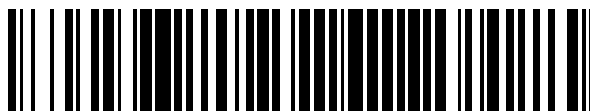


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 487**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/86</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/85</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/63</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/62</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/407</b>	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2012 PCT/US2012/041099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2012 E 12727062 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2718319**

54 Título: **Terapia génica con insulina basada en hepatocitos para la diabetes**

30 Prioridad:

**07.06.2011 US 201161494134 P**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)  
614 Walnut Street  
Madison, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

**ALAM, TAUSIF y  
SOLLINGER, HANS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 658 487 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

Terapia génica con insulina basada en hepatocitos para la diabetes

**Antecedentes**

5 Esta invención se refiere al tratamiento de diabetes utilizando terapia basada en hepatocitos, y específicamente a un método de utilización de hepatocitos que comprende una construcción genética que tiene una secuencia codificante para una proinsulina expresable en las células en respuesta a los niveles de glucosa. La proinsulina sintetizada en las células se procesa adicionalmente en una insulina activa secretable.

10 La insulina se produce y secreta normalmente por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. La insulina madura es una proteína que tiene dos cadenas polipeptídicas, A y B, unidas por enlaces disulfuro. La liberación de insulina sensible a glucosa de las células beta es un evento complejo que incluye la expresión génica, la modificación y la secreción postraduccional. El producto proteínico inicial y el precursor de insulina es la preproinsulina, una única cadena polipeptídica que tiene una secuencia señal N-terminal y una secuencia intermedia, el péptido C, entre las cadenas B y A. La secuencia señal se escinde durante el transporte desde el

15 retículo endoplásmático rugoso para formar proinsulina. La proinsulina se empaqueta en gránulos secretores junto con enzimas específicas requeridas para su procesamiento. La proinsulina se pliega en una estructura tridimensional específica, que forma enlaces disulfuro. La insulina madura resulta de la eliminación del péptido C. En las células beta, esta función es catalizada por endopeptidasas que reconocen las secuencias de aminoácidos específicas en la unión de la cadena B y el péptido C (unión B-C) y en la unión de la cadena C y el péptido A (unión C-A). La insulina

20 madura, almacenada en gránulos secretores, se libera en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. El mecanismo detallado de la liberación de insulina no se entiende completamente, pero el proceso implica la migración y fusión de los gránulos secretores con la membrana plasmática antes de la liberación.

25 En las células beta que funcionan de manera normal, la producción y liberación de insulina está afectada por el flujo glucolítico. La glucoquinasa y el transportador de glucosa 2 (GLUT-2) son dos proteínas que se cree que están involucradas en la detección de cambios en la concentración de glucosa en las células beta. Una reducción en GLUT-2, que está involucrada en el transporte de glucosa, se correlaciona con una expresión disminuida de insulina; la pérdida de actividad glucoquinasa causa una inhibición rápida de la expresión de insulina.

30 La destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas causa diabetes mellitus insulino dependiente o diabetes tipo I. Como consecuencia de la pérdida parcial o completa de las células beta, el páncreas secreta poca o ninguna insulina. La mayoría de las células, con la excepción de las células cerebrales, requieren insulina para la captación de glucosa. La producción inadecuada de insulina causa una reducción de la captación de glucosa y niveles elevados de glucosa en sangre. Tanto la captación reducida de glucosa como los niveles altos de glucosa en sangre están asociados con una serie de problemas de salud muy serios. De hecho, sin un tratamiento adecuado, la diabetes puede ser mortal.

35 Un tratamiento convencional para la diabetes implica la administración periódica de insulina exógena inyectable. Este método ha extendido la esperanza de vida de millones de personas con la enfermedad. Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre deben ser monitorizados cuidadosamente para asegurar que el individuo recibe la cantidad apropiada de insulina. Demasiada insulina puede causar que los niveles de glucosa en sangre bajen a niveles peligrosamente bajos. Muy poca insulina dará como resultado niveles de glucosa en sangre elevados.

40 Incluso con una monitorización cuidadosa de los niveles de glucosa en sangre, control de la dieta y las inyecciones de insulina, la salud de la gran mayoría de individuos con diabetes está afectada negativamente de alguna manera. La sustitución de la función de las células beta es una modalidad de tratamiento que puede tener ciertas ventajas sobre la administración de insulina, ya que la insulina sería secretada por las células en respuesta a los niveles de glucosa en el microambiente. Una forma de reemplazar la función de las células beta es mediante trasplante de

45 páncreas, que ha tenido cierto éxito. Sin embargo, el suministro de donantes es bastante limitado, y el trasplante de páncreas es muy costoso y demasiado problemático para estar ampliamente disponible para aquellos que necesitan la función de las células beta.

50 Ha habido muchas otras alternativas propuestas para el reemplazo de células beta, que incluyen reemplazar la función de las células beta con células beta existentes u otras líneas celulares derivadas del páncreas que secretan insulina (*Lacy, et al., Ann. Rev. Med., 37:33, 1986*). Debido a que el sistema inmune reconoce células heterólogas como extrañas, las células tienen que estar protegidas de células inmunoactivas (p. ej., células T y macrófagos que median procesos citolíticos).

Un enfoque para proteger células heterólogas es el inmunoaislamiento físico; sin embargo, el inmunoaislamiento en sí mismo plantea problemas significativos.

55 La patente de EE.UU. No. 5.427.940 concedida a Newgard, describe otro enfoque para la sustitución de células beta. Esta patente describe una célula beta artificial producida mediante ingeniería de células endocrinas de las células secretoras ACTH At-T-20. Una célula transfectada de manera estable, At-T-20, se obtiene introduciendo ADNc que codifica insulina humana y el gen transportador de glucosa, es decir, el gen de GLUT-2, dirigido por el promotor de CMV constitutivo. La línea celular ya expresa la isoforma correcta de la glucoquinasa requerida para la

expresión sensible a glucosa del gen de proinsulina. Aunque la línea celular es sensible a la glucosa, está regulada por secretagogo a concentraciones por debajo del rango fisiológico normal. Por lo tanto, el uso de estas células en un animal probablemente causaría hipoglucemia crónica; además, estas células se derivan de una fuente heteróloga y portan antígenos extraños al huésped receptor.

La patente EE.UU. No. 5.534.404 concedida a Laurance et al. describe otro enfoque para obtener una línea celular en la que la producción de insulina está regulada por secretagogo. Las subpoblaciones de células beta-TC-6 que tienen una concentración de calcio interno aumentada, una propiedad asociada con la secreción de insulina, se seleccionaron utilizando un separador de células. Después de pases sucesivos, se seleccionó una subpoblación de células que producen insulina en respuesta a la glucosa en el rango fisiológico (4-10 mM), y las células se encapsularon para uso terapéutico en alginato delimitado por una membrana de fibra hueca permselectiva PAN/PVC según el método de Dionne (Solicitud de Patente Internacional No. PCTIUS92/03327).

Valera, et al., *FASEB Journal*, 8: 440 (1994) describen hepatocitos de ratón transgénico que expresan insulina bajo el control del promotor de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). El gen quimérico PEPCK/insulina se inyectó en huevos de ratón fecundados y las crías se cribaron para la integración del transgén. En ratones transgénicos positivos, bajo condiciones de destrucción grave de islotes mediante estreptozotocina (SZ), la producción y secreción de insulina intacta por el hígado compensó la pérdida de la función de los islotes. A pesar de estos intentos de la técnica anterior, existe una necesidad continua de métodos alternativos a la terapia de insulina convencional para el tratamiento de la diabetes.

### **Breve compendio de la invención**

En una realización, la presente invención es un método para obtener la expresión de insulina regulada por glucosa *ex vivo* en hepatocitos de un mamífero, en donde el método comprende administrar un primer, segundo o tercer vector genético para la síntesis de insulina regulada por glucosa en un hepatocito aislado,

en donde el primer vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH,

en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,

en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y

en donde se produce la expresión de insulina regulada por glucosa.

En una realización, el vector genético se administra exponiendo las células a un virus infeccioso para las células, en donde el virus comprende la construcción genética, y mediante el cual al menos una porción de las células se infectan por el virus bajo condiciones adecuadas y a una multiplicidad suficiente.

En una realización, el mamífero es humano y la insulina es insulina humana.

En otra realización, la invención es un vector adecuado para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero,

en donde el vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3 'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH o

en donde el vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3 'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor o

en donde el vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina humana con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor.

En otra realización, la invención proporciona un primer, segundo o tercer vector para uso en un método para

controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, en donde el método comprende las etapas de:

- tratar al mamífero con el primer, segundo o tercer vector,

5 en donde el primer vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH y

10 en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,

15 en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y

- observar los niveles de insulina del mamífero,

en donde los niveles de insulina del mamífero están controlados.

20 En otra realización la invención proporciona un primer, segundo o tercer vector para uso en un método para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, en donde el método comprende:

- administrar el primer, segundo o tercer vector para la síntesis de insulina

regulada por glucosa en un hepatocito aislado del mamífero,

25 en donde el primer vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH,

30 en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,

en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un promotor específico del hígado, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y

35 - trasplantar los hepatocitos de vuelta al mamífero,

en donde se produce la expresión de insulina regulada por glucosa.

En una realización de la invención, el nivel de colesterol del mamífero disminuye después del tratamiento.

En una realización de la invención, el nivel de triglicéridos del mamífero disminuye después del tratamiento.

En una realización el mamífero es un gato o un perro.

40 Otras realizaciones de la presente invención se describen en la memoria descriptiva, en las reivindicaciones y en los dibujos.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama que compara glucosa en sangre en ayunas frente a tiempo en ratas diabéticas tratadas con STZ tratadas con diversos niveles de TA-1M.

45 La Figura 2 es una gráfica que compara niveles de glucosa en sangre postprandial frente a tiempo para las ratas diabéticas tratadas con STZ tratadas con ADN minicírculo TA-1.

La Figura 3 es un gráfico que compara peso corporal en ayunas frente a tiempo en ratas diabéticas tratadas con STZ tratadas con ADN minicírculo TA-1.

La Figura 4 es un diagrama del casete de expresión de TA1.

La Figura 5 es un diagrama del casete de expresión de TA4.

La Figura 6 es la secuencia de ADN del casete de expresión de TA1.

La Figura 7 es la secuencia de ADN del casete de expresión de TA4.

- 5 La Figura 8 es un diagrama de niveles de glucosa frente a tiempo frente a los niveles de insulina durante una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal de ratas diabéticas tratadas con TA1.

La Figura 9 es un diagrama de barras que compara la producción de insulina *ex vivo* en hepatocitos tratados con diversas construcciones de genes de insulina.

La Figura 10 es un diagrama del casete de expresión de TA2.

- 10 La Figura 11 es la secuencia de ADN del casete de expresión de TA2.

La Figura 12 es un diagrama de glucosa en sangre frente a días en ratas, en ayunas durante la noche y tratadas con construcciones de TA1 y TA4.

