamente mayor que la del tipo silvestre, proporcionando de este modo un medio novedoso y

eficaz para controlar la glucemia o para prevenir y tratar alteraciones del metabolismo de carbohidratos, especialmente diabetes mellitus.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

[0017]

La figura 1 es la fotografía de electroforesis obtenida después del ligamiento del plásmido pIRES2-EGFP linealizado y el gen de interés (ejemplo 1).

10 La figura 2 es la curva para la relación funcional entre la unidad de insulina (μ unidad/ml) en el eje X y el recuento de ¹²⁵I en el eje Y.

La figura 3 es una representación esquemática para la estructura del vector del plásmido pIRES2-EGFP.

La figura 4 es la fotografía de electroforesis para la identificación de células min6 transfectadas con éxito con el vector plasmídico recombinante.

15 La figura 5 es la fotografía microscópica para células min6 transfectadas con éxito con el vector plasmídico recombinante.

La figura 6 es la fotografía de electroforesis para la identificación del plásmido lanzadera circular recombinante pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP o el plásmido lanzadera circular recombinante pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP.

20 La figura 7 es la fotografía de electroforesis para la identificación del adenovirus recombinante pAd-GFP-G261 o el adenovirus recombinante pAd-GFP-G262.

REALIZACIONES DETALLADAS

25 **[0018]** La presente invención proporciona un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana, en el que el gen tiene:

(1) una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2; o

30 (2) una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 excepto el marco abierto de lectura (ORF) que va de la posición 487 a 1884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y cuyo ORF codifica la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por el ORF de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

35 **[0019]** Preferentemente, el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. Un gen que codifica la glucoquinasa humana puede aislarse de leucocitos de un cuerpo humano sano, que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias, es decir, el gen de tipo silvestre que codifica la glucoquinasa humana (número de entrada al GenBank BC001890, M88011, NM033508 y NM033507). La secuencia de nucleótidos del gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana de acuerdo con la presente invención tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 tiene una
40 delección de una base C en la posición 2643 en comparación con la del gen de tipo silvestre.

[0020] Debe entenderse que un experto en la materia puede sintetizar una secuencia de nucleótidos diferente de la SEQ ID NO: 2 mientras que codifica el mutante de glucoquinasa humana de la presente invención, de acuerdo con la degeneración de codones y el sesgo de uso de codones en diferentes especies. Es decir, es una secuencia
45 de nucleótidos que es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 excepto el marco abierto de lectura que va de la posición 487 a 1884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y cuyo ORF codifica la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por el ORF de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

50 **[0021]** La presente descripción también proporciona un mutante de glucoquinasa humana, en el que el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana es el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención.

[0022] Es bien conocido en la técnica que entre 20 clases de los diferentes aminoácidos que constituyen una
55 proteína, todas las demás 18 clases de los diferentes aminoácidos son codificadas individualmente por 2-6 de los codones, excepto Met (ATG) o Trp (TGG) que son codificados individualmente por un único codón (Véase, Apéndice D en Sambrook y col, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pág. 950). En otras palabras, dado que el codón que codifica un aminoácido es más de uno en la mayoría de los casos debido a la degeneración del codón genético y la sustitución del tercer nucleótido en un codón de triplete a

menudo da como resultado ningún cambio en la composición de aminoácidos, las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas con una secuencia de aminoácidos idéntica pueden ser diferentes. De acuerdo con la tabla de codones bien conocida, el experto en la materia ha adquirido las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente desde la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 descrita de acuerdo con la invención, mediante procesos biológicos (por ejemplo, enfoques basados en PCR, procedimientos de mutación puntual) o síntesis química, y las usó en técnicas recombinantes y terapias génicas, de este modo esta porción de las secuencias de nucleótidos deben estar incluidas todas dentro del alcance de la presente invención. Además, las secuencias de ADN descritas en el presente documento también pueden utilizarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, procedimientos descritos por Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), a través de la modificación de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la presente invención.

[0023] La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende un vector y un gen de interés portado en éste, en el que el gen de interés es un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención.

[0024] Los genes de interés también pueden incluir una secuencia reguladora, por ejemplo, un promotor, terminador y potenciador para la expresión de uno o más de los genes de interés. El gen de interés también puede incluir un gen marcador (por ejemplo, genes que codifican la β -galactosidasa, la proteína verde fluorescente u otras proteínas fluorescentes) o un gen cuyo producto regula la expresión de otros genes. Además de ser un ADN, el gen de interés también puede ser ARNm, ARNt o ARNr, y también puede incluir la secuencia reguladora de la transcripción relevante habitualmente asociada con la transcripción de la secuencia, tal como, por ejemplo, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de poliadenilación y un elemento potenciador cadena abajo.

[0025] El vector puede ser diversos vectores capaces de portar el gen de interés que se usan habitualmente en la técnica y diversos vectores capaces de portar el gen de interés que están disponibles y mejorados por el desarrollo tecnológico. Por ejemplo, el vector es plásmidos (ADN desnudo), liposomas, conjugados moleculares, polímeros y virus.

[0026] El plásmido (ADN desnudo) puede portar un gen de interés, y el plásmido que porta el gen de interés puede inyectarse directamente o introducirse a través de técnicas de pistola génica, electroporación y electrofusión en células en un tejido. Además, la onda ultrasónica facilita el aumento de la eficiencia de transferencia para el plásmido. La onda ultrasónica en combinación con agente de contraste ultrasónico de microburbujas puede aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática, aumentando de este modo significativamente la eficiencia de transferencia y de expresión para el ADN desnudo. Dado que esta técnica para la permeación de la membrana plasmática puede fabricar transitoriamente poros en la superficie de la membrana plasmática, el ADN tiene una probabilidad de ser introducido en la célula.

[0027] El liposoma es una gotita que consiste en laminillas bimoleculares lipídicas y pueden mediar en la entrada del gen de interés a través de la membrana plasmática. El lípido puede ser fosfolípidos naturales que predominan en lecitina (fosfatidilcolina, PC) y derivados de yema de huevo y soja; también pueden fosfolípidos sintéticos, tal como dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), y así sucesivamente; y también pueden comprender colesterol. El liposoma preferido es un liposoma catiónico, que resulta principalmente de mezclar los lípidos cargados positivamente y los lípidos neutros auxiliares a equivalentes molares. Un complejo puede formarse eficazmente entre el liposoma cargado positivamente y el ADN cargado negativamente, y transferirse a las células a través de endocitosis.

[0028] El polímero es un complejo estable de polímero/ADN formado mediante neutralización eléctrica debido a la unión de las cargas positivas en un polímero catiónico (por ejemplo, poli-L-lisina) a las cargas negativas en el ADN. El complejo resultante del polímero catiónico y el ADN aún está cargado con cargas positivas, puede unirse al receptor cargado negativamente en la superficie de la célula, y a continuación introducirse en la célula.

[0029] El conjugado molecular es la entidad en la que un gen de interés de ADN exógeno está unido covalentemente sobre un ligando, un anticuerpo monoclonal, o una proteína de la envuelta viral contra un receptor específico en la superficie celular y el gen exógeno se introduce en un tipo particular de la célula mediante la propiedad de unión específica.

[0030] Dado que un virus habitualmente puede entrar en un tipo de célula particular con alta eficiencia, expresar sus propias proteínas y generar viriones nacientes, por lo tanto, el virus modificado sirve en primer lugar

como un vector para terapia génica. Por ejemplo, se puede hacer referencia al vector de retrovirus, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector de virus del herpes simplex, etc. Entre ellos, el virus adenoasociado pertenece al miembro no patógeno de la familia Parvoviridae, que puede proliferar exclusivamente dependiendo de un virus auxiliar. El virus adenoasociado tiene un genoma muy pequeño. Por ejemplo, el virus adenoasociado de tipo 2 tiene un genoma de ADN monocatenario que consiste en 4681 nucleótidos, que comprenden dos genes, es decir, el gen rep (que codifica proteínas responsables de regular la replicación viral, la expresión de genes estructurales y la integración en el genoma del huésped) y el gen cap (que codifica la proteína estructural de la cápsida), con una repetición terminal de 145 pb presente en un extremo del genoma. El virus adenoasociado puede infectar células en la fase de división y en la fase estacionaria, insertarse en el cromosoma de la célula huésped o expresarse de forma estable a largo plazo en forma de ADN concatémico extracromosómico. Puede transformar eficazmente los tipos celulares del cerebro, el músculo esquelético, el hígado, etc., y posee características tales como antigenicidad, baja toxicidad, ausencia de patogenicidad, etc.

[0031] Preferentemente, el vector se selecciona entre el grupo que consiste en el vector de clonación, el vector de expresión eucariota, el vector de expresión procariota y el vector lanzadera (por ejemplo, el plásmido lanzadera pShuttle2) para implementar la amplificación y la expresión del gen de interés. Cuando se usa en terapia génica, un vector de expresión inducible se usa preferentemente, por ejemplo, pIRES2-EGFP. Más preferentemente, el vector se selecciona entre el grupo que consiste en pIRES2-EGFP, pCMVp-NEO, BAN, pEGFT-Actin y un vector de adenovirus. El vector más preferido es el vector de adenovirus. El adenovirus es un virus sin envuelta con un genoma de ADN bicatenario lineal, existe muy extendido en la naturaleza, y se clasifica en al menos más de 100 serotipos. El genoma de adenovirus tiene aproximadamente 36 kb de longitud y tiene una repetición terminal inversa respectivamente en uno de ambos extremos con una señal de empaquetamiento del virus siendo interna. Hay cuatro unidades de transcripción temprana (E1, E2, E3 y E4) responsables de la regulación y una unidad de transcripción tardía responsable de codificar proteínas estructurales virales en el genoma de adenovirus. Como un vector para terapia génica, el vector de adenovirus presenta las siguientes ventajas: 1) una capacidad de empaquetamiento relativamente grande para un gen exógeno, siendo de este modo posible insertar un gran fragmento del gen exógeno, de hasta 35 kb de longitud; 2) tiene eficiencia de infección elevada, siendo de este modo posible transducir de forma eficiente diversos tipos celulares en tejidos humanos con una eficiencia de transducción experimental *in vitro* de aproximadamente el 100%; 3) puede transducir las células que no se dividen; 4) proporciona el virus recombinante con valores cuantitativos elevados en cultivo celular; 5) entra en una célula huésped sin integración en el genoma de la célula huésped y solamente se expresa de forma transitoria, mostrando de este modo una seguridad relativamente alta. Actualmente, la versión más nueva del vector de adenovirus tiene todos (un vector no viral) o la mayoría de los genes de adenovirus (un vector de mini-adenovirus) deletados, y solamente las repeticiones terminales inversas y la secuencia de señal de empaquetamiento retenidas, así que un gen de hasta 35 kb de longitud puede insertarse en el vector, una respuesta inmunitaria celular más débil es desencadenada por el vector, una región de fijación a la matriz nuclear introducida en el vector puede permitir que el gen exógeno se exprese durante largo tiempo y aumentar la estabilidad del vector.