La Figura 13 es un diagrama de peso corporal frente a días en ratas tratadas con construcciones génicas de TA1.

- 15 La Figura 14 es un gráfico de peso corporal frente a días en ratas tratadas con construcciones génicas de TA1 y TA4.

La Figura 15 es una tabla de niveles de insulina humana en suero de ratas diabéticas tratadas con ADN plasmídico o minicírculo.

La Figura 16 es un gráfico de niveles de glucosa en sangre frente a tiempo para las ratas que experimentan un segundo tratamiento de ADN minicírculo TA1.

- 20 La Figura 17 es una tabla de producción de insulina dependiente de glucosa a partir de células madre humanas derivadas de hepatocitos.

La Figura 18 es un gráfico de peso corporal frente a días para ratas diabéticas tratadas con TA1M, TA2M y TA3M.

### Descripción de la invención

En general

- 25 Debido a la escasez de donantes de páncreas y al éxito limitado a largo plazo de los trasplantes de islotes, se necesitan alternativas para tratar la diabetes tipo I (T1D). Hemos desarrollado una terapia de producción de insulina hepática regulada por glucosa basada en terapia génica que demuestra una gran promesa en el tratamiento de la T1D en animales de experimentación. Nuestro enfoque es aplicar la terapia génica con insulina a hepatocitos nativos autólogos o hepatocitos derivados de células madre en un intento de superar las dos deficiencias críticas en el
- 30 tratamiento de T1D, que son la escasez de órganos de donantes y la necesidad de uso de por vida de inmunosupresión en pacientes con trasplante.

- Como demuestran los ejemplos a continuación, examinamos nuevas construcciones de ADN para la capacidad de mejorar la producción de insulina. Por ejemplo, una nueva construcción de insulina (TA1, descrita a continuación) que contiene el intrón de hormona de crecimiento humano (HGH), un potenciador de la traducción, elementos reguladores inducibles por glucosa, promotor de albúmina, insulina humana con sitios de peptidasa modificados y la
- 35 3'-UTR de albúmina, mejoró la producción de insulina en hepatocitos cultivados y en ratas y ratones diabéticos. TA1 dio como resultado un aumento de ~ 25 veces en la producción de insulina de hepatocitos de rata aislados en comparación con nuestra construcción de insulina publicada previamente [Alam y Sollinger, *Transplantation*. 2002 Dec 27; 74(12):1781-7].

- 40 En un aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de ADN nueva diseñada para mejorar la producción de insulina en hepatocitos. Otro aspecto de la presente invención se refiere a la creación de hepatocitos con producción de insulina mejorada. Otro aspecto de la presente invención se refiere a los vectores proporcionados para uso en un método para aliviar los síntomas de la diabetes tipo I en un paciente mamífero modulando la producción de insulina.

- 45 Construcciones de la presente invención

- Los siguientes ejemplos demuestran cuatro construcciones de insulina que contienen varios elementos. Los ejemplos demuestran que tres construcciones (TA1, TA2 y TA4) tuvieron éxito en proporcionar una terapia génica con insulina que proporciona un control estricto de la producción de insulina. Por lo tanto, la presente invención abarca tres tipos de vectores. El primer tipo de vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que
- 50 comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados

y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH. El segundo tipo de vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID N°: 2, un gen que codifica insulina con 5 sitios de peptidasa modificados y un 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor. El tercer tipo de vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico del hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y en donde se produce la expresión de insulina regulada por glucosa.

5  
10  
15 En otra realización de la presente invención, las construcciones de la presente invención consisten esencialmente en los elementos enumerados anteriormente. Por "consiste esencialmente en" queremos decir que un vector de la presente invención consistirá en el elemento descrito anteriormente y posiblemente otros elementos reguladores necesarios para la función del vector. Por ejemplo, los plásmidos y los vectores minicírculos pueden incluir secuencias para facilitar la adición o eliminación de elementos funcionales, tales como sitios de restricción, o secuencias necesarias para la replicación del propio vector.

20 Los solicitantes observan que la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 (Fig. 6, 7 y 11) son las secuencias de nucleótidos completas de las construcciones de expresión TA1, TA2 y TA4, respectivamente. Estas listas no incluyen secuencias que correspondan a 20 sitios de recombinación de minicírculos, etc. Por ejemplo, las SEQ ID NO: 1 y 2 no incluyen secuencias específicas utilizadas para la recombinación que se encuentran dentro del plásmido parental de minicírculo comercial que flanquea los casetes de expresión. Debido a que todas estas secuencias son parte de plásmidos comerciales y a que están fácilmente disponibles, las secuencias no se incluyen en la información proporcionada.

25 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 incluyen elementos que son necesarios para la presente invención (por ejemplo, los elementos enumerados a continuación) y secuencias de enlace y no esenciales que son útiles para la clonación pero que pueden ser sustituidas por muchas otras secuencias con funciones similares.

	Ubicación de restos en SEQ ID NO: 1 (TA1)	Ubicación de restos en SEQ ID NO: 2 (TA4)	Ubicación de restos en SEQ ID NO: 3 (TA2)
Potenciador de alfa fetoproteína (AFP)	15-265	-	15-265
Elementos reguladores inducibles por glucosa	279-369	46-136	279-369
Secuencia del promotor de albúmina	380-706	147-474	380-707
Intrón de HGH	-	475-754	708-987
Potenciador de traducción de VEGF	707-870	755-918	988-1151
Genes que codifican insulina humana con uniones de péptido B-C y C-A modificadas para la compatibilidad de Furin	871-1203	919-1251	1152-1484
3'UTR de Albúmina	1204-2077	1252-2125	1485-2358

Más específicamente, los vectores de la presente invención comprenden los siguientes elementos:

Potenciador de promotor

30 Por "potenciador de promotor", nos referimos preferiblemente al potenciador de alfa-fetoproteína. Los ejemplos a continuación describen el uso del potenciador de alfa-fetoproteína. Este elemento está diseñado para mejorar la transcripción de la secuencia génica unida funcionalmente que codifica una proteína en células hepáticas. El potenciador de alfafetoproteína aumenta la efectividad del promotor de albúmina y aumenta la unión del complejo de ARN polimerasa, produciendo así más ARNm, lo que en última instancia conduce a un aumento en la producción de proteínas. Los factores endógenos presentes en las células hepáticas interactúan con la región potenciadora de alfafetoproteína que activa los promotores de albúmina y alfafetoproteína durante el desarrollo del hígado y en el hígado completamente desarrollado. Debido a que el efecto del potenciador de AFP se extingue en células hepáticas completamente desarrolladas mediante la represión de su actividad, la región asociada con la represión

no se incluye en nuestra secuencia potenciadora de AFP, que permite que la actividad potenciadora persista en células hepáticas completamente desarrolladas.

5 Una forma adecuada del potenciador de AFP de la presente invención se describe en Jin et al., *Developmental Biology* 336 (2009) 294-300. Se puede encontrar una secuencia específica del potenciador de AFP en los restos 15-265 de la SEQ ID NO: 1 (casete de expresión de TA1).

10 En otra realización de la invención, se utilizarían otros potenciadores del promotor adecuados para utilizar con un promotor específico del hígado. Muchos promotores normales son de un tamaño bastante grande y contienen múltiples regiones que modulan la actividad transcripcional según se requiera para las necesidades fisiológicas existentes en un momento dado. Por lo tanto, la selección de un potenciador de promotor apropiado depende del contexto. Debe trabajar con el promotor en cuestión. Si las determinaciones empíricas validan la eficacia funcional de potenciadores de otros promotores, junto con el promotor específico del hígado utilizado, se pueden realizar modificaciones apropiadas en los casetes de expresión de insulina para lograr los resultados deseados. Actualmente, según la base de datos de Cold Spring Harbor Laboratory, hay aproximadamente 400 regiones y 15 elementos reguladores conocidos que funcionan en las células hepáticas.

#### Potenciador de traducción

20 Por "potenciador de traducción" nos referimos preferiblemente al potenciador de traducción de VEGF. Los ejemplos a continuación describen el uso del potenciador de traducción de VEGF. Este elemento está diseñado para potenciar la traducción de la secuencia de codificación de la proteína funcionalmente unida. El potenciador de traducción de VEGF actúa como un sitio de entrada ribosómico; aumenta la efectividad del proceso de traducción. Por lo tanto, su presencia causa una mayor cantidad de producción de proteína de insulina a partir de una cantidad dada de ARNm de insulina.

25 Se puede encontrar una secuencia específica del potenciador de traducción de VEGF en los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1 (casete de expresión TA1) y los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2 (casete de expresión TA4). El primer vector de la invención comprende un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1. El segundo vector de la invención comprende un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2. El tercer vector de la invención comprende un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3.

#### Elementos Reguladores Inducibles por Glucosa (GIRE)

30 El vector de la presente invención requiere 1-5 GIRE, preferiblemente 2-4 GIRE, más preferiblemente 3 GIRE. Se puede encontrar la secuencia para GIRE adecuados en los restos 279-369 en la SEQ ID NO: 1 y en 46-136 en la SEQ ID NO: 2. Los GIRE adecuados también se describen a continuación en los Ejemplos y también se pueden encontrar en las Patentes de EE.UU 7.425.443 y 6.933.133.

35 Como se utiliza en la presente memoria, un "elemento regulador inducible por glucosa" (GIRE) se refiere a una secuencia de polinucleótidos que contiene al menos un par de motivos CACGTG perfectos, cada miembro del par separado del otro por una secuencia de cinco pares de bases. Un "módulo regulador sensible a glucosa" contiene uno o más GIRE. En un ejemplo, los elementos reguladores se insertaron en 5' de la región 5' no traducida del gen de proinsulina humano y luego se clonaron en un vector de adenovirus que se utilizó para transfectar hepatocitos. Como demuestran los siguientes ejemplos, los GIRE proporcionan regulación transcripcional del ARNm de insulina 40 en hepatocitos en respuesta a concentraciones de glucosa fisiológicamente relevantes.

#### Secuencia del promotor

45 Las construcciones de la presente invención también implican el uso de un promotor génico, preferiblemente un promotor de albúmina. El promotor de albúmina es un promotor específico de hepatocitos (hígado) y se utiliza para asegurar que la producción de insulina esté restringida solo a las células hepáticas. Por lo tanto, si parte de la construcción génica de insulina termina en órganos distintos del hígado, la construcción no se expresará. Además, diversos componentes y mecanismos necesarios para conferir sensibilidad a la glucosa para la expresión de insulina que utilizan construcciones génicas de la presente invención son endógenos a las células hepáticas. Como se ilustra en los Ejemplos de la presente memoria, el promotor de albúmina de rata (184 pb), (Heard et al, Determinant of rat albumin promoter tissue specificity analyzed by an improved transient expression system. *Mol Cell Biol* 1987; 7:2425) se generó mediante PCR, que utiliza una plantilla de ADN genómico de rata, como se describió previamente (Alam et al., Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation* 2002; 74:1781). El uso de la secuencia promotora de albúmina de rata en el ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se espera que las construcciones que contienen un promotor de albúmina de otras especies, tales como humanas, confieran propiedades similares a las construcciones.

55 Se puede obtener un promotor de albúmina mediante uso de cebadores y amplificación por PCR después del examen de SEQ ID NO: 1 y 2. La secuencia promotora se encuentra en los restos 380-706 de la SEQ ID NO: 1 y en 147-474 de la SEQ ID NO: 2 y 380-707 de la SEQ ID NO: 3.

En principio, cualquier promotor constitutivamente activo de células hepática específicas capaz de llevar a cabo transcripción de nivel moderado a alto se puede sustituir por promotor de albúmina.

5 Un ejemplo de tal promotor es el inhibidor de alfa 1-antitripsina (Hafenrichter DG et al., Blood 1994; 84, 3394-404). Actualmente, según la base de datos de Cold Spring Harbor Laboratory, existen aproximadamente 300 promotores específicos del hígado conocidos.

Gen que codifica insulina con sitio de peptidasa modificado

10 Los vectores de la presente invención comprenden un gen que codifica insulina, preferiblemente insulina humana o insulina de mamífero no humana, con un sitio de peptidasa modificado. Los genes de insulina de la presente invención también se describen en la SEQ ID NO: 1 en los restos 871-1203 y en la SEQ ID NO: 2 en los restos 919-1251.

15 En un aspecto de la invención, se puede desear tratar animales no humanos. Para garantizar que no se produzca ninguna reacción inmune a la insulina cuando los animales diabéticos, como los gatos o los perros, se tratan utilizando terapia génica con insulina, se utilizaría insulina específica de especie en el ADN minicírculo para el tratamiento de animales. Por ejemplo, se utilizarían secuencias de insulina publicadas para gatos y perros (Kwok et al., 1983 J Biol Chem 258 2357-2363) para generar cebadores 3' y 5' para amplificar la secuencia codificante de insulina a partir de preparaciones de ADNc hechas a partir de ARN pancreático aislado de las especies respectivas mediante técnicas de biología molecular estándar. Alternativamente, la secuencia codificante también se puede sintetizar químicamente. De manera similar, se puede desear sustituir secuencias de insulina de otros animales cuando se tratan esos animales. Estas secuencias están fácilmente disponibles.

20 El ADNc de insulina humana se modificó en dos uniones de la proinsulina donde el procesamiento proteolítico y la maduración de la insulina se producen por enzimas específicas que residen en células beta, pero ausentes en células hepáticas. La modificación en el péptido B y C de la insulina humana de KTRR a RTKR y en el péptido C y A de LQKR a RQKR hace las dos uniones de insulina compatibles con la especificidad de escisión de proteasa endógena, furina, de células hepáticas. Estas modificaciones se describen en las siguientes publicaciones: Simonson GD, Groskreutz CM, Gorman CM, et al. Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. Hum Gene Ther 1996; 7: 71.; Groskreutz DJ, Sliwkowski MX, Gorman CM. Genetically engineered pro-insulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. J Biol Chem 1994; 269: 6241.

30 Con respecto al uso de insulina no humana, todas las modificaciones a la secuencia de proinsulina serán de naturaleza similar a la descrita para insulina humana, en donde los sitios de reconocimiento/procesamiento para peptidasas encontrados en células  $\beta$  (y tejido neuroendocrino) se cambiarán a sitios que pueden ser procesados mediante proteasas comúnmente encontradas en hígado (tal como furina) y en otras células. Hay algunas diferencias de secuencia menores en la insulina de varias especies, pero el punto clave es retener la secuencia auténtica de insulina madura para las especies dadas después del procesamiento.

35 El propósito de la mutación específica es cambiar la secuencia de aminoácidos de tal manera que el procesamiento proteolítico sea posible mediante la furina comúnmente encontrada. Existen múltiples codones para varios de los aminoácidos. Teóricamente, uno puede alterar la secuencia de ADN utilizando un codón alternativo pero aún producir el mismo polipéptido.

40 Estas modificaciones se han utilizado con éxito por los solicitantes en un informe publicado (Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. Transplantation 2002; 74:1781). Un gen de insulina no modificado producirá proinsulina no procesada porque las enzimas específicas necesarias para la maduración mediante procesamiento proteolítico están ausentes en células hepáticas. La proinsulina tiene una actividad biológica mínima de aproximadamente 100 veces menos que la insulina madura.

45 Se puede obtener un gen de insulina modificado mediante uso de cebadores y amplificación por PCR con conocimiento del gen de insulina en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

3'UTR de albúmina

50 Se sabe que la 3'UTR de albúmina contribuye a la longevidad del ARNm de albúmina en hepatocitos. Esta secuencia se obtuvo a partir de un vector de expresión plasmídico de Mirus (pMIR0375) pero esta secuencia también se puede amplificar mediante PCR que utiliza ARNm transcrito reverso de hígado. La secuencia 3'UTR de albúmina se describe en la SEQ ID NO: 1 en 1204-2077 y en la SEQ ID NO: 2 en los restos 1252-2125.

Intrón de HGH

55 Dos de las construcciones de la presente invención, TA4 y TA2, comprenden el intrón de HGH. Se sabe que el intrón de HGH aumenta la eficacia de procesamiento de ARNm y ayuda a producir cuantitativamente más ARNm. Existen muchos otros intrones, tal como beta-globina, que cumplen funciones similares en un grado variable. Sin embargo, se sabe que el intrón de HGH funciona bien y se prefiere. El intrón de HGH se puede amplificar mediante PCR a



partir del plásmido pAAV-LacZ comercialmente disponible [Stratagene, La Jolla, CA]. La secuencia también se puede amplificar fácilmente mediante PCR que utiliza ADN genómico como plantilla. La secuencia del intrón de HGH se describe en los restos 475-754 de la SEQ ID NO: 2 y en 708-987 de la SEQ ID NO: 3.

## 5 Realización del minicírculo

Opcionalmente, el vector de la presente invención está en el formato "ADN minicírculo". Este es un vector que prácticamente carece de todas las secuencias de ADN que no están relacionadas con la expresión de insulina. El vector de producción de ADN minicírculo original se obtuvo del laboratorio de Mark Kay, descrito en las siguientes publicaciones: Chen, ZY, He, CY, Ehrhardt, A and Kay, MA (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Mol Ther* 8: 495-500, y Chen ZY, He CY, Kay MA (2005) Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequence and capable of persistent transgene expression *in vivo*. *Human Gene Ther*, 16:126. Recientemente se publicó un método recientemente revisado para producir fácilmente ADN minicírculo. (Kay MA, He C, Chen Z. A robust system for production of minicircle DNA vectors. 2010. *Nature Biotech* 28,1287). El vector y *E. coli* necesarios para producir el minicírculo están disponibles comercialmente en System Biosciences (SBI), Mountain View, CA (systembio.com), y actualmente los utilizamos.

La presente invención de construcciones de expresión de insulina se ajusta al esquema de colocación generalmente aceptado y probado de diversos elementos en relación el uno con el otro. Por lo tanto, las construcciones de expresión génica de la presente invención están compuestas de potenciador de AFP - inductor condicional - promotor - intrón 1 - gen - intrón 2 - terminación/5'UTR. En nuestros Ejemplos, los GIRE son los inductores condicionales y hay un potenciador de traducción insertado después del intrón de HGH y antes del gen de insulina modificado. Después del gen de insulina, el segundo intrón para el procesamiento eficiente de ARNm proviene de albúmina seguida de la 3'UTR de albúmina.

Las figuras 4, 5 y 10 describen la colocación preferida de elementos en construcciones génicas de la presente invención.

### Método

En un aspecto, la presente invención proporciona un primer, segundo y tercer vector para uso en un método para controlar niveles de glucosa en sangre en un mamífero, en donde el método comprende las etapas de:

- tratar al mamífero con el primer, segundo o tercer vector,
- en donde el primer vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH y
- en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,
- en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y
- observar los niveles de insulina del mamífero,
- en donde los niveles de insulina del mamífero están controlados.

La presente invención proporciona además un primer, segundo o tercer vector para uso en un método para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, en donde el método comprende:

- administrar el primer, segundo o tercer vector para la síntesis de insulina regulada por glucosa en un hepatocito aislado del mamífero,
- en donde el primer vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH,
- en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ

ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,

5 en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID N°: 3, un promotor específico de hígado, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y

10 - trasplantar los hepatocitos de vuelta al mamífero,

en donde se produce la expresión de insulina regulada por glucosa.

Se podría observar los niveles de glucosa e insulina en sangre del mamífero después del tratamiento con vectores y notar que los niveles de glucosa o insulina en la sangre del mamífero son controlados y normales.

15 Para probar nuestras construcciones de expresión de insulina *ex vivo* en hepatocitos, se clonaron construcciones de insulina TA1, TA2 y TA4 en vectores de adenovirus, como se describió anteriormente (Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. Transplantation 2002; 74:1781). Los hepatocitos de rata normales recién aislados se sembraron en placas de cultivo de células recubiertas de colágeno y se transfectaron con adenovirus que contenían la construcción del gen de insulina. Entonces, estas células se expusieron a concentraciones de glucosa bajas (3,5 mM), normales (5,6 mM) y altas (27,5 mM). Se extrajeron alícuotas de medio a diversos intervalos de tiempo y la insulina presente en el medio de cultivo se cuantificó mediante ELISA. Los resultados mostraron que los hepatocitos transfectados con cada construcción de insulina produjeron insulina de manera dependiente a la concentración de glucosa (Fig. 9). A la concentración más alta de glucosa, la cantidad de producción de insulina fue 4-10 veces mayor que en la concentración más baja de glucosa.

20 Por "controlado", queremos decir que el método se caracteriza preferiblemente por un control estricto de la regulación de la glucosa. El control estricto se refiere a la observación empírica de la regulación de glucosa en sí misma. En individuos no diabéticos, la glucosa en sangre vuelve a la normalidad a las 2 horas después de la comida. Antes de la presente invención, se habría anticipado que después de la corrección de la hiperglucemia en un mamífero en respuesta a la elevación en los niveles de glucosa en sangre, el ARNm de insulina preformado permanecería por un tiempo y continuaría produciendo insulina. Dependiendo de cuánto tiempo persista tal condición, sería de esperar que el mamífero entonces se volviera hipoglucémico. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que los niveles de insulina en suero aumentaron poco después del aumento en los niveles de glucosa en sangre, como habíamos anticipado, pero los niveles de insulina no permanecieron altos durante demasiado tiempo y siguieron la curva de nivel de glucosa en sangre con un retraso de aproximadamente 15-30 min (véase Fig. 8).

25 Por lo general, la presente invención proporciona que los niveles de insulina se mantendrán dentro de 0,5  $\mu$ U-100  $\mu$ U/ml. (Esto es comparable a la cantidad máxima de insulina que se libera de islotes normales bajo exposición hiperglucémica de aproximadamente 100  $\mu$ U/ml).