[0032] La presente invención también proporciona un huésped, en el que el huésped comprende un vector recombinante descrito en la presente invención. Por un lado, la transformación de un huésped con el vector recombinante que comprende el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana de la presente invención puede usarse para investigar la relación entre el mutante de glucoquinasa humana y el glucometabolismo, así como la secreción de insulina, por otro lado, puede usarse para preparar el mutante de glucoquinasa activo. Se prefiere que el huésped se seleccione entre uno o más de *E. coli*, células 239, células min-6, y células beta de los islotes de Langerhans humanas. Entre estos, el *E. coli* como una cepa de ingeniería genética puede tanto comprender el vector de clonación recombinante de la presente invención para implementar la amplificación del gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana de la presente invención como comprender el vector de expresión recombinante de la presente invención para implementar la expresión del mutante de glucoquinasa humana de la presente invención en una gran cantidad. Cuando el vector recombinante es un vector de adenovirus recombinante, el vector puede amplificarse en células 239. La célula min-6 es una cepa de células beta de los islotes de ratón con una capacidad relativamente potente para secretar insulina, y puede actuar como el huésped para el vector de expresión eucariota de la presente invención para producir el mutante de glucoquinasa humana de la presente invención y ensayar la actividad GK del mismo. La célula beta de los islotes de Langerhans humana puede ser una línea celular disponible en el mercado y también ser células beta de los islotes de Langerhans humanas de sujetos, por ejemplo, de pacientes con diabetes mellitus. Durante el transcurso de la terapia génica, se prefiere que las células beta de los islotes de Langerhans humanas de un sujeto en sí, se trasplantan en el sujeto después de transducirlas con un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana de la presente invención, para evitar el rechazo inmunológico posterior.

[0033] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más seleccionados entre un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente descripción, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención.

[0034] El excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a cargas sólidas, semisólidas o líquidas no tóxicas, diluyentes, materiales de recubrimiento u otros agentes auxiliares para formulaciones, por ejemplo, que incluyen, aunque sin limitarse a, solución salina, solución salina tamponada, glucosa, agua, glicerol, etanol y mezclas de los mismos. La composición farmacéutica es adecuada para administración parenteral, sublingual, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intrarrectal, intrabucal o transepidermica.

[0035] La administración parenteral incluye inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratorácica, subcutánea e intraarticular. La línea farmacéutica adecuada para administración parenteral incluye soluciones dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas, y polvos formulados en una solución o dispersión estéril inyectable inmediatamente antes del uso. Vehículos, diluyentes, disolventes o excipientes acuosos o no acuosos apropiados incluyen agua, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, carboximetilcelulosa, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Estas composiciones también pueden comprender conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, protectores y adyuvantes de dispersión, por ejemplo, inositol, sorbitol y sacarosa. Se prefiere agregar reguladores osmóticos tales como carbohidratos, cloruro sódico y cloruro potásico.

[0036] La administración transepidermica incluye la administración en la piel, la mucosa y la superficie del pulmón y el ojo. Dicha composición farmacéutica incluye pulverizados, pomadas, gotas, parches transdérmicos, dispositivos de lontóforos, inhaladores, etc. La composición para administración intrarrectal o intravaginal es preferentemente un supositorio, que puede prepararse mezclando el vector recombinante de la presente invención con excipientes no estimulantes apropiados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o base de cera para supositorios, en el que el excipiente o vehículo permanece sólido a temperatura ambiente y se vuelve líquido a la temperatura corporal, fundiéndose en el recto o la vagina y liberando el compuesto activo.

[0037] Preferentemente, la composición farmacéutica es una inyección que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más seleccionados entre un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención y un vector recombinantes descrito en la presente invención.

[0038] Dicho excipiente farmacéuticamente aceptable es un tampón fosfato con un valor de pH de 4,0-9,0; y 10^2 - 10^{10} copias del gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana o 10^2 - 10^{10} copias del vector recombinante están comprendidas en un mililitro de la inyección.

[0039] La inyección comprende además un protector y/o un regulador osmótico; el contenido del protector es del 0,01-30% en peso tomando como base la inyección, el protector es uno o más seleccionado entre inositol, sorbitol y sacarosa; el contenido del regulador osmótico permite que la presión osmótica de la inyección sea de 200-700 mOsm/kg con el regulador osmótico siendo cloruro sódico y/o cloruro potásico.

[0040] Cuando la inyección se usó en la administración, al sujeto se le administró la inyección que contenía 10^2 - 10^{10} copias, preferentemente 10^5 - 10^8 copias, y más preferentemente 10^6 - 10^8 copias del gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana; o que contiene 10^2 - 10^{10} copias, preferentemente 10^5 - 10^{10} copias y más preferentemente 10^8 - 10^{10} copias del vector recombinante; se prefiere además que el vector recombinante es un vector de adenovirus recombinante que se administra en la cantidad que varía entre 10^3 - 10^{10} unidades formadoras de placas (ufp), preferentemente 10^5 - 10^{10} ufp, y más preferentemente 10^6 - 10^{10} ufp. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se inyecta, la dosis de inyección puede ser la usada habitualmente en la técnica, como máximo 500 μ l, típicamente 1-200 μ l, preferentemente 1-10 μ l; sin embargo, también puede usarse una dosis de hasta 10 ml dependiendo del sitio de inyección. Dado que un experto en la materia es capaz de determinar fácilmente la vía de administración y las dosis óptimas, las vías de administración y dosis anteriores son para referencia solamente. La dosis puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente la edad, el peso corporal del paciente a tratar, la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección, así como la vía de administración. La inyección de la composición farmacéutica descrita en la presente invención también puede administrarse sistemáticamente, y la inyección de la composición farmacéutica de la presente invención también puede inyectarse en un sitio local (por ejemplo, en el músculo esquelético).

[0041] La presente descripción también proporciona el uso de un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente descripción, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención en la fabricación de un medicamento para controlar la glucemia o un medicamento para prevenir y tratar alteración del metabolismo de carbohidratos.

[0042] La presente invención también proporciona el uso de un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención en la fabricación de un medicamento para prevenir y tratar diabetes mellitus.

[0043] En el presente documento se describe un procedimiento de control de la glucemia o de prevención y tratamiento de alteraciones del metabolismo de carbohidratos, en el que un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente descripción, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención es administrado al paciente que lo necesita.

[0044] La presente descripción también proporciona un procedimiento de prevención y tratamiento de diabetes mellitus, en el que un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un mutante de glucoquinasa humana descrito en la presente invención, un vector recombinante descrito en la presente invención, y un huésped descrito en la presente invención es administrado al paciente que lo necesita.

Ejemplo 1: síntesis química de un gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana (G262) de la presente invención

[0045] El gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana con la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, tiene una longitud completa de 2748 pb. Después del análisis de secuencia, se demostró que hay tres sitios de restricción únicos, *HindIII*, *SacI* y *BamHI*, que están ubicados en las posiciones 2443, 1327 y 2250 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente. La estrategia de síntesis fue la siguiente: síntesis de los fragmentos de ADN parciales que usan respectivamente el enfoque de triéster de fosforamidita en fase sólida, ligamiento de los fragmentos sintetizados, secuenciación y verificación del gen ligado, y corrección del ligamiento erróneo, en el que las etapas detalladas fueron las siguientes:

1. Se sintetizó un fragmento A con un total de 1360 pb que va desde el extremo 5' hasta el sitio de restricción de *SacI* del gen;
2. Los resultados de la secuenciación e identificación indicaron que todo el fragmento A se obtuvo a partir de la etapa 1, todo el fragmento se sometió a modificación terminal y a continuación se ligó entre los sitios *HindIII/SacI* del vector PCR2. I (Invitrogen, Co.);
3. Se sintetizó un fragmento B con un total de 939 pb que va desde el sitio de restricción de *SacI* hasta el sitio de restricción de *BamHI* del gen;
4. Los resultados de la secuenciación e identificación indicaron que todo el fragmento B se obtuvo a partir de la etapa 3, todo el fragmento se sometió a modificación terminal y a continuación se ligó entre los sitios *BamHI/SacI* del vector PCR2. I;
5. Se sintetizó un fragmento C con un total de 551 pb que va desde el sitio de restricción de *BamHI* hasta el extremo 3' del gen;
6. Los resultados de la secuenciación e identificación indicaron que todo el fragmento C se obtuvo a partir de la etapa 5, todo el fragmento se ligó en el vector que comprende el fragmento B, dando como resultado un fragmento D de un total de 1457 pb.
7. Los resultados de la secuenciación e identificación indicaron que todo el fragmento D se obtuvo a partir de la etapa 6. Los fragmentos A y D a ligar se digirieron con la enzima de restricción *SacI* para producir fragmentos de ADN con un extremo cohesivo, se llevó a cabo una reacción de ligamiento de ADN en la que estaba implicada la ADN polimerasa T4. El gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana con la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, se obtuvo eventualmente. Todas las enzimas y tampones usados se adquirieron de Clontech, Co., y se realizaron digestión de restricción y ligamiento de acuerdo con el protocolo proporcionado por Clontech, Co.

[0046] Dado que había algunas secuencias protectoras en todos los extremos de los fragmentos sintetizados para facilitar la modificación terminal de los fragmentos después de sintetizarlos, de este modo la longitud de la secuencia sintetizada era un poco más larga que la longitud real. La secuencia protectora se refiere a una secuencia

5 protectora de 8 a 20 bases que se añade artificialmente a cualquier lado de un sitio de restricción terminal presente en el extremo de un ADN con el fin de eliminar la incapacidad de una enzima de restricción para unirse normalmente a y escindir el ADN en el sitio de restricción en presencia del impedimento estérico, siendo la secuencia de bases protectora de Clontech Co., el fabricante de enzimas de restricción. Puesto que las cadenas de ADN serían degradadas en primer lugar desde su extremo, la presencia de las bases protectoras puede proteger al sitio de restricción de resultar dañado durante la manipulación. La modificación se refiere a un proceso en el que el fragmento de ADN es digerido enzimáticamente con una enzima de restricción para retirar las bases protectoras. La enzima de restricción y la ligasa T4 utilizadas, así como los tampones de reacción y sistemas experimentales utilizados fueron todos de Clontech Co, lo que proporcionaba la introducción de los productos correspondientes y los protocolos de funcionamiento estándar de los mismos.

15 **[0047]** La secuencia génica ligada correctamente en la etapa 7 se amplificó por PCR, y el resultado de secuenciación del gen fue consistente con la SEQ ID NO: 2. El gen resultante se almacenó a -20°C para ligamiento en un vector de expresión.

15 **Ejemplo comparativo 1: preparación de un gen que codifica glucoquinasa de tipo silvestre humana (G261)**

20 **[0048]** El gen que codifica glucoquinasa de tipo silvestre humana se preparó de acuerdo con la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 con referencia al protocolo en el ejemplo 1.

20 Ejemplo 2: Construcción de un vector de expresión

1-1) linealización del vector del plásmido pIRES2-EGFP

25 **[0049]** El plásmido pIRES2-EGFP es una estructura circular (véase, en la figura 3) y es necesario linealizarlo antes de transfectarlo en células. La enzima de restricción *Bst*BI (TTCGAA) (New England Biolabs, NEB Co.) se seleccionó, puesto que la enzima tiene una restricción única en el plásmido y, por lo tanto, la digestión por restricción no tiene ningún efecto sobre la expresión de la proteína. El IRSE significa que un sitio de entrada al ribosoma interno caracterizado porque, cuando el IRSE está presente después de un ORF, se permite que otra secuencia codificante después del IRSE sea traducida después de que la traducción del ORF hubiera terminado. De este modo, los dos genes que codifican una proteína individualmente que tienen un ORF independiente se expresaron como una proteína de fusión.

ADN del plásmido pIRES2-EGFP DNA	10 µg
Tampón de digestión por restricción	5 µl
Enzima de restricción	10 Unidades
Agua desionizada	hasta llevar el sistema a 50 µl

35 se incubaron a 37°C durante 3 horas, se sometieron a extracción con fenol/cloroformo para dar el ADN total, se precipitaron mediante etanol anhidro para dar un sedimento de ADN. El sedimento de ADN se lavó con etanol al 70% y se disolvió de nuevo en agua desionizada. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% para detectar el peso molecular del plásmido y purificar el vector del plásmido pIRES2-EGFP linealizado. El plásmido purificado se almacenó a -20°C hasta que se usó.

40 1-2) Ligamiento del plásmido pIRES2-EGFP linealizado y el gen de interés

[0050]

El vector del plásmido pIRES2-EGFP lineal recuperado	0,3 µg
ADN del gen de interés (en el ejemplo 1 o el ejemplo comparativo 1)	3 µg
Ligasa T4	10 unidades
Tampón de ligamiento	1,0 µl
Agua desionizada	hasta llevar el sistema a 10 µl

45 se incubaron a 14°C durante 12 h, se sometieron a extracción con fenol/cloroformo para dar el ADN total, se precipitaron mediante etanol anhidro para dar un sedimento de ADN. El sedimento de ADN se lavó con etanol al

70% y se disolvió de nuevo en agua desionizada. El peso molecular del plásmido se identificó mediante electroforesis (véase la figura 1 para el resultado de electroforesis del ejemplo 1, en el que el carril 1 es el resultado de electroforesis para el ADN total ligado del ejemplo 1, el carril 2 es el marcador de tamaño de peso molecular, y la banda con un peso molecular mayor de 5000 en el carril 1 es la banda ligada con éxito) y los vectores del plásmido pIRES2-EGFP que portan los genes de interés (en el ejemplo 1 o el ejemplo comparativo) se purificaron individualmente y se recuperaron. El plásmido purificado se almacenó a -20°C hasta que se usó.

[0051] La enzima de restricción y la ligasa T4 utilizadas, así como los tampones de reacción y los sistemas experimentales utilizados fueron todos de NEB Co, y se manipulan de acuerdo con la introducción de los productos correspondientes y los protocolos de funcionamiento estándar de los mismos.

2) Construcción de un vector de expresión de adenovirus

[0052]

15 2-1) El serotipo 5 de adenovirus humano y el adenovirus delecionado en E1/E3 se seleccionaron en el ejemplo para construir un vector de plásmido lanzadera recombinante en las siguientes etapas.

- a) se proporcionó un vector lanzadera pShuttle2-CMV (BD Co.) (CMV indica el citomegalovirus);
- 20 b) el plásmido en la etapa a) se digirió doblemente con enzimas de restricción EcoRV + NotI;
- c) se realizó desfosforilación terminal con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP);
- d) se recuperó el fragmento de vector de 3,4 kb;
- e) el vector del plásmido pIRES2-EGFP obtenido en las etapas 1-2 anteriores se digirió doblemente con enzimas de restricción EcoRV+NotI, y el G262-IRES2-EGFP o G261-IRES2-EGFP resultante de la digestión por restricción se
- 25 ligó respectivamente en el fragmento del vector de plásmido lanzadera obtenido en la etapa d) en presencia de ligasa T4, generando de este modo el plásmido lanzadera circular recombinante pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP o el plásmido lanzadera circular recombinante pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP;
- f) los plásmidos lanzadera obtenidos en la etapa e) se digirieron con la enzima de restricción NheI,
- g) Los extremos escindidos enzimáticamente en la etapa f) se rellenaron con fragmento de Klenow de ADN
- 30 polimerasa I;
- h) el fragmento de 4,1 kb se recuperó (el fragmento es un fragmento de ADN en el que se insertó el gen exógeno y cuyas secuencias parciales provenientes del vector estaban ubicadas en ambos extremos).

2-2) identificación del plásmido lanzadera circular pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP o el plásmido lanzadera circular pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP obtenido.

El plásmido lanzadera circular pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP o pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP se escindió enzimáticamente con EcoRI. El producto resultante de la digestión por restricción se identificó en una electroforesis en gel de agarosa al 1,2%; El clon positivo daría dos bandas con un peso molecular de 4,7 kb y 2,8 kb, respectivamente, mientras que el clon negativo daría una banda de 3,4 kb solamente. El resultado de identificación se mostró en la figura 6, en la que M es un marcador de tamaño de peso molecular (las bandas en la escala de ADN de 1 kb de arriba hacia abajo fueron 8 kb, 7 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1,6 kb, 1 kb, 517 pb, 396 pb y 230 pb, respectivamente), Los carriles 1-4 (dos muestras de pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP y dos muestras de pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP) representaban todos los clones positivos.

45 2-3) El CMV-GFP-IRES-GFP se transfirió desde pShuttleGFP-CMV-TrkC sobre el vector de adenovirus pAd, que genera el plásmido de adenovirus recombinante pAd-GFP-G261 o pAd-GFP-G262. Todos los plásmidos blancos usados anteriormente fueron vectores comerciales adquiridos de Clontech Co., y las condiciones experimentales y los kits usados fueron todos kits comerciales. El kit usado en la transferencia fue Adeno-X Expression System 1 de Clontech (Clontech 631513), y la transferencia se implementó de acuerdo con el protocolo experimental proporcionado por Clontech Co.

2-4) Identificación de los plásmidos de adenovirus recombinante pAd-GFP-G261 y pAd-GFP-G262

La digestión por restricción con XhoI se realizó en los plásmidos de adenovirus recombinante pAd-GFP-G261 y pAd-GFP-G262, respectivamente. El producto resultante de la digestión por restricción se identificó en una electroforesis en gel de agarosa al 1,2%; el clon positivo daría bandas con el siguiente peso molecular de 14 kb, 11,8 kb, 4,9 kb, 2,6 kb, 2,47 kb, 1,45 kb y 0,6 kb, respectivamente, mientras que el clon negativo daría bandas con el siguiente peso molecular de 14 kb, 11,8 kb, 4 kb, 2,47 kb, 1,45 kb y 0,6 kb, respectivamente. El resultado de identificación se mostró en la figura 7, en la que M es el marcador de tamaño de peso molecular (las bandas en la escala de ADN de 1 kb de arriba hacia abajo fueron 8 kb, 7 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1,6 kb, 1 kb, 517 pb, 396 pb y 230 pb, respectivamente), Los carriles 1-5 (dos muestras del plásmido de adenovirus recombinante pAd-GFP-G261 y tres

muestras del plásmido de adenovirus recombinante pAd-GFP-G262) representaban todos los clones positivos.