30 Por lo general, la concentración de glucosa en sangre se mantendrá dentro de 80-150 mg/dl después del tratamiento. El extremo superior se refiere a un aumento temporal poco después de comer. Si la concentración de glucosa aumenta por encima de 150, el nivel no permanece en ese nivel más allá de un período corto (30-60 min).

35 La diabetes mal controlada causa hiperlipidemia y la gravedad de la hiperlipidemia depende del grado de hiperglucemia. Las pruebas de función hepática se realizan por dos razones. La diabetes grave se asocia con un grado de respuestas inflamatorias sistémicas, que incluye la elevación de los niveles séricos de algunas enzimas hepáticas. Nuestros datos proporcionan evidencia de que después de la terapia génica con insulina, es evidente una corrección en los niveles séricos de enzimas hepáticas. En segundo lugar, se sabe que el procedimiento de administración hidrodinámica causa un estrés transitorio al hígado, pero este daño es de corta duración. Nuestros datos respaldan estos hallazgos y afirman que no existe un riesgo a largo plazo asociado con terapia génica en el contexto de la función hepática. De hecho, la terapia normaliza la función hepática, como se evidencia por la producción de albúmina.

40 En una realización de la presente invención, se corrige el perfil lipídico y/o de enzimas hepáticas del animal tratado. En una realización de la presente invención, el animal tendrá un panel de lípidos/enzimas en donde la concentración de lípidos en plasma o de enzimas hepáticas es equivalente o menor que un control normal. Por "control normal" nos referimos a un animal que no es diabético. Por "panel de lípidos/enzimas" nos referimos a una medición de triglicéridos en plasma, una alanina transaminasa (AST), una aspartato transaminasa (ALT) o una medición de albúmina en plasma. En otra realización de la invención, se esperaría una caída en el colesterol (mg/dl) de al menos un 20% en comparación con un control diabético. En base en una estimación conservadora, aproximadamente 1 semana puede ser suficiente para una corrección sustancial o normalización de la hiperlipidemia.

45 El método implica el tratamiento de un mamífero, preferiblemente un paciente humano o un mamífero no humano, con los vectores de la presente invención.

La introducción de nuestras construcciones de expresión de insulina en células hepáticas se puede lograr *in vivo* o

5 *ex vivo*. En el primer método, la construcción génica se introducirá ya sea utilizando un ADN minicírculo mediante el método hidrodinámico descrito en la presente memoria, inyectando las nanopartículas de ADN minicírculo condensado como tal, o después de revestir nanopartículas con compuestos que son conocidos por dirigirse a las células hepáticas. Alternativamente, las células hepáticas se extraerán del paciente a través de una biopsia, se extenderán en cultivo celular, y se transfectarán con una construcción de la presente invención que utiliza minicírculos o vectores virales seguros tales como virus adenoasociado (AAV) (ya utilizado en muchos ensayos clínicos).

10 Las células transfectadas se probarán para determinar su capacidad de producir insulina y modular la cantidad de producción de insulina en respuesta a los cambios en las concentraciones de glucosa. Se trasplantará un número apropiado de células para proporcionar la cantidad necesaria de insulina (asistida con información de mediciones *ex vivo*) en el hígado del mamífero mediante guía radiológica y ultrasónica. El método *ex vivo* permite una menor carga de vectores así como también una administración dirigida de genes.

15 La incorporación de regiones de andamiaje/de unión a matriz (S/MAR) que sirven como anclajes constitutivamente activos para el andamiaje nuclear (Wong SP et al. *Gene Ther.* 2011; 18(1):82-7; Heng HH et al. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 7):999-1008; Lufino MM et al., *Nucleic Acids Res.* 2007;35(15):e98. PMID: 1976449) probablemente aumentará la supervivencia del minicírculo TA1 (TA1m) que contiene S/MAR (TA1m-S/MAR) u otros minicírculos debido a la asociación de SAR con el andamiaje nuclear y también pueden reducir el silenciamiento génico (Wong SP et al., *Gene Ther.* 2011;18 (1):82-7).

20 Los siguientes ejemplos describen la administración de ADN en hígado de rata mediante procedimientos hidrodinámicos (Zhang G. et al., *Methods Mol Biol* 245:251-264, 2004; Zhang G. et al., *Hum Gene Ther* 8:1763-1772, 1997). La administración del ADN al hígado de mamífero no será típicamente mediante el método hidrodinámico descrito en los Ejemplos. Se emplearán otras alternativas, tales como nanopartículas de ADN condensado que no requieren un gran volumen ni alta presión. En una realización preferida, la regulación de glucosa adecuada durará al menos 2-4 semanas después del tratamiento con las construcciones.

25 La administración venosa hidrodinámica de ADN de plásmido desnudo ha conducido a la captación y transducción génica exitosa de células hepáticas (Sebestyen MG et al. *Hum Gene Ther.* 2007; 18(3):269-85. PMID: 2268901; Wooddell CI et al. *J Gene Med.* 2008; 10(5):551- 63; Wooddell CI et al. *Hum Gene Ther.* 2011;22(7):889-903. PMID: 3135275). Este método se basa en una inyección intravenosa rápida y de gran volumen (~10% del peso corporal). Sin embargo, con la administración venosa hidrodinámica, gran parte del ADN se absorbe en el sistema venoso, particularmente en los pulmones, antes de su distribución al hígado. Como alternativa, se pueden inyectar los vectores en el sistema arterial, tal como la arteria femoral, que tiene una presión arterial sistólica de aproximadamente 120 mm/Hg. El vector restante llegará al hígado a través de la vena porta a 10-12 cm•H<sub>2</sub>O. (La presión sanguínea generalmente se presenta en mm de mercurio (mm/Hg). La presión arterial venosa es menor y algunas veces se utiliza una unidad basada en cm de agua (cm/H<sub>2</sub>O). En general, la inyección intraarterial debería mejorar en gran medida la captación de construcciones TA1m en comparación con la administración venosa hidrodinámica.

30 La inyección en la arteria femoral debería aumentar drásticamente la captación hepática del vector y la transducción de hepatocitos. Se espera que los animales tratados mantengan la normoglucemia durante más de 1 mes, incluso cuando se alimentan *ad libitum*.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de construcciones

35 Se generaron construcciones génicas basadas en insulina humana que contienen diversos elementos para modular la expresión con el objetivo de producir insulina biológicamente activa en respuesta a cambios en los niveles de glucosa.

Cuatro construcciones de insulina designadas TA1, TA2, TA3 y TA4 contienen varios elementos en el orden que se muestra a continuación:

	Potenciador de AFP	3GIRE	Promotor de Alb	Intrón de HGH	Insulina humana	3'-UTR de Alb
TA1	Y	Y	Y	N	Y	Y
TA2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
TA3	N	Y	Y	N	Y	Y
TA4	N	Y	Y	Y	Y	Y

Potenciador de AFP: El potenciador de alfafetoproteína se utilizó a partir del vector pMIR0375 de Mirus.

- 5 3GIRE: Las 3 unidades de elementos reguladores inducibles por glucosa están conectados en tándem; las secuencias se basan en que S14. S14 es un potenciador transcripcional sensible a glucosa. Los elementos responsables de la mejora transcripcional dependiente de glucosa se han identificado en el trabajo publicado: Shih H, Towle HC. Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene: Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 9380.
- 10 Promotor de Alb: El promotor de albúmina (el promotor de albúmina se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico de rata, como se describe en la patente de EE.UU. 6.352.857, la patente de EE.UU. 6.933.133, la patente de EE.UU. 7.425.443 y en la siguiente publicación: Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation* 2002; 74:1781).
- 15 Intrón de HGH: El intrón de la hormona de crecimiento humana se amplificó mediante PCR a partir de un plásmido pAAV-LacZ comercialmente disponible (Stratagene).
- Insulina humana: La secuencia de ADNc de insulina humana se modificó en la unión B-C y C-A para la compatibilidad de escisión de furina, de modo que las células hepáticas pueden procesar la preproinsulina a insulina funcional.
- 3'-UTR de Alb: La región 3' no traducida de albúmina se utilizó a partir del vector pMIR0375 de Mirus. También se puede amplificar mediante PCR que utiliza ARNm transcrito reverso del hígado.
- 20 Las construcciones de expresión de insulina descritas anteriormente se incorporaron en adenovirus con replicación defectuosa para expresión transitoria con fines de prueba inicial. La expresión de insulina en hepatocitos de rata, *ex vivo*, era sensible a glucosa y cada construcción producía una cantidad de insulina significativamente mayor (mejora de 4 a 12 veces con respecto a las construcciones descritas previamente), Alam & Sollinger, *Transplantation*. 2002 Dec 27; 74(12):1781-7.
- TA2 y TA3 también se probaron en la producción de insulina *ex vivo*. (Véase Fig. 9).
- 25 Inicialmente, incorporamos TA1 en un vector de adenovirus para probar su capacidad para controlar la hiperglucemia en ratas que se volvieron diabéticas mediante tratamiento con estreptozotocina (STZ). Los resultados mostraron que tal tratamiento corrigió completamente la hiperglucemia en ayunas, restauró la pérdida de peso causada por diabetes a una velocidad normal de aumento de peso y redujo significativamente la hiperglucemia postprandial.
- 30 Los vectores de adenovirus que contienen TA1-TA4 se probaron individualmente por su capacidad para corregir la hiperglucemia diabética en ratas STZ. Los resultados mostraron una corrección completa de la hiperglucemia en ayunas y una corrección parcial de la hiperglucemia postprandial. El beneficio de un solo tratamiento de terapia génica sobre el metabolismo general y la prevención de la pérdida de peso corporal duró mucho más allá del momento de la corrección completa de la hiperglucemia en ayunas. Durante el período de corrección completa de hiperglucemia en ayunas, la velocidad de aumento de peso en ratas diabéticas tratadas con nuestras construcciones génicas de insulina fue indistinguible de los controles normales.
- 35 Para mejorar la eficacia de la terapia génica a través de una mejor expresión génica mediante el aumento de niveles y duración de la expresión de insulina, se produjeron minicírculos de ADN que contenían solo las construcciones de expresión génica. Todas las construcciones de expresión génica de insulina anteriores se clonaron en un vector plasmídico p2φC31 como se describió previamente (Chen et al., 2003, *Mol Ther*, 8, 495-500; Chen et al., 2005, *Human Gene Ther*, 16, 126-131). Este método publicado de Chen et al. se modificó sustancialmente para mejorar la pureza del ADN minicírculo como se describe a continuación.
- 40 Estimulados por los resultados de la expresión transitoria proporcionada por el vector de adenovirus, generamos un vector plasmídico, conocido como "ADN minicírculo", que está virtualmente desprovisto de todas las secuencias de ADN que no están relacionadas con la expresión de insulina. El minicírculo TA1 se introdujo en el hígado de ratas a través de un procedimiento hidrodinámico establecido (Zhang G. et al., *Methods Mol Biol* 245:251-264, 2004; Zhang G. et al., *Hum Gene Ther* 8:1763- 1772, 1997). Los resultados obtenidos a partir de ratas diabéticas STZ tratadas con ADN minicírculo TA1 muestran una corrección completa de la hiperglucemia entre animales alimentados *ad lib* (Fig. 1) además de restaurar la velocidad de ganancia de peso a normal (Fig. 2) y corregir la hiperglucemia en ayunas.
- 45 Las ratas diabéticas tratadas con minicírculo TA1 se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa mediante inyecciones intraperitoneales de 4 mg/kg de glucosa. Los resultados de estos experimentos tuvieron una marcada similitud con las observaciones de ratas control normales. El pico máximo de niveles de glucosa en sangre apareció a los 15 min después de la inyección y la hiperglucemia se dispó en aproximadamente 60 minutos (Fig. 8). El tiempo para corregir la hiperglucemia inducida por la inyección IP de glucosa de 4 mg/kg es similar a los animales normales.
- 50 Un aumento de la producción de insulina en respuesta a los niveles elevados de glucosa sigue de cerca el aumento en los niveles de glucosa y la producción de insulina disminuye a medida que el nivel de glucosa se reduce progresivamente.
- 55

5 Para confirmar que la producción de insulina era glucosa dependiente, medimos los niveles de insulina humana en plasma a intervalos de tiempo de 30 minutos y descubrimos que los niveles de insulina humana alcanzaron el máximo a los 30 minutos y disminuyeron relativamente rápido, siguiendo esencialmente el perfil de glucosa en sangre con un retraso de 15 minutos. Por lo tanto, hubo un retraso de aproximadamente 15 minutos entre los perfiles de glucosa en sangre y los niveles de insulina.