2-5) Empaquetamiento, amplificación, recogida y purificación del adenovirus recombinante

El ADN de adenovirus recombinante identificado correctamente en la etapa 2-4) se transfectó en células 239 para ser empaquetado y a continuación la solución madre de virus se almacenó. El adenovirus empaquetado se amplificó y a continuación la solución madre de virus se almacenó (solución madre de virus secundaria). Además, la solución madre de virus secundaria amplificada se sometió a dos ciclos de amplificación a gran escala. Después de que la amplificación estaba completa, el virus se recogió y se sometió a centrifugación por gradiente de densidad de CsCl para purificación, y el CsCl residual en la solución de virus se retiró por diálisis.

10 [0053] La manipulación detallada fue la siguiente:

- a) se sembraron células 293 (la célula de riñón embrionario humano transformada con E1) en una o dos placas de cultivo celular (60 mm) 24 h antes de la transfección, y se cultivaron hasta una tasa de confluencia del 50-70% cuando se transfectaron;
- 15 b) Antes de la transfección, el plásmido de interés se escindió enzimáticamente con Pac I (6 µg de ADN por una placa de cultivo celular de 60 mm). El plásmido escindido enzimáticamente se precipitó mediante etanol y se redisolvió en 20 µl de agua estéril.
- c) Las células se transfectaron con 6 µg de plásmido tratado con *PacI* usando PEI u otros agentes de transfección.
- d) Después de 8 h de transfección, el licor mixto de transfección se retiró y se añadieron 4 ml de medio de cultivo completo DMEM (que contenía 10% de CBS y 1% de Pen/Strep);
- 20 e) Después de 7 a 10 días de transfección, las células se rasparon de la placa de cultivo y se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml. Después de centrifugar, las células se resuspendieron en 2,0 ml de PBS o el medio de cultivo completo. La suspensión se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló en un baño de agua a 37°C con agitación brusca. La etapa se repitió cuatro veces. Después de la centrifugación, el sobrenadante resultante se almacenó a -
- 25 20°C.
- f) Las células 293 se sembraron en una placa de cultivo celular de 60 mm, se cultivaron a una tasa de confluencia del 50-70%, y se inocularon con sobrenadante que contenía virus en un porcentaje de volumen del 30-50%. La lisis celular aparente y el efecto citopático (CPE) se observaron 3 días después de la infección;
- g) Cuando de 1/3 a 1/2 de las células se desprendían y flotaban, lo que sucedía habitualmente 3-5 días después de la infección, el virus se recogió. La presencia del adenovirus recombinante puede confirmarse adicionalmente mediante transferencia de Western o PCR (se añadieron 5 µl del sobrenadante que contenía virus a 10 µl de proteasa K de calidad de PCR y se incubaron a 55°C durante 1 h; a continuación, la muestra mixta se llevó a ebullición durante hasta 5 minutos y se centrifugó; 1-2 µl del sobrenadante resultante se usaron en una reacción de PCR).
- 30 h) El sobrenadante que contenía virus se recogió siguiendo el protocolo en la etapa f). En este caso, una solución madre de virus con un valor cuantitativo viral de al menos 10⁷ viriones/ml (partículas infecciosas/ml) puede recogerse típicamente. Cada ciclo de la amplificación era para elevar el valor cuantitativo viral una orden de magnitud.
- i) Para amplificación adicional, el sobrenadante que contenía virus obtenido en la etapa h) se inoculó adicionalmente a las células en una placa de cultivo celular de 100 mm, el virus resultante se recogió de acuerdo con el protocolo en la etapa f) y se inoculó en las células 293 en una placa de cultivo celular de 150 mm para obtener una cantidad suficiente del virus de progenie.
- 40 j) Se añadieron secuencialmente soluciones al 15% de CsCl y al 40% de CsCl a un tubo de centrifugación Beckman para formar una solución en gradiente de CsCl.
- k) El sobrenadante que contenía virus con viriones enriquecidos eventualmente se añadió gota a gota a la solución en gradiente de CsCl.
- 45 l) Se realizó una ultracentrifugación a 30.000 rpm a 4°C durante 16 h.
- m) Se formaron dos bandas después de la centrifugación. La banda superior con un color más apagado contenía principalmente cápsidas de adenovirus vacías sin infectividad; mientras que la banda inferior con un color más claro contenía viriones vivos que era necesario recoger. La banda inferior se recogió con una aguja de calibre 16.
- 50 n) La recolección se dializó contra un TBS (Tris 10 mM, NaCl al 0,9%, pH 8,1) durante 1 h y a continuación contra TBS que contenía glicerol al 10% dos veces (una hora cada vez) para retirar CsCl;
- o) El adenovirus purificado se dividió en alícuotas en tubos EP.
- p) La cantidad de la proteína total en el dializado se determinó en un espectrofotómetro Eppendorf (Eppendorf Biophotometer) con 1 µg de proteína viral correspondiente a 4x10⁹ viriones,
- 55 q) Para almacenamiento a largo plazo, almacenado a -70°C, para almacenamiento a corto plazo, a 4°C; la cantidad de la solución madre de reserva no era menor de 1E+11 unidades de VP/recipiente de alícuotas después de la división en alícuotas; la amplificación a gran escala descrita anteriormente significa alcanzar la cantidad del virus por encima de 1E+12 unidades de VP/recipiente de alícuota.
- r) Dado que existe una diferencia en la eficiencia de infección del adenovirus para diferentes líneas celulares y el

efecto citotóxico del virión es tenido en cuenta, la dosis viral necesaria se determina habitualmente mediante el método de dilución en gradiente sucesiva. Las células diana se infectaron con el virión en una cantidad relativa a un número de células de 1:1, 10:1, 100:1 y 1000:1; Se añadió polibreno (polimetobormuro de 1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileno) en un volumen relativo al medio de 1:1000. La placa se centrifugó a 37°C durante 30 min.

5 s) El medio se sustituyó 8-12 h después de la infección y el virus se recogió. 2-6) Control de calidad sobre empaquetamiento del adenovirus recombinante.

[0054] La cantidad total de virus infeccioso $\geq 1,05 \times 10^{12}$ UFP/3 ml

10 2-7) Almacenamiento del adenovirus recombinante

[0055]

Tampón de almacenamiento: sacarosa al 4%, MgCl₂ 2m M, Tris 10mM, pH 8,0

15 Temperatura de almacenamiento: -80°C

Ejemplo 3: Transfección de la célula min-6

1. El medio basal para células min-6

20

[0056]

DMEM (Gibco 11995)	830 ml
FBS (Gibco. US)	150 ml
P/S	10 ml
Hepes (1 M)	10 ml
β-mercaptoetanol	10 μl

[0057] Las placas de Petri tenían su superficie no tratada para cultivo celular y eran todas matraces de ficol.

25 Condiciones de incubación: 37°C; CO₂ al 5%; 95% de humedad relativa

[0058] Los vectores del plásmido pIRES2-EGFP preparados en el ejemplo 2 que portan el gen de interés (ejemplo 1 o ejemplo comparativo 1) se transfectaron a una línea celular min6 de acuerdo con el protocolo de Lipofectmine 2000 (invitrogen). Las etapas detalladas fueron las siguientes:

30

Día 1: Las células congeladas en nitrógeno líquido se revivieron y se sembraron en un matraz de cultivo de 25 cm².

Día 2: El medio de cultivo se sustituye.

35 Día 3: Las células se digirieron con una solución de tripsina al 0,2% (Gibco) una vez cultivadas a una tasa de confluencia del 90% y se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/ml (con el antibiótico retirado en ese momento).

Día 4: Se mezclaron 4 μg de los vectores linealizados, 10 μl de Lipofectmine, y Opti-M hasta 100 μl y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Toda la mezcla se añadió a los medios de cultivo para células min6 y se mezclaron suavemente hasta homogeneidad. La mezcla resultante se dejó reposar a 37°C en CO₂ al 5% al 95% de humedad relativa durante 24 h. Al mismo tiempo, se estableció un control negativo.

40 Día 5: El medio de cultivo se sustituye. (Como alternativa, pueden usarse los medios de cultivo que contienen el antibiótico).

Día 6: El medio de cultivo se sustituye y se suplementa con el antibiótico G418 (400 μg/ml) para cribar las líneas celulares transfectadas de forma estable (véase en la figura 5, se observó en un campo oscuro que la proteína verde fluorescente se había expresado) durante 8 días sucesivos.

45

[0059] Después de que una línea celular que expresaba de forma estable la proteína GCK exógena se cribó, se identificó a su nivel genómico mediante PCR. Para este fin, el inventor de la presente invención diseñó un par de cebadores específicos para la secuencia del vector (cebador directo 5'-GCGGAGAAGCCTTGGATATT-3' (SEQ ID NO: 3); cebador inverso: 5'-TTTGATAGCGTCTCGAGAA-3' (SEQ ID NO: 4)), y se confirmó mediante experimentos 50 y alineamiento de secuencia que los cebadores eran incapaces de iniciar amplificación a partir del genoma de una línea celular min-6, pero eran capaces de producir un amplicón de 653 pb a partir del vector introducido. El inventor también diseñó un par de cebadores específicos del genoma de min-6 (cebador directo: 5'-

CAAGCCCTGTAAGAAGCCACT-3' (SEQ ID NO: 5); cebador inverso: 5'-TGCTTCCAGCTA CTTGAGGTC-3' (SEQ ID NO:6), y se confirmó también mediante experimentos y alineamiento de secuencia que los cebadores eran incapaces de amplificar cualquier producto específico a partir del vector introducido y capaces de producir un producto de 956 pb a partir del genoma de una línea celular min-6.

5

[0060] Por lo tanto, dos productos amplificados con diferente tamaño pueden observarse después de la amplificación del genoma de min-6 que porta el ADN exógeno (Véase en la figura 4).

Extracción de ADN genómico de células min-6

Formulación de los reactivos que se necesitan

10 Tampón de lisis de Proteinasa K (tampón de Proteinasa K SNET)

20 mmol/l de Tris-Cl (pH 8,0)

5 mmol/l de EDTA (pH 8,0)

400 mmol/l de NaCl

1% (m/v) de SDS

15 400 µg/ml de Proteinasa K

[0061] Las células se digirieron con proteinasas pancreáticas antes de la extracción del ADN genómico de acuerdo con las siguientes etapas:

20 A La proteinasa se añadió y se incubó a 56°C durante una noche.

B Etanol anhidro en volúmenes de dos veces se añadió y se agitó uniformemente hasta homogeneidad.