10 Dada la naturaleza de la transcripción inducida por glucosa del ARNm de insulina que da lugar a la insulina circulante, después de lograr la euglucemia, la presencia continua de ARNm de insulina pudo haber causado una secreción sostenida de niveles altos de insulina hasta que el ARNm se degradase. La reducción en los niveles de insulina en solo ~ 60 minutos a los niveles observados en animales en ayunas antes de las inyecciones de glucosa, es un resultado inesperado, aunque muy deseable.

15 Las modificaciones al método de producción de ADN minicírculo publicado fueron útiles y necesarias para obtener ADN minicírculo puro que estaba libre de ADN minicírculo no procesado o parcialmente procesado detectable. Estas modificaciones implicaron la eliminación de una etapa de incubación de 2 h, que se reivindica como necesaria para la digestión *in vivo* del ADN círculo que consiste en que las secuencias innecesarias del plásmido parental se eliminaron del minicírculo que contiene el gen de interés. En la práctica, esta etapa fue solo parcialmente efectiva.

20 En nuestro procedimiento, la eliminación de esta etapa de incubación de 2 horas no provocó ningún cambio perceptible en la calidad o cantidad de ADN recuperado y el producto final estaba compuesto por una mezcla de ADN minicírculo y el ADN plasmídico no procesado parental así como el ADN plasmídico parcialmente procesado. La mezcla de ADN así producida se trató, *ex vivo*, con una enzima de restricción que podía cortar el plásmido parental pero no el ADN minicírculo que contiene nuestras construcciones génicas de insulina. El producto de esta reacción se purificó mediante equilibrio en gradiente de densidad de CsCl para separar el ADN circular del ADN lineal.

25 El ADN minicírculo de insulina TA1 se probó por su capacidad para corregir la hiperglucemia diabética en ratas diabéticas tratadas con STZ. Los grupos de ratas se volvieron diabéticos mediante inyecciones intravenosas de estreptozotocina (100 mg/kg). Se inyectó ADN minicírculo de insulina TA1 a través de la vena de la cola en ratas diabéticas según un método previamente publicado (método de administración hidrodinámico descrito por J. Wolff group, Zhang G. et al., *Methods Mol Biol* 245:251-264, 2004; Zhang G. et al., *Hum Gene Ther* 8:1763-1772, 1997). Se inyectaron cuatro grupos de ratas diabéticas con cantidades indicadas de ADN minicírculo TA1 (1,0 µg, 0,75 µg, 30 0,5 µg y 0,025 µg por g de peso corporal). Los resultados se muestran en las Fig. 1, 2 y 3.

Esta es la primera vez que hemos podido corregir completamente los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas alimentadas *ad libitum* (Fig. 2) mediante terapia génica con insulina. Este tratamiento restableció completamente la velocidad de aumento de peso en ratas diabéticas (Fig. 3).

#### Ejemplo 2: Creación de construcciones de adenovirus

35 En referencia a la Fig. 12, se crearon construcciones de insulina TA1 y TA4 en adenovirus y en unidades formadoras de placa iguales inyectadas en hígados de rata, como se indica. TA1 y TA4 se utilizaron bajo condiciones idénticas. Ambos pudieron corregir completamente la hiperglucemia en ayunas, como se muestra en la figura 12. Sin embargo, los vectores no corrigieron completamente los niveles de glucosa en sangre en ratas alimentadas *ad libitum*.

40 En referencia a la Fig. 13, se inyectó TA1 en adenovirus en hígados de rata como se indica. Obsérvese que las ratas tratadas con TA1 recuperaron el peso inicialmente perdido debido a la diabetes y mantuvieron un peso mayor que las ratas diabéticas STZ.

45 En referencia a la Fig. 14, se inyectó TA1 o TA4 en adenovirus en hígados de grupos de ratas diabéticas, como se indica. Obsérvese que tanto las ratas tratadas con TA1 como las ratas tratadas con TA4 habían mantenido un peso corporal mayor que las ratas diabéticas STZ. La figura 14 muestra un subconjunto de puntos de datos de la Fig. 13, que representa 0-48 días. La información sobre la velocidad de ganancia de peso en varios grupos de ratas (se muestra en el cuadro añadido en la esquina superior izquierda) se deriva de los datos obtenidos 24 días después del tratamiento (d8-d31). La velocidad de ganancia de peso en ratas diabéticas tratadas con TA1 en adenovirus es igual a las ratas control normales, mientras que las ratas diabéticas no tratadas experimentaron una pérdida neta de peso sobre una base diaria. La Fig. 13 tiene muchos más puntos de datos, y los primeros días ocupan solo una pequeña porción del área, y por lo tanto el grado de corrección en el aumento de peso puede ser algo difícil de apreciar. La Fig. 14 muestra este aspecto más claramente.

#### Ejemplo 3: Evaluación de insulina humana en suero de ratas diabéticas

55 En referencia a la Fig. 15, una comparación de insulina humana en suero de rata muestra que los animales tratados con ADN minicírculo TA1 producen mayores cantidades de insulina en comparación con otros vectores plasmídicos (pTED110, TA1/pENTR). El plásmido pENTR contiene un gen de resistencia a la ampicilina que ha sido reemplazado por un gen de resistencia a kanamicina en pTED110, y también se le ha añadido S/MAR; ambos tienen la construcción de insulina TA1. El minicírculo TA1 que contiene S/MAR produjo la mayor cantidad de insulina *in vivo*. El ELISA de insulina humana ultrasensible (Mercodia, Inc) tiene un límite de detección de 0,15-20 mU/L, según

lo publicado. La tabla en la Fig. 15 muestra la efectividad relativa *in vivo* de diversos vectores utilizados para la terapia génica con insulina. Todos los vectores de insulina contenían el casete de expresión TA1. pENTR es un plásmido comercial que contiene un gen de resistencia a ampicilina. El pTED es nuestro plásmido modificado donde reemplazamos el gen de resistencia a ampicilina con el gen de resistencia a kanamicina para aumentar la supervivencia *in vivo* del vector en células que no se dividen.

También agregamos S/MAR a pTED110 para aumentar la supervivencia del vector en células en división y, hasta cierto punto, aumentar la expresión general. Los datos están de acuerdo con nuestras expectativas de diseño de vectores.

Finalmente, cuando se eliminaron secuencias extrañas y se utilizaron construcciones génicas de insulina como moléculas de ADN minicírculo, los niveles de expresión de insulina aumentaron significativamente, más aún cuando se incluyó S/MAR en el minicírculo. En los cuatro conjuntos de experimentos, la equivalencia molar de TA1 se mantuvo en un nivel constante.

La tabla (Fig. 15) junto con los datos obtenidos de la transducción mediada por adenovirus *ex vivo* (Fig. 9) e *in vivo* (Fig. 12 y Fig. 13, Fig. 14 y Fig. 17) proporciona la prueba de que los casetes de expresión de insulina pueden producir insulina dependiente de glucosa, según lo previsto. Sin embargo, la magnitud y longevidad de la expresión de insulina depende del vector empleado para administrar los casetes de expresión de insulina. Esperamos que estos casetes de expresión de insulina sean fácilmente adaptables para aprovechar los nuevos vectores desarrollados para tener mejores características para la terapia génica, tal como la facilidad de administración, el nivel de expresión y la longevidad de expresión.

Ejemplo 4: Segundo tratamiento con TA1M

En referencia a la Fig. 16, un segundo tratamiento con ADN minicírculo TA1 corrige gradualmente la elevación de la glucosa en sangre en ayunas a un nivel normal.

La Fig. 1 describe datos que son relevantes para la información presentada en la Fig. 16. Como la información en dos figuras proviene de diferentes estudios, los puntos de datos individuales no son idénticos, pero la tendencia es la misma. Se debe hacer referencia a la curva correspondiente al uso de 1,0 µg/g de ADN minicírculo TA1 en la Fig. 1 para la comparación. La Fig. 16 muestra que parece posible corregir la hiperglucemia mediante un segundo tratamiento a medida que disminuye el efecto del primer tratamiento.

Ejemplo 5: Hepatocitos derivados de células madre humanas

En referencia a la Fig. 17, los hepatocitos se derivaron de células madre embrionarias humanas (hES) y de células pluripotentes inducidas por adultos humanos (iPS) como se describe en Si-Tayeb et al 2010. Hepatology 51(1):297-305. PMID: 2946078 y se transdujeron con TA1 en adenovirus, *ex vivo*. Se mantuvieron tres placas de cultivo celular en medio con glucosa baja (3,5 mM) y se mantuvieron tres placas con glucosa alta (27,5 mM). Los hepatocitos de rata normales recién preparados se trataron de manera similar. Los matraces que contenían hepatocitos derivados de células madre eran confluentes con las células, mientras que las placas de hepatocitos de rata primarios eran ~ 60% confluentes.

Los resultados (Fig. 17) muestran una producción robusta de insulina dependiente de glucosa en hepatocitos derivados de células pluripotentes embrionarias e inducidas.

Ejemplo 6: Examen del peso de la rata después del tratamiento con vectores minicírculo.

En referencia a la Figura 18, los grupos de ratas diabéticas (número mínimo de ratas en un grupo = 5) se inyectaron con el ADN minicírculo de insulina indicado, TA1, TA2 o TA3, a través de las venas de la cola. Se muestran los pesos corporales en ayunas (Mean ± S.D) de las ratas. La normalización en la velocidad de ganancia de peso es similar cuando se utilizó TA1m o TA2m, mientras que TA3m fue menos efectiva.