C La mezcla resultante se dejó reposar a -80°C en un frigorífico.

D Se realizó centrifugación a 12.000 g durante 15 min

E El sobrenadante se desechó.

25 F El sedimento de ADN se lavó con etanol al 75%.

G Se realizó centrifugación a 12.000 g durante 10 min.

H El sedimento de ADN se lavó con etanol al 75%.

I Se realizó centrifugación a 12.000 g durante 10 min.

J El sedimento de ADN se secó.

30 K El sedimento de ADN se disolvió en agua purificada.

[0062] El ADN se cuantificó con un espectrofotómetro UV y se diluyó con agua purificada de acuerdo con la concentración de ADN para proporcionar una concentración final de ADN de 50 ng/µl para una solución de trabajo. La solución madre se almacenó en una unidad frigorífica a -20°C hasta estar lista para usar, y su dilución se

35 almacenó en un frigorífico a 4°C y sirvió como plantilla de PCR útil en una reacción de PCR. Sistema de reacción de PCR de 10 µl

10xtampón de PCR (libre de Mg ²⁺)	1,0 µl
dNTP (25 mM)	0,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl
Cebador 1(Directo/Inverso)	1,0 pmol
Cebador 2(Directo/Inverso)	1,0 pmol
DMSO (Dimetilsulfóxido)	0,5 µl
ADN polimerasa AmpliTaq Gold	0,05 µl (5 U/µl)
ADN genómico plantilla DNA (50 ng/µl)	2, 0 µl
H ₂ O	Enrasada hasta 10,0 µl del sistema total

Programa de reacción PCR TouchDown

40 1 = 95°C durante 8 min

2 = 94°C durante 30 s

3 = 68°C durante 1 min

-1,0°C por ciclo

4 = 72°C durante 45 s

45 5 = volver a 2, 12 ciclos

6 = 95°C durante 30 s

7 = 54°C 1 durante 5 s

- +1 s por ciclo
- 8 = 72°C durante 45 s
- 9 = volver a 6, 30 ciclos
- 10 = 72°C durante 60 min

5 11 = 4°C durante mantenimiento (permanente)

[0063] El producto amplificado por PCR se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%. El resultado de identificación se mostró en la figura 4, en la que el Carril 0 es: plásmido G262, Carril 1: genoma de G261 min-6, Carril 2: genoma de G261min-6, Carril 3: genoma de G262min-6, Carril 4: genoma de G262min-6, Carril 10 5: plásmido G261, Carril 6: plásmido G261, Carril 7: genoma de min-6 de tipo silvestre, Carril 8: control negativo (agua), Carril 9: control negativo (agua), Carril 10: plásmido G262, Carril 11: genoma de min-6 de tipo silvestre, Carril 12: genoma de G261min-6, Carril 13: genoma de G262min-6 y Carril M: ADN marcados de tamaño en peso molecular.

2. Las células min-6 se sembraron uniformemente en una placa de 12 pocillos con replicación en tetra pocillos por 15 muestra. Las células se sincronizaron mediante privación de suero: el sobrenadante de cultivo se retiró pipeteando, las células se lavaron dos veces con tampón bicarbonato de Krebs-Ringer sin azúcar (KRBB) y se pretrataron con KRBB sin azúcar + BSA al 0,1% BSA durante 2 h. La formulación del medio de KRBB sin azúcar + BSA al 0,1% fue la siguiente:

KRBB	1 l
NaCl	6,9496 g
KCl	354 mg
NaHCO ₃	420 mg
MgSO ₄	144,4 mg
KH ₂ PO ₄	160,6 mg
HEPES	4,766 g
CaCl ₂ anhidro PH 7,4	281,915 mg
BSA	0,1% (concentración final)

20

3. El sobrenadante de cultivo se retiró pipeteando, y a continuación las células se trataron con KRBB G2.8+BSA al 0,1% o KRBB G25 + BSA al 0,01% durante 1 hora, en la que el G2.8 indicaba la concentración de glucosa de 504,448 mg/l y G25 indicaba la concentración de glucosa de 4,504 g/l.

4. El sobrenadante se recogió de 3 pocillos y se almacenó a -20°C hasta que se ensayó.

25 5. Las células en el cuarto pocillo se digirieron y se contaron en un *hemocitómetro* para calcular estadísticamente el número de la célula en cada muestra.

6. Las intensidades de secreción de insulina a partir de células min-6 en la condición de concentraciones de glucosa elevadas se determinaron mediante radioinmunoensayo.

30 **[0064]** En el radioinmunoensayo, existe una relación funcional entre el contenido de insulina en la muestra y el recuento de ¹²⁵I cpm en la muestra. Por lo tanto, se debe trazar una curva patrón en cada experimento para calcular una relación funcional entre el contenido de insulina y el recuento de ¹²⁵I cpm. La preparación de una curva patrón y la medición de las muestras.

35

Tabla 1 contenido de insulina y recuento de ¹²⁵I cpm en los patrones

	μU/ml	CPM
Patrón 1	2	9692
Patrón 2	4	8191
Patrón 3	15	6471
Patrón 4	40	3636
Patrón 5	175	2151
Patrón 6	300	1519

[0065] Tal como se muestra en la figura 2, basándose en el contenido de insulina y el recuento de ¹²⁵I cpm en los patrones, la relación funcional entre la unidad de insulina (μunidad/ml) X y el recuento de ¹²⁵I Y se estableció de la siguiente manera:

40

$$y = - 1649,8 \ln (x) + 10590$$

Fórmula 1

[0066] De este modo,

$$x = \exp [(10590 - y)/1649,8]$$

Fórmula 2

[0067] Los recuentos de ¹²⁵I cpm en sobrenadantes de cultivo de tipo silvestre (wt), G261min-6 y G262min-6 se determinaron realmente y a continuación se convirtieron en cantidades de la insulina secretada mediante el cálculo con la Fórmula 2.

10

Tabla 2 La cantidad de la insulina secretada

	μU / ml (x)	CPM (y)
Wt	53,0261	4045
G261	54,79043	3991
G262	64,065	3733

[0068] Puede verse a partir de la tabla 2 que G262 muestra un efecto de promover significativamente la secreción de insulina, lo que sugiere que la actividad glucoquinasa del G262 es significativamente mayor que la del tipo silvestre.

15

Ejemplo 4: Experimento *in vivo* del adenovirus recombinante en animales1.

Cría del animal experimental (rata GK)

20

[0069] Ratas GK como el animal experimental se adquirieron de National Rodent Laboratory Animal Resources, Filial de Shanghái, China. Como un animal experimental, ratas GK, las ratas SLAC/GK que padecía diabetes de tipo 2, se criaron en 1975 por la Universidad de Tohoku. Éstas se establecieron cribando los individuos hiperglucémicos de las ratas WISTAR cruzadas sin repetición de ancestros. La hembra alcanza la maduración sexual a 8-10 semanas de edad y los machos a las 10-12 semanas de edad. El periodo de gestación dura de 21 a 23 días, el tamaño de camada es de 7-9, la tasa de concepción es del 60%, y la lactancia dura 28 días. Las ratas GK se usan ampliamente en la investigación de la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM, diabetes de tipo I). Después de la aparición de orina diabética, hiperglucemia, secreción de insulina atenuada, etc., aparecen rápidamente en ratas GK, siendo complicadas por retinopatía, microangiopatía, neuropatía, nefropatía en fases tardías. En contraste con otro modelo animal de roedor de diabetes de tipo II, la rata GK es un modelo no obeso. Se seleccionaron ratas GK de 20 a 10 semanas de edad en el ejemplo y se les proporcionó acceso *ad libitum* a comida y agua durante una semana.

25

30

2. Administración del adenovirus recombinante del ejemplo 2

35

(1) Formulación de la inyección

[0070] Un conjunto de tampones fosfato se formularon respectivamente de acuerdo con las dosis mostradas en la tabla 3, y a continuación se esterilizaron a 121°C durante 60 min. En condiciones estériles, la solución madre de adenovirus recombinante de las etapas 2-6 en el ejemplo 2 se filtró con una membrana de filtro de Millipore de 0,45 μm. Los restos celulares se retiraron. El filtrado se recogió en un tubo de centrifugación estéril y se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 h. El sobrenadante se desechó. El sedimento de virus resultante se dispersó en los tampones fosfato autoclavados anteriores tomando como base los valores cuantitativos mostrados en la tabla 3, dando las inyecciones de la presente invención.

45

Tabla 3

Medicamentos	Receta1	Receta2	Receta 3	Receta4	Receta5
tampón fosfato (% en peso)	99	95	90	85	80
inositol (% en peso)	1	0	0	10	15
sorbitol (% en peso)	0	5	0	5	0
sacarosa (% en peso)	0	0	10	0	5
regulador osmótico y concentración (mol/l)	cloruro sódico	cloruro potásico	cloruro sódico	cloruro potásico	cloruro sódico
	0,9	0,5	0,9	0,5	0,9

Presión osmótica (mOsm/kg)	200	300	400	450	500
Valor cuantitativo del virus (ufp/ml)	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰

[0071] El adenovirus recombinante pAd-GFP-G261 o pAd-GFP -G262 del ejemplo 2 se inyectó respectivamente una vez al día a una dosis de 10¹⁰ ufp/Kg de peso corporal a través de la vena caudal durante 3 días consecutivos. Cada formulación se inyectó en dos ratas.

5

(2) Método para determinar cuantitativamente la glucemia

[0072] La determinación cuantitativa de la glucemia se realizó en 0,5 ml de la muestra de sangre recogida de la vena angular del ojo de rata, usando el monitor de glucemia HEA-214 de OMRON de acuerdo con las 10 instrucciones del fabricante.