Ejemplo 7: Evaluación de perfiles lipídicos

Dos grupos de ratas se volvieron diabéticos mediante tratamiento con estreptozotocina intravenosa. Un grupo de ratas diabéticas (n = 5) se trató con 1 µg de ADN minicírculo TA1/g de peso corporal de animal. El segundo grupo de ratas diabéticas se utilizó como control no tratado. Un tercer grupo de ratas normales se incluyó como controles sanos emparejados por edad. Se extrajo sangre de cada animal experimental después de 10 días, y se analizaron los contenidos lipídicos en plasma y diversos marcadores de daño hepático y función hepática, como se muestra en la tabla a continuación:

Grupos de animales	Triglicéridos (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	Aspartato transaminasa (U/L)	Alanina transaminasa (U/L)	Fosfatasa alcalina (U/L)	Albúmina plasmática (g/dl)
Tratados con TA1m	53 ± 34	141 ± 15	302 ± 33	77 ± 40	210 ± 95	3,4 ± 0,2
Diabéticos	704 ± 313	191 ± 36	617 ± 349	152 ± 75	423 ± 73	2,5 ± 0,2
Control normal	100 ± 14	129 ± 6	504 ± 100	106 ± 16	172 ± 55	3,4 ± 0,1

5 El tratamiento con TA1m corrigió todas las deficiencias causadas por la diabetes no controlada. Por lo tanto, los niveles de colesterol y triglicéridos en el plasma de ratas tratadas se invirtieron a niveles normales. Del mismo modo, los marcadores de la función hepática mostraron una mejoría y los niveles de albúmina reducidos en las ratas diabéticas volvieron a la normalidad.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para obtener expresión de insulina regulada por glucosa *ex vivo* en hepatocitos de un mamífero, en donde el método comprende administrar un primer, segundo o tercer vector genético para la síntesis de insulina regulada por glucosa en un hepatocito aislado,
- 5 en donde el primer vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH,
- 10 en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,
- 15 en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y
- en donde se produce la expresión de insulina regulada por glucosa.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el vector genético se administra exponiendo las células a un virus infeccioso para las células, en donde el virus comprende la construcción genética, y por medio del cual al menos una porción de las células se infectan mediante los virus bajo condiciones adecuadas y a una multiplicidad suficiente.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 en donde:
- (a) el mamífero es humano; o
- 25 (b) la insulina es insulina humana.
4. Un vector adecuado para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, en donde el vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH o
- 30 en donde el vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor o
- 35 en donde el vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina humana con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor.
5. El vector de la reivindicación 4 en donde:
- (a) el promotor es un promotor de albúmina; o
- 40 (b) la insulina es insulina humana.
6. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, en donde el método comprende las etapas de:
- tratar el mamífero con el primer, segundo o tercer vector,
- 45 en donde el primer vector comprende un potenciador de promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón HGH y
- 50 en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,



- 5 en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y
- observar los niveles de insulina del mamífero,
- en donde los niveles de insulina del mamífero están controlados.
7. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método para controlar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, en donde el método comprende:
- 10 - administrar el primer, segundo o tercer vector para la síntesis de insulina regulada por glucosa en un hepatocito aislado del mamífero,
- 15 en donde el primer vector comprende un potenciador del promotor, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 707-870 de la SEQ ID NO: 1, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un intrón de HGH,
- en donde el segundo vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un promotor específico de hígado, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 755-918 de la SEQ ID NO: 2, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados y una 3'UTR de albúmina y carece de un potenciador de promotor,
- 20 en donde el tercer vector comprende un intrón de HGH, 1-5 elementos reguladores inducibles por glucosa, un potenciador de traducción de VEGF que comprende los restos 988-1151 de la SEQ ID NO: 3, un promotor específico de hígado, un gen que codifica insulina con sitios de peptidasa modificados, una 3'UTR de albúmina y un potenciador de promotor, y
- trasplantar los hepatocitos de vuelta al mamífero,
- 25 en donde se produce la expresión de insulina regulada por glucosa.
8. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 6 ó 7, en donde el vector está en un formato minicírculo.
9. Un primer, segundo, o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 6 ó 7, en donde el mamífero es humano.
- 30 10. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 9, en donde la insulina es insulina humana.
11. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 6 ó 7, en donde el nivel de colesterol del mamífero disminuye después del tratamiento.
- 35 12. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 6 ó 7 en donde el nivel de triglicéridos del mamífero disminuye después del tratamiento.
13. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 6 ó 7, en donde el mamífero se selecciona del grupo que consiste en perros, gatos, hámsteres, jerbos, ratas, ratones, conejos, cobayas, chinchillas y hurones.
- 40 14. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 6 ó 7, en donde el mamífero es un mamífero no humano.
15. Un primer, segundo o tercer vector para uso en un método según la reivindicación 6 ó 7, en donde el paciente tiene una disminución en el nivel en plasma de un compuesto seleccionado del grupo de AST, ALT y fosfatasa alcalina después del tratamiento.

Efecto del tratamiento con minicirculo TA1 en la glucosa en sangre en ayunas  
 Dosis de minicirculo TA1: 1,0 µg/gm, 0,75 µg/gm, y 0,25 µg/gm

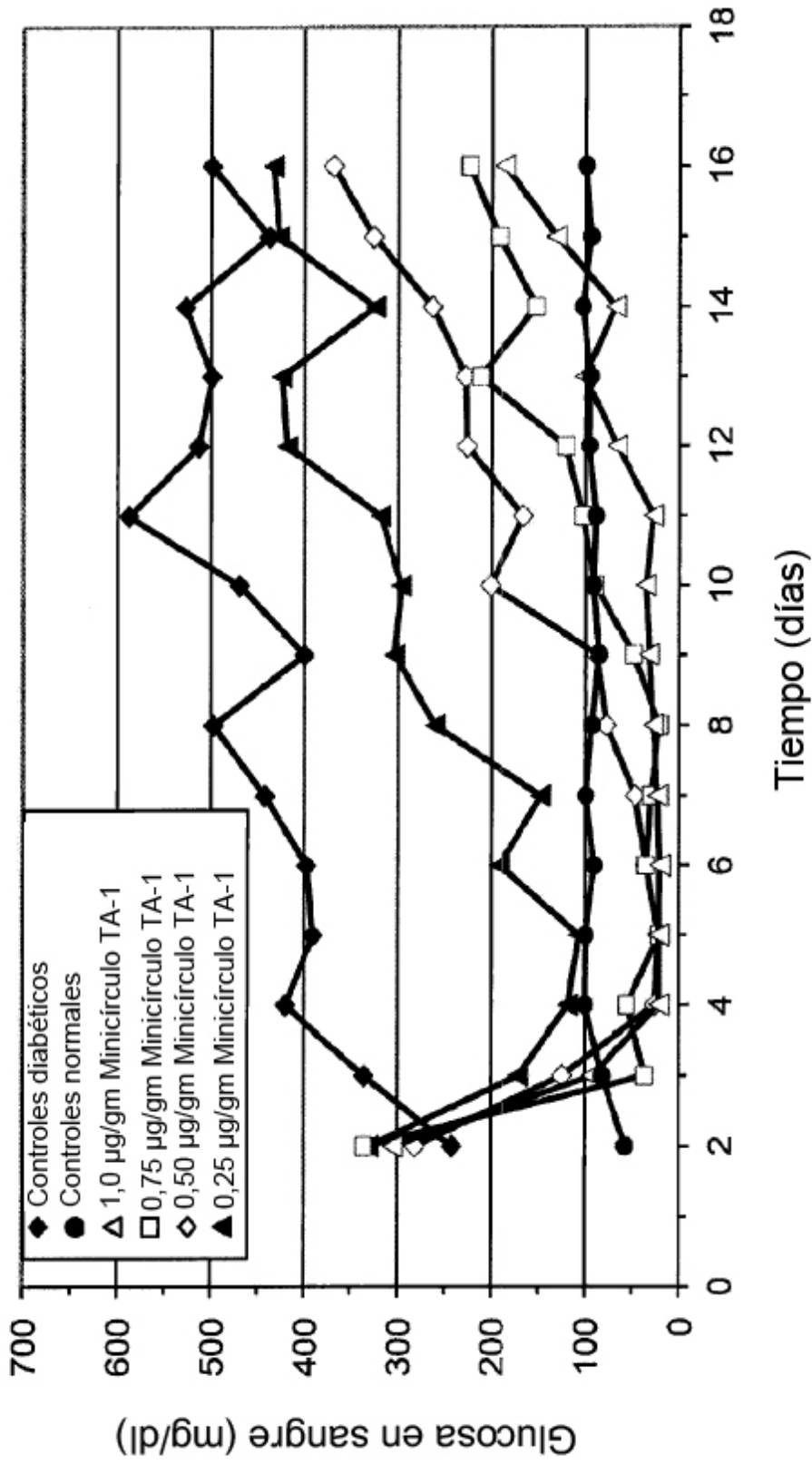


Figura 1

Efecto del tratamiento con minicirculo TA1 en glucosa en sangre de alimentadas ad libitum  
 Dosis de minicirculo TA1: 1,0 µg/gm, 0,75 µg/gm, 0,50 µg/gm, 0,25 µg/gm