(3) Resultados para la determinación de glucemia en ratas

[0073] Los animales inyectados con el vector de virus recombinante que expresa la glucoquinasa de tipo 15 silvestre (G261) se numeraron 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Los animales inyectados con el vector de virus recombinante que expresa la glucoquinasa mutante (G262) se numeraron 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20. Se recogieron muestras de sangre en blanco de todas las ratas y se determinó cuantitativamente el nivel de glucemia antes de la inyección. Las muestras de sangre después de la inyección se recogieron 8 veces en diversas fases y se determinó cuantitativamente el nivel de glucemia. Los puntos temporales para el muestreo y los resultados 20 determinados se mostraron en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Diagrama descriptivo para glucemia de (G261) (mmol/l de GLU)

Grupo/Fecha	17-12-2008 antes de la inyección	27-12-2008 después de la inyección	29-12-2008 después de la inyección	8-1-2009 después de la inyección	14-1-2009 después de la inyección	20-1-2009 después de la inyección	27-1-2009 después de la inyección	5-2-2009 después de la inyección	11-2-2009 después de la inyección
G261	17,4	11,2	13,8	15,2	16,1	17,1	17,5	17,6	17,5
	2	16,9	14	14,9	15,5	16,5	11,8	16,8	16,7
	3	14,2	11,8	15,2	15,1	14,1	14	14,1	14,3
	4	17,5	13,4	14,2	15,3	16,9	17,4	17,3	17,2
	5	17,8	13,2	13,8	15,1	17,1	17,6	17,4	17,6
	6	18,5	12,1	13,7	14,9	17,9	18,1	18,3	18,3
	7	19,5	11,8	12,9	14,1	18,1	18,8	19,6	19,1
	8	18,3	11,5	13,2	15,1	18,2	18,1	18,2	18,4
	9	16,8	10,8	12,9	13,2	16,1	16,5	16,5	16,9
	10	18,6	11,2	12,6	14,3	16,8	18,3	18,4	18,3
media	17,55	11,66	13,19	14,62	15,25	16,88	16,74	17,42	17,43

Tabla 5 Diagrama descriptivo para glucemia de (G262) (mmol/l de GLU)

Grupo/Fecha	17-12-2008 antes de la inyección	27-12-2008 después de la inyección	29-12-2008 después de la inyección	8-1-2009 después de la inyección	14-1-2009 después de la inyección	20-1-2009 después de la inyección	27-1-2009 después de la inyección	5-2-2009 después de la inyección	11-2-2009 después de la inyección
G262	13,4	6,9	7,7	8,5	7,2	7,6	7,0	6,8	6,9
	19,7	12,5	11,0	6,8	8,7	8,1	8,9	7,4	6,8
	19,0	7,8	8,4	8,3	8,5	8,7	7,7	7,2	9,2
	15,7	10,4	10,0	8,1	9,8	9,9	10,2	10,3	8,8
	19,5	8,0	10,3	8,5	8,5	7,4	7,2	7,9	9,7
	14,4	6,8	8,2	12,4	1,3	9,6	8,9	8,8	8,2
	18,4	5,8	9,8	7,9	10,8	10,2	9,9	9,7	8,9
	18,0	12,2	10,8	10,2	9,3	7,9	7,6	7,2	7,1
	13,8	8,8	8,2	7,9	8,5	8,8	8,2	7,8	6,3
	17,8	9,9	11,2	10,1	8,5	7,7	8,4	8,8	7,5
media	16,97	8,91	9,56	8,87	8,11	8,59	8,4	8,19	7,94

[0074] Puede verse a partir de los datos registrados en las tablas 4 y 5 que la actividad in vivo del mutante de glucoquinasa humana de la presente invención para reducir el nivel de glucemia y la estabilidad del mismo son mucho mejores que las de la glucoquinasa humana de tipo silvestre. El nivel de glucemia en el modelo en rata de diabetes mellitus de tipo II puede estar controlado eficazmente inyectando en el cuerpo del animal el adenovirus recombinante que comprende el gen que codifica un mutante de glucoquinasa humana de la presente invención, permitiendo de este modo el tratamiento de diabetes mellitus a través del aumento de manera eficaz de la secreción de insulina.

Lista de secuencias

10

[0075]

<110> HUANG, Haidong

15 <120> GEN QUE CODIFICA UN MUTANTE DE GLUCOQUINASA HUMANA, ENZIMA CODIFICADA POR EL MISMO, VE RECOMBINANTE

<130> PCT090008

<150> 200910000087.1

20 <151> 07-01-2009

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.4

25

<210> 1

<211> 2749

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

ES 2 649 021 T3

actccacacc tggctggagc aggaaatgcc gagcggcgcc tgagccccag ggaagcaggc	60
taggatgtga gagacacagt cacctgcagc ctaattactc aaaagctgtc cccaggtcac	120
agaagggaga ggacatttcc cactgaatct gtctgaagga cactaagccc cacagctcaa	180
cacaaccagg agagaaagcg ctgaggacgc cacccaagcg cccagcaatg gccctgctg	240
gagaacatcc aggctcagtg aggaagggtc cagaaggga tgcttgccga ctcggtggag	300
aacaatgaaa aggaggaaac tgtgactgaa cctcaaacc caaaccagcc cgaggagaac	360
cacattctcc cagggacca gggcgggccc tgaccctgc ggcggagaag ccttgatat	420
ttccacttca gaagcctact ggggaaggct gaggggtccc agtccccac gctggctgct	480
gtgcagatgc tggacgacag agccaggatg gaggccgcca agaaggagaa ggtagagcag	540
atcctggcag agttccagct gcaggaggag gacctgaaga aggtgatgag acggatgcag	600
aaggagatgg accgcggcct gaggctggag acctatgaag aggccagtgt gaagatgctg	660
cccacctacg tgcgtccac cccagaaggc tcagaagtcg gggacttct ctccctggac	720
ctgggtggca ctaacttcag ggtgatgctg gtgaagggtg gagaaggta ggaggggcag	780
tggagcgtga agaccaaaca ccagatgtac tccatccccg aggacgcat gaccggcact	840
gctgagatgc tcttcgacta catctctgag tgcatctccg acttctgga caagcatcag	900
atgaaacaca agaagctgcc cctgggcttc accttctct ttcctgtgag gcacgaagac	960
atcgataagg gcatccttct caactggacc aagggttca aggcctcagg agcagaagg	1020
aacaatgtcg tggggcttct gcgagacgct atcaaacgga gaggggactt tgaatggat	1080
gtggtggcaa tggatgaatga cacggtggcc acgatgatct cctgctacta cgaagacat	1140
cagtgcgagg tcggcatgat cgtgggcacg ggctgcaatg cctgctacat ggaggagatg	1200
cagaatgtgg agctggtgga gggggacgag gcccgatgt gcgtcaatac cgagtggggc	1260
gccttcgggg actccggcga gctggacgag ttctgctgg agtatgaccg cctggtggac	1320

ES 2 649 021 T3

gagagctctg caaacccccg tcagcagctg tatgagaagc tcataggtgg caagtacatg 1380
ggcgagctgg tgcggcttgt gctgctcagg ctcgtggacg aaaacctgct cttccacggg 1440
gaggcctccg agcagctgcg cacacgcgga gccttcgaga cgcgcttcgt gtcgcagggtg 1500
gagagcgaca cgggcgaccg caagcagatc tacaacatcc tgagcacgct ggggctgcga 1560
ccctcgacca ccgactgcga catcgtgcgc cgcgctgcg agagcgtgtc tacgcgcgct 1620
gcgcacatgt gctcggcggg gctggcgggc gtcatcaacc gcatgcgcga gagccgcagc 1680
gaggacgtaa tgcgcatcac tgtgggcgtg gatggctccg tgtacaagct gcaccccagc 1740
ttcaaggagc ggttccatgc cagcgtgcgc aggctgacgc ccagctgcga gatcaccttc 1800
atcgagtccg aggagggcag tggccggggc gcggccctgg tctcggcggg ggccctgtaag 1860
aaggcctgta tgctgggcca gtgagagcag tggccgcaag cgcagggagg atgccacagc 1920
cccacagcac ccaggctcca tggggaagtg ctccccacac gtgctcgag cctggcgggg 1980
caggaggcct ggcttctca ggaccaggc cgctgccat accgctgggg aacagagcgg 2040
gcctcttccc tcagtttttc ggtgggacag ccccagggcc ctaacggggg tgcggcagga 2100
gcaggaacag agactctgga agccccccac ctttctcgct ggaatcaatt tcccagaagg 2160
gagttgctca ctcaggactt tgatgcattt ccacactgtc agagctgttg gcctcgctg 2220
ggcccaggct ctgggaaggg gtgccctctg gatcctgctg tggcctcact tcctgggaa 2280
ctcatcctgt gtggggaggc agctccaaca gcttgaccag acctagacct gggccaaaag 2340
ggcagccagg ggctgctcat caccagtc cggccatttt cttgctgag gctcaagagg 2400
cccagggagc aatgggaggg ggctccatgg aggaggtgtc ccaagctttg aataccccca 2460
gagacctttt ctctcccata ccatcactga gtggcttgtg attctgggat ggaccctcgc 2520
agcaggtgca agagacagag ccccaagcc tctgcccaca ggggccaca aaggggagaa 2580
gggccagccc tacatcttca gctcccatag cgctggctca ggaagaaacc ccaagcagca 2640
ttcagcacac cccaaggac aacccatca tatgacatgc caccctctcc atgcccaacc 2700
taagattgtg tgggtttttt aattaataat gttaaaagt ttaaacatg 2749

<210> 2
<211> 2748

5 <212> ADN
< 213> Artificial

<220>

<223> Gen sintético que codifica un mutante de glucoquinasa humana

10

<400> 2

ES 2 649 021 T3

```
actccacacc tggctggagc aggaaatgcc gagcggcgcc tgagccccag ggaagcaggc      60
taggatgtga gagacacagt cacctgcagc ctaattactc aaaagctgtc cccaggtcac      120
agaagggaga ggacatttcc cactgaatct gtctgaagga cactaagccc cacagctcaa      180
```