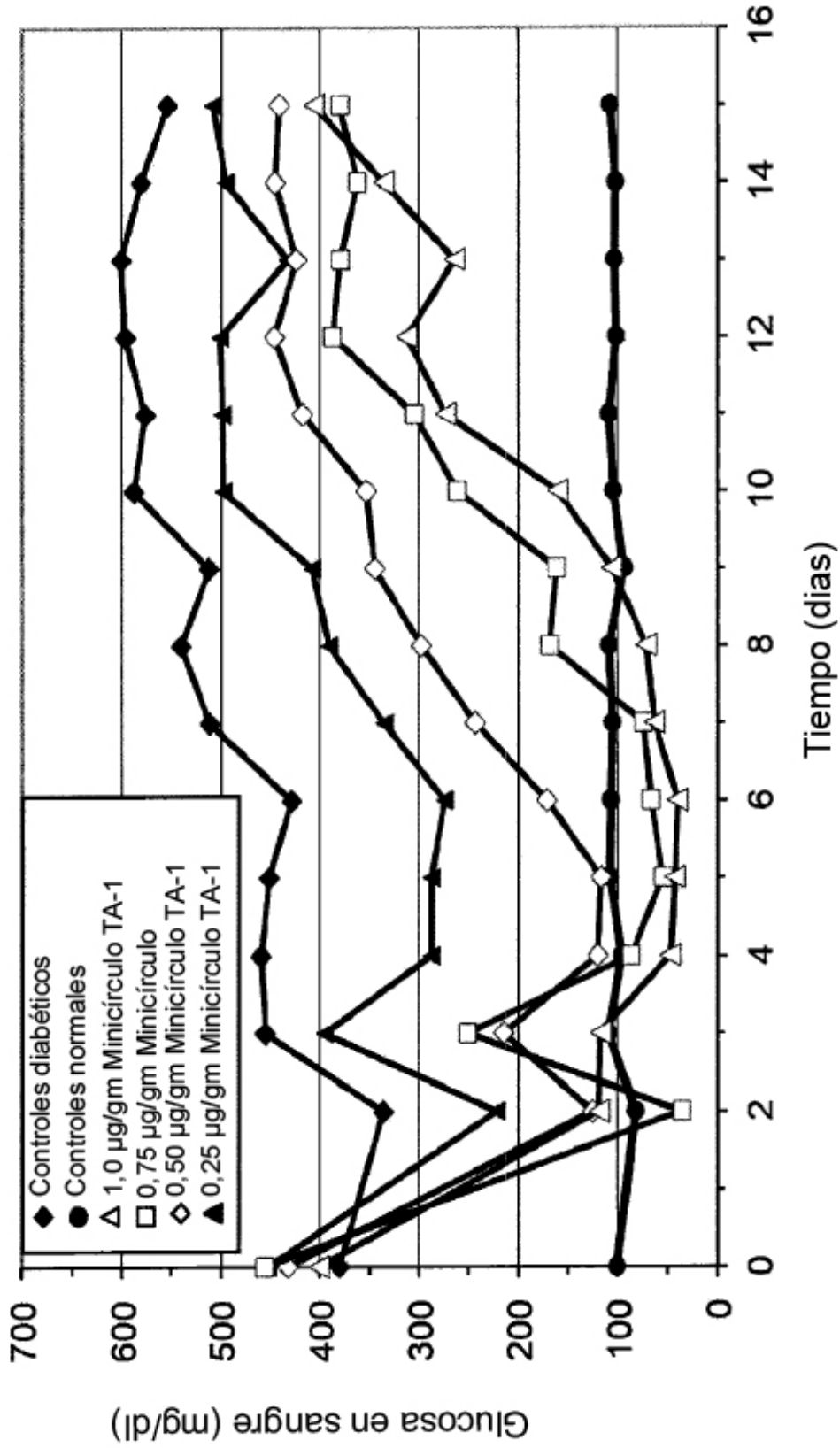


Figura 2

Efecto del tratamiento con Minicirculo TA1 sobre el peso corporal en ayunas  
 Dosis de minicirculo TA1: 1,0 µg/gm, 0,75 µg/gm, 0,5 µg/gm, y 0,25 µg/gm,

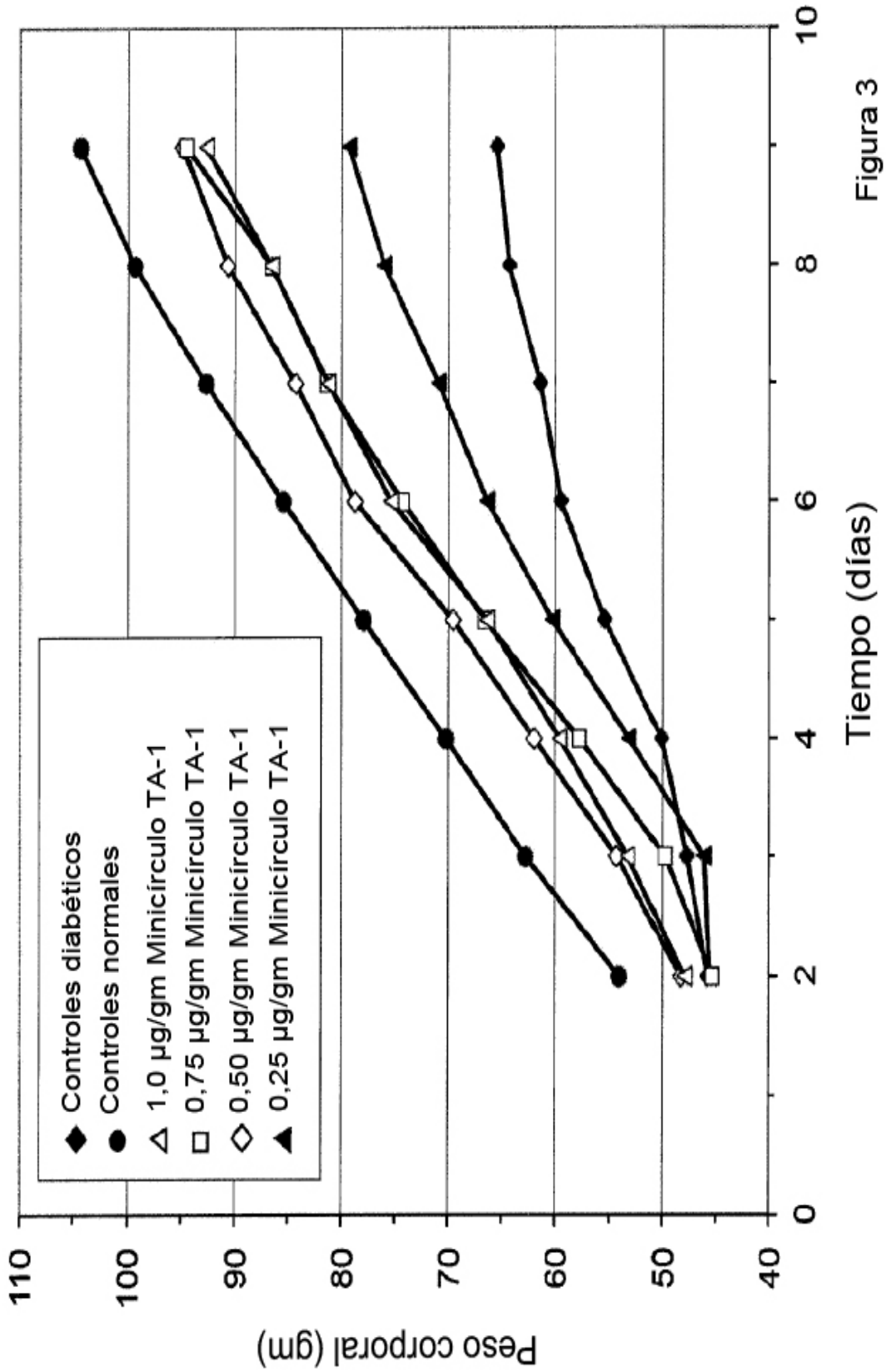


Figura 3

**Casete de expresión TA1 (1 – 2067)**

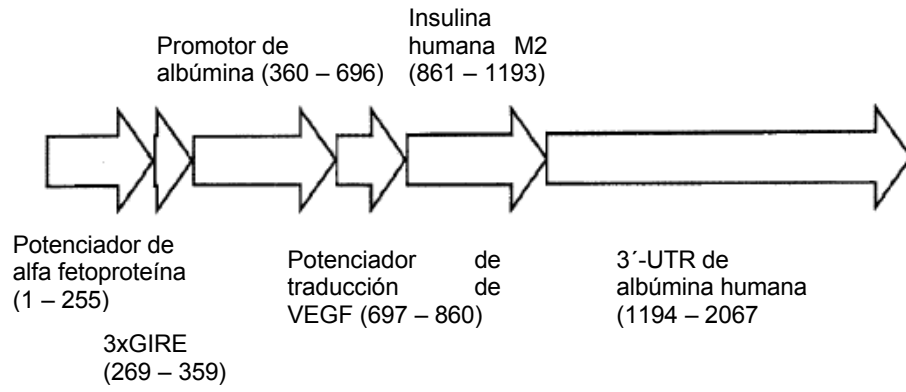


Figura 4

**Casete de expresión TA4 (1 – 2115)**

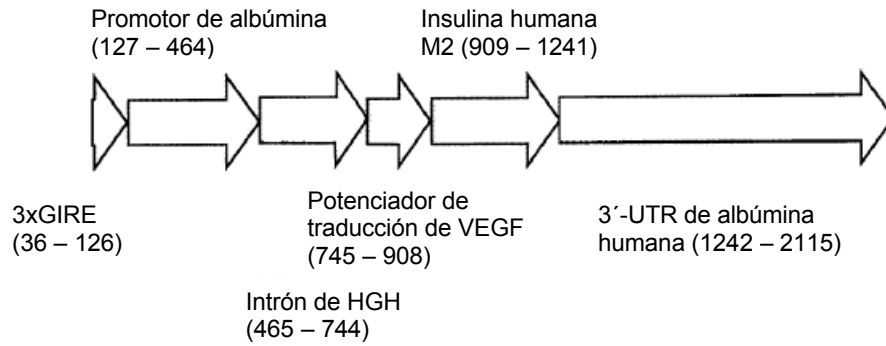


Figura 5

Casete de expresión TA1 (SEQ ID NO: 1)

CCGCCCCCTTCACCAAGATCTTTTTGATGGCAGAGTTCAGTTTACCGGGTCACATTGTACCTGGGAAGATT  
 CAAGGATTTATGGAAAAAGTCAACAACAGGAGTCAGAGCAGCCGGAAAAGCATGGACTCTGTACTTAGGAC  
 TGCCTTTGAGCAATGGCACAGCAAGCTTTAACCCCTGTTGTCAGTCAGCACACAAACTGTGGTTCAAAGCT  
 CCACTTTATCTCTTCTGTGGAAATTCagatatcagatcagtttaaAccttgcGGCCGCCAGTTCTCACGTG  
 GTGGCCACGTGCTTGGGCACGCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACGAATTCAGTTCTCAC  
 GTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACCTctagtgtcctcaaatgggagacaaagagattaagctctTatgtaaaatt:  
 tgctgttttacataactttaatgaatggacaaagtcttgTgcatgggggtgggggtgggggttagaggggaa  
 cagctccagatggcaaacatacgcgaagggatttagtcaacaacttttggcaagatggatgattTgt  
 aatggggtaggaaccaatgaaatgcgaggttaagtatggtaataatcTacagttattgggtaagaagat:  
 attagagcgagtcttctgacacagAtcaccttccatcaacccccactagcctctggcaaaaggtacCagc  
 gcagaGcttggggcagccgagcggcagccaggccccggccgggctcggttccAgaagggagaggagcc  
 cgccaaggcgcgcaagagagcgggtgcctcgcaGtccgagccggagagggagcgcgagccgcgcggccc  
 cggacggcctccgaaaccATGGCCCTGTGGATGGCCCTCCTGCCCTGCTGGCCCTGCTGGCCCTCTGGGG  
 ACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAAGCTCTCTACCTAG  
 TGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAGGACCaagGGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCAG  
 GTGGAGCTGGGCGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCGGCAGAGCG  
 TGGCATTGTGGAACCAATGCTGTACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAGACGC  
 AGCCTGCAGGCAGCGTCGAGTAACATCACATTTAAAAGCATCTCAGGTAACATATATTTGAATTTTTTAAA  
 AAAGTAACTATAATAGTTATTTATTTAAAATAGCAAAGATTGACCATTTCCAAGAGCCATATAGACCAGCACC  
 GACCACTATTCTAAACTATTTATGTATGTAAATATTAGCTTTTAAAATTCTCAAATAGTTGCTGAGTTGG  
 GAACCATAATTTCTATCGATTCAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTGTTTTCACTGGTGT  
 AATTGCAGAAAGATGATCTAAGTAATTTGGCATTATTTTAAATAGGTTTGAAAAACACATGCCATTTTACA  
 AATAAGACTTATATTTGTCCTTTTGTPTTTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAA  
 AGCTTATTCATCTGTTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTT  
 AATCATTTTGCCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGTGGTACAGCA  
 CTGTTATTTTTCAAAGATGTGTGCTATCCTGAAAATTCTGTAGGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTCTCTC  
 TTATCCACTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTTGTGGGCTAATTAATAAATCATTAACTCTTCTAAG  
 TTATGGATTATAAACATTCAAAATAATTTTTGACATTATGATAATTCTGAATAAAAGAACAAAACCATG  
 GTATAGGTAAGGAATATAAACATGGCTTTTACCTTAGAAAAACAATTCTAAAATTCATATGGAATCAA  
 AAAGAGCCTGCAAGGGTG