ES 2 649 021 T3

cacaaccagg agagaaagcg ctgaggacgc cacccaagcg cccagcaatg gccctgectg 240
gagaacatcc aggctcagtg aggaagggtc cagaagggaa tgcttgccga ctcggttgag 300
aacaatgaaa aggaggaaac tgtgactgaa cctcaaacc caaaccagcc cgaggagaac 360
cacattctcc cagggaccca gggcgggcgg tgaccctgc ggcggagaag ccttgatat 420
ttccacttca gaagcctact ggggaaggct gaggggtccc agctccccac gctggctgct 480
gtgcagatgc tggacgacag agccaggatg gagggcccca agaaggagaa ggtagagcag 540
atcctggcag agttccagct gcaggaggag gacctgaaga aggtgatgag acggatgcag 600
aaggagatgg accgcgccct gaggtgagag acccatgaag aggccagtgt gaagatgctg 660
cccacctacg tgcgctccac cccagaaggc tcagaagtgc gggacttct ctccctggac 720
ctgggtggca ctaacttcag ggtgatgctg gtgaagggtg gagaagggtg ggaggggag 780
tggagcgtga agaccaaaca ccagatgtac tccatccccg aggacgccat gaccggcact 840
gctgagatgc tcttcgacta catctctgag tgcattctccg acttctctga caagcatcag 900
atgaaacaca agaagctgcc cctgggcttc accttctct ttcctgtgag gcacgaagac 960
atcgataagg gcatccttct caactggacc aagggttca aggcctcagg agcagaaggg 1020
aacaatgtcg tggggcttct gcgagacgct atcaaacgga gaggggactt tgaatggat 1080
gtggtggcaa tggatgaatga cacggtggcc acgatgatct cctgctacta cgaagaccat 1140
cagtgcgagg tcggcatgat cgtgggcacg ggctgcaatg cctgtacat ggaggagatg 1200
cagaatgtgg agctggtgga gggggacgag ggccgcatgt gcgtcaatac cgagtggggc 1260
gccttcgggg actccggcga gctggacgag ttctgtctgg agtatgaccg cctggtggac 1320
gagagctctg caaaccccg tcagcagctg tatgagaagc tcataggtg caagtacatg 1380
ggcgagctgg tgcggcttgt gctgctcagg ctctgtggacg aaaacctgct cttccacggg 1440
gaggcctccg agcagctgcg cacacgcgga gccttcgaga cgcgcttctgt gtcgcaggtg 1500
gagagcgaca cgggcgaccg caagcagatc tacaacatcc tgagcacgct ggggctgcga 1560
ccctcgacca ccgactgcga catcgtgcgc cgcgctgcg agagcgtgtc tacgcgcgct 1620
gcgcacatgt gctcggcggg gctggcgggc gtcatcaacc gcatgcgca gagccgcagc 1680
gaggacgtaa tgcgcatcac tgtggcgctg gatggctccg tgtacaagct gcacccagc 1740
ttcaaggagc ggttccatgc cagcgtgcgc aggtgacgc ccagctgcga gatcacctc 1800
atcgagtccg aggagggcag tggccggggc gcggcctgg tctcggcggg ggctgtaag 1860
aaggcctgta tgctgggcca gtgagagcag tggccgcaag cgcagggagg atgccacagc 1920
cccacagcac ccaggctcca tggggaagtg ctccccacac gtgctcgcag cctggcgggg 1980
caggaggcct gccttgtca ggaccaggc cgcctgcat accgctgggg aacagagcgg 2040
gcctcttccc tcagtttttc ggtgggacag ccccagggcc ctaacggggg tgcggcagga 2100

ES 2 649 021 T3

gcaggaacag agactctgga agccccccac ctttctcgct ggaatcaatt tcccagaagg 2160
gagttgctca ctcaggactt tgatgcattt ccacactgtc agagctgttg gcctcgctg 2220
ggcccaggct ctgggaaggg gtgccctctg gatcctgctg tggcctcact tcctgggaa 2280
ctcatcctgt gtggggaggc agctccaaca gcttgaccag acctagacct gggccaaaag 2340
ggcagccagg ggctgctcat caccagtc caggcatttt cttgcctgag gctcaagagg 2400
cccagggagc aatgggaggg ggctccatgg aggaggtgtc ccaagctttg aatccccca 2460
gagacctttt ctctccata ccatcactga gtggcttgat attctgggat ggacctcgc 2520
agcaggtgca agagacagag cccccaagcc tctgcccaca ggggccaca aaggggagaa 2580
ggccagccc tacatcttca gctcccatag cgctggctca ggaagaaacc ccaagcagca 2640
ttagcacacc ccaagggaca accccatcat atgacatgcc accctctcca tgcccaacct 2700
aagattgtgt gggtttttta attaaaaatg ttaaagttt taaacatg 2748

REIVINDICACIONES

1. Un gen que codifica glucoquinasa humana aislado, **caracterizado porque** dicho gen tiene la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Un vector recombinante que comprende un vector y un gen de interés portado en éste, **caracterizado porque** dicho gen de interés es el gen que codifica glucoquinasa humana descrito en la reivindicación 1.
- 10 3. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** dicho vector se selecciona entre el grupo que consiste en un vector de clonación, vector de expresión eucariota, vector de expresión procariota y vector lanzadera.
- 15 4. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** dicho vector se selecciona entre el grupo que consiste en pIRES2-EGFP, pCMVp-NEO.BAN, pEGFTActin y un vector de adenovirus.
- 20 5. Un huésped, **caracterizado porque** dicho huésped comprende el vector recombinante descrito en cualquiera de las reivindicaciones 2-4 y se selecciona entre uno o más de *Escherichia coli*, células 239, células min-6 y células beta de islotes de Langerhans humanas aisladas.
- 25 6. Una composición farmacéutica, **caracterizada porque** dicha composición farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más seleccionados entre un gen que codifica glucoquinasa humana de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1, un vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, y un huésped de acuerdo con la reivindicación 5.
- 30 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha composición farmacéutica es un fluido para inyección que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más seleccionados entre el gen que codifica glucoquinasa humana de acuerdo con la reivindicación 1 y el vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4.
- 35 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho excipiente farmacéuticamente aceptable es un tampón fosfato con un valor de pH de 4,0-9,0; y 10^2 - 10^{10} copias de dicho gen que codifica una glucoquinasa humana o 10^2 - 10^{10} copias de dicho vector recombinante están comprendidas en un mililitro del fluido para inyección.
- 40 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho fluido para inyección comprende además un protector y/o un regulador osmótico; el contenido de dicho protector es del 0,01-30% en peso tomando como base el fluido para inyección, dicho protector es uno o más seleccionado entre inositol, sorbitol y sacarosa; el contenido de dicho regulador osmótico permite que la presión osmótica del fluido para inyección sea de 200-700 mOsm/kg con el regulador osmótico siendo cloruro sódico y/o cloruro potásico.
- 45 10. Un gen que codifica glucoquinasa humana de acuerdo con la reivindicación 1, un vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, un huésped de acuerdo con la reivindicación 5 o una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 6-9 para uso como un medicamento.
11. Un gen que codifica glucoquinasa humana de acuerdo con la reivindicación 1, un vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, un huésped de acuerdo con la reivindicación 5 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9 para uso en la prevención y/o el tratamiento de la diabetes mellitus.

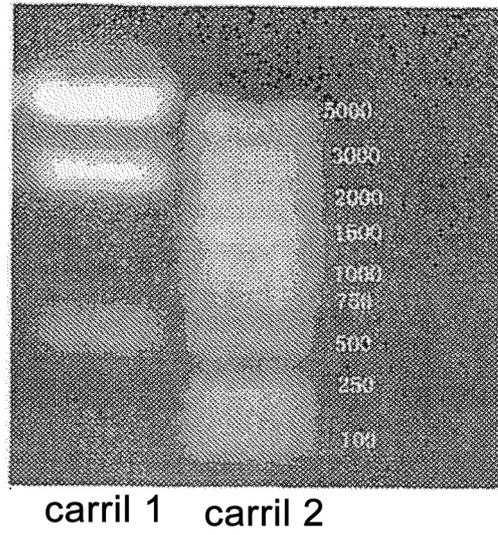


Fig. 1

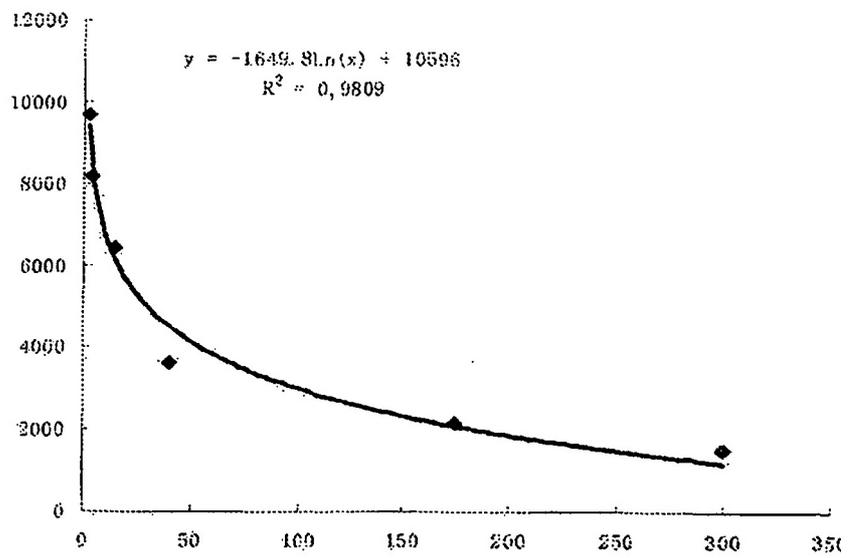


Fig. 2

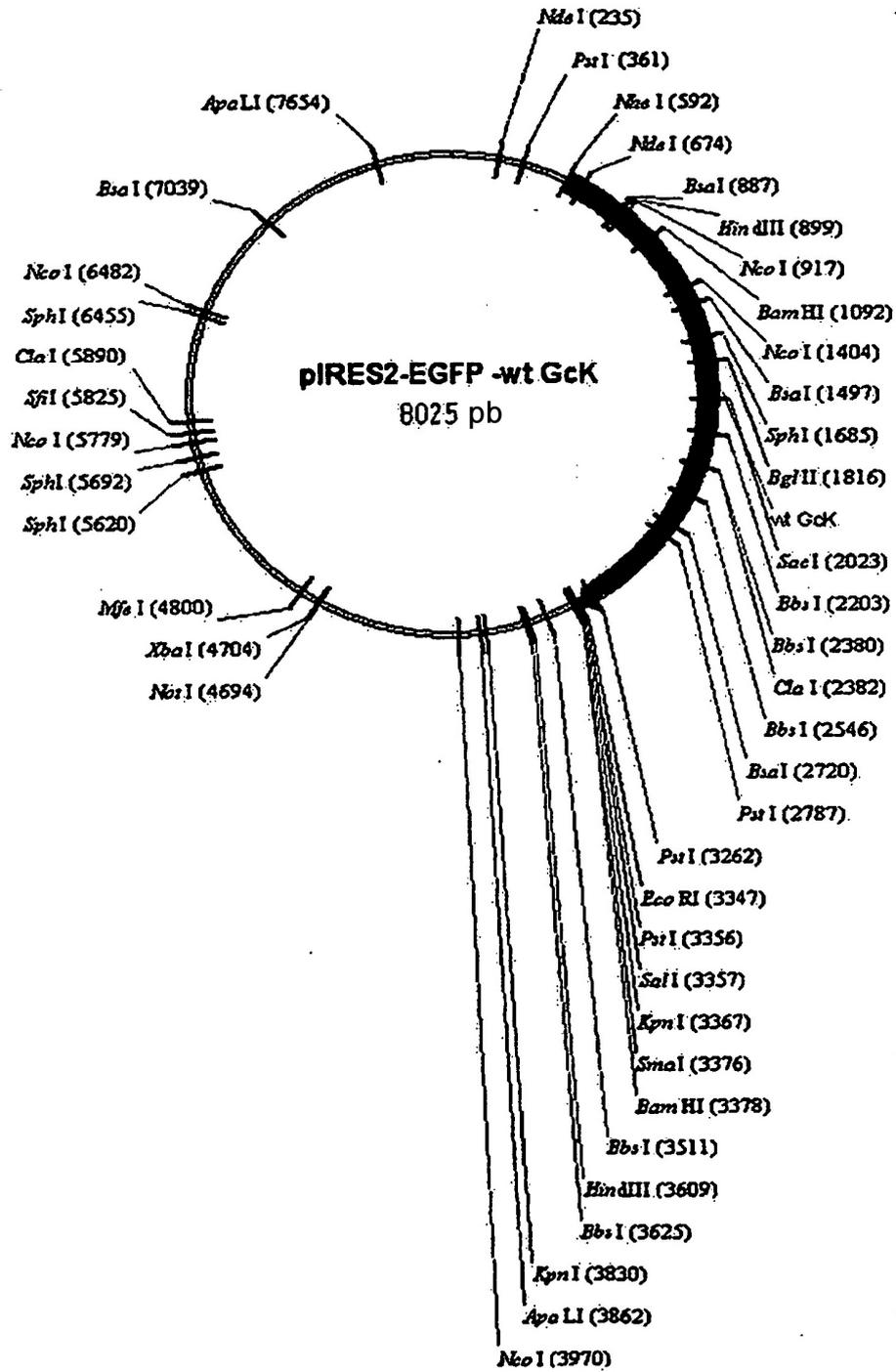


Fig. 3

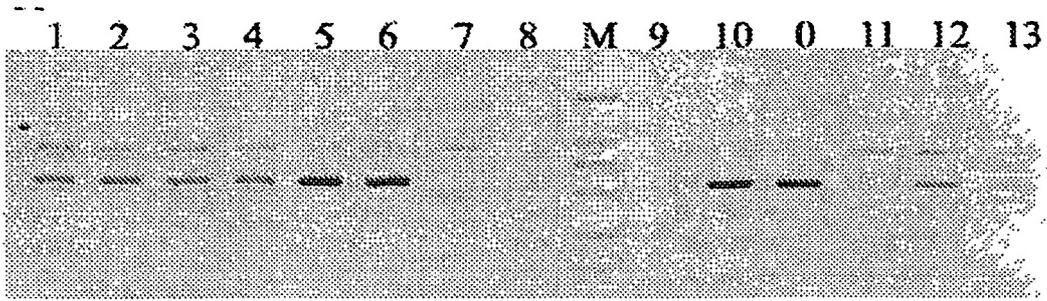


Fig. 4

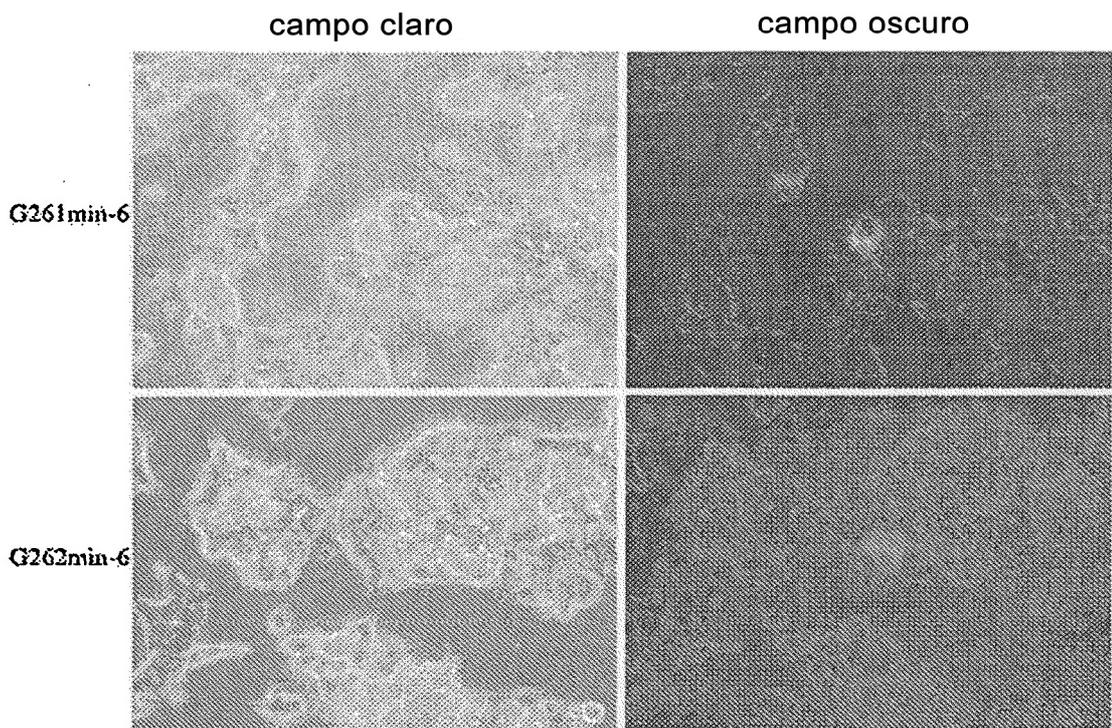


Fig. 5

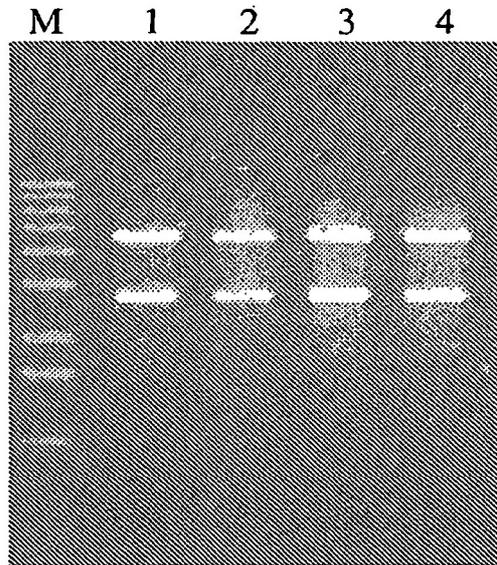


Fig. 6

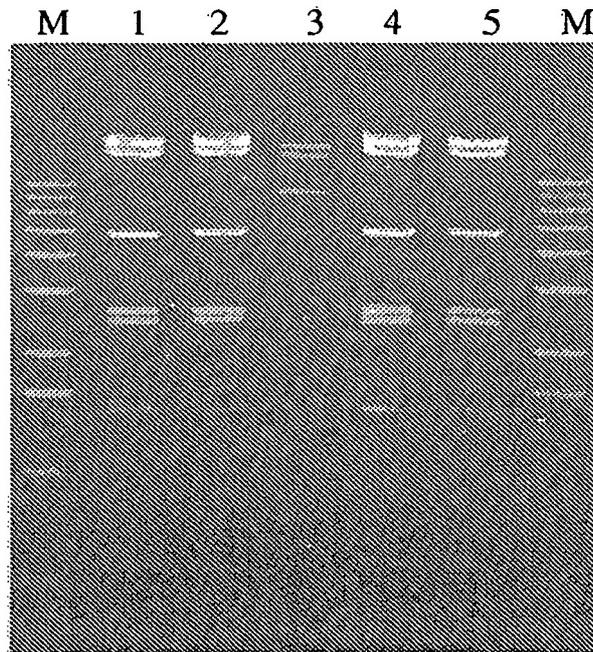


Fig. 7