Potenciador de alfa fetoproteína: AAGAT...ttgc

Figura 6

GIRE: **CACGTGGTGGC...CACGTG**

Promotor de albúmina: **ctcaaa...ggtacc**

Potenciador de traducción de VEGF: Cag...aaacc

Secuencia de codificación del gen de insulina humana con mutaciones para compatibilidad con furina  
**ATG...TAG**

Región 3' no traducida de albúmina humana: secuencia detrás del codón final: **TAG**

Figura 6: continuación)



Casete de expresión TA4 (SEQ ID NO: 2)

CCGCCCCCTTcaaccCATGGCTCGACAGATCgcGGCCGCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCAC  
 GCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACGAATTCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGG  
 CACTctagtgctcaaatgggagacaaagagattaagctctTatgtaaaatttgctgttttacataacttta  
 atgaatggacaaagtcttgTgcatgggggtgggggtgggggttagaggggaacagctccagatggcaaacat  
 acgcaagggatttagtcaacaacttttggcaagatggatgattTgtaatggggtaggaaccaatga  
 aatgqgagqtaagtatggttaataatcTacaqttattgggttaaagaagtatattagagcgagctcttctgc  
 acacagAtcaccttctatcaacccactagcctctggcaaaggtaccTTCGAACAGGTAAGCGCCCTAA  
 AATCCCTTTGGCACAATGTGTCCTGAGGGGAGAGGCAGCGACCTGTAGATGGGACGGGGGCACTAACCTC  
 AGGGTTTGGGGTTCTGAATGTGAGTATCGCCATCTAAGCCAGTATTTGGCCAATCTCAGAAAAGCTCCTGG  
 CTCCTGGAGGATGGAGAGAGAAAAACAAACAGCTCCTGGAGCAGGGAGAGTGTGGCCCTCTTGCTCTCCG  
 GCTCCCTCTGTTGCCCTCTGGTTTCTCCCGAGTTCGAAGgtaccagcgcagaGgcttggggcagccgagc  
 ggcagccaggccccggccccggcctcggttccAgaagggagaggagcccgcgaaggcgcgcaagagagcgg  
 gctgcctcgcaGtccgagccggagaggagcgcgagccgccccggacggcctccgaaaccATGGC  
 CCTGTGGATGCGCTCCTGCCCCCTGCTGGCCCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGAGCCTTTG  
 TGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTC  
 TACACACCCAGGACCagCGGGAGGCAGAGACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGG  
 TGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCGGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTA  
 CCAGCATCTGCTCCTCTACCGCTGGAGAACTACTGCAACTAGACGCAGCCTGCAGGCAGCGTCGAGTAA  
 CATCACATTTAAAAGCATCTCAGGTAACATAATTTTGAATTTTTTAAAAAAGTAACTATAATAGTTATTAT  
 TAAAATAGCAAAGATTGACCATTTCCAAGAGCCATATAGACCAGCACCGACCACTATTCTAAACTATTTAT  
 GTATGTAATATTAGCTTTTAAAATTTCAAATAGTTGCTGAGTTGGGAACCACTATTATTCTATCGAT  
 TCAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTGTTTTCACTGGTGTAAATGCAGAAAGATGATCTAAGT  
 AATTTGGCATTATTTTAAATAGTTTGA AAAACACATGCCATTTTACAAATAAGACTTATATTTGTCCCTT  
 TGTTTTTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAAGCTTATTCATCTGTTTTTCTTT  
 TTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCTGTCTAAAAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTGCCCTCTTTCTCTG  
 TGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACTAATAGAGTGGTACAGCACTGTTATTTTCAAAGATGTGTT  
 GCTATCCTGAAAATTTCTGTAGGTTCTGTGGAAGTTCAGTGTCTCTCTTATTCCACTTCGGTAGAGGATT  
 TCTAGTTTCTTGTGGGCTAATTAATAAATCATTAACTCTTCTAAGTTATGGATTATAAACATTCAAAA  
 TAATATTTTGACATTATGATAATCTGAATAAAAAGAACAAAAACCATGGTATAGGTAAGGAATATAAAACA  
 TGGCTTTTACCTTAGAAAAACAATTTAAAATTCATATGGAATCAAAAAAGAGCCTGCaAGGGTG

Figura 7

GIRE: **CACGTGGTGGC...CACGTG**

Promotor de albúmina: **ctcaaa...ggtacc**

Intrón de hormona de crecimiento humano: TTCG...ggtac

Potenciador de traducción de VEGF: Cag...aaacc

Secuencia de codificación del gen de insulina humana con mutaciones para compatibilidad con furina: **ATG...TAG**

Región 3' no traducida de albúmina humana: secuencia detrás del codón final: **TAG**

Figura 7 (continuación)

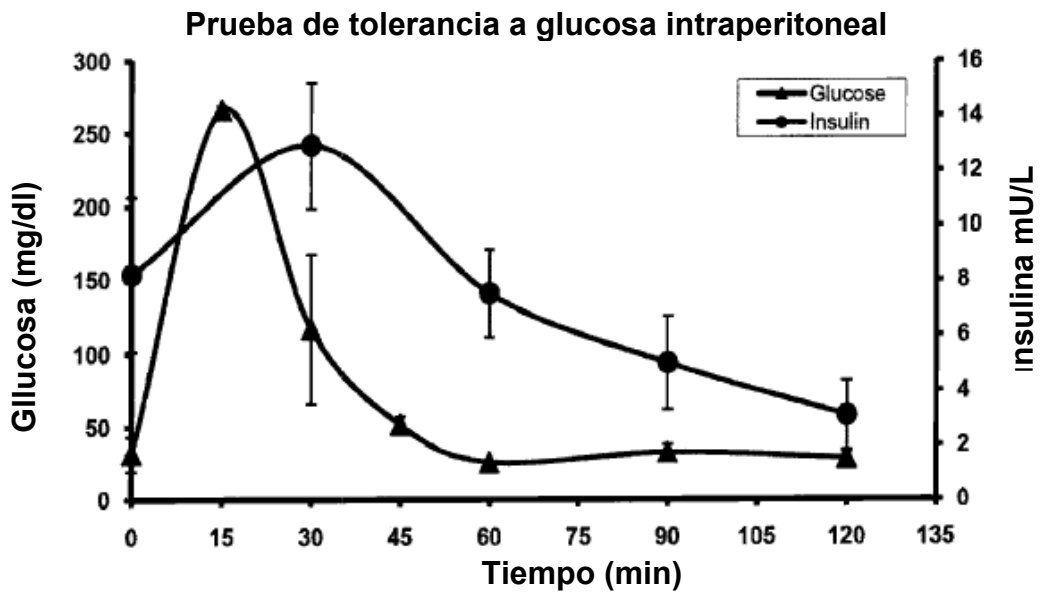


Figura 8

# Producción de insulina ex vivo en hepatocitos mediante varias construcciones génicas de insulina

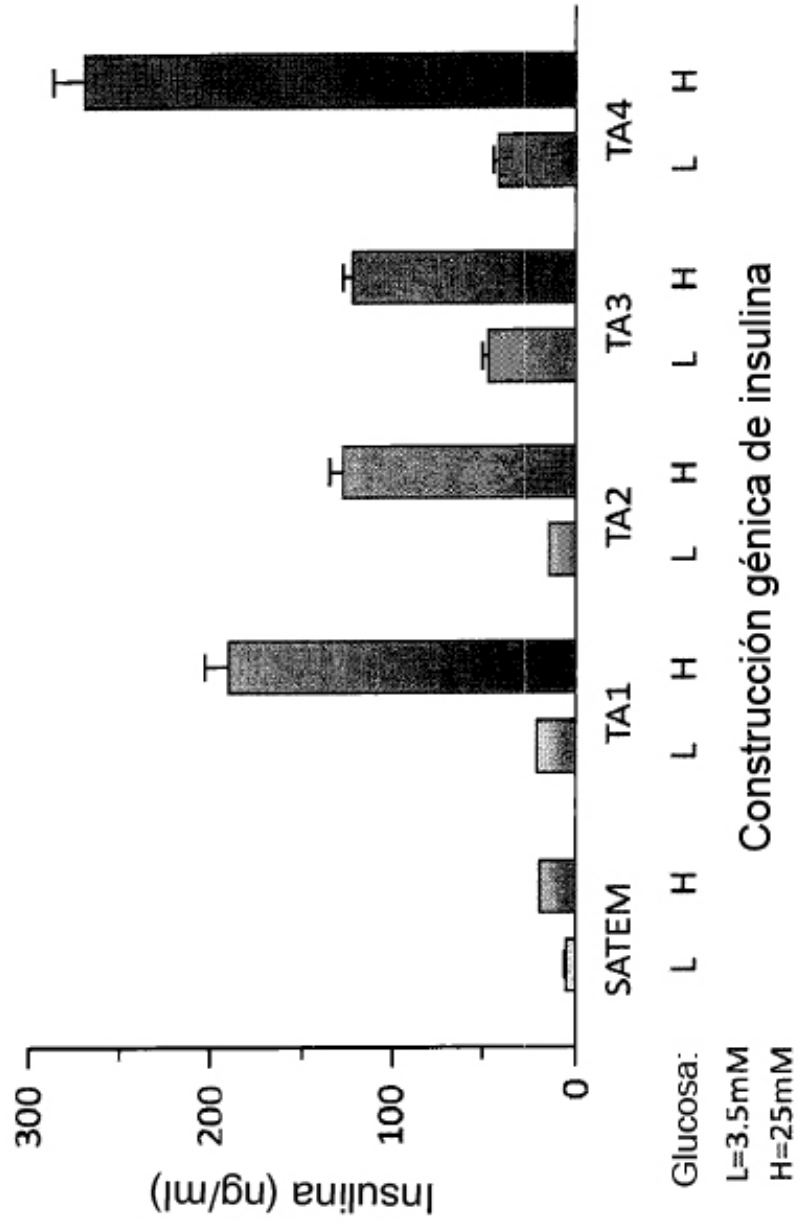


Figura 9

**Casete de expresión TA2 (1 – 2347)**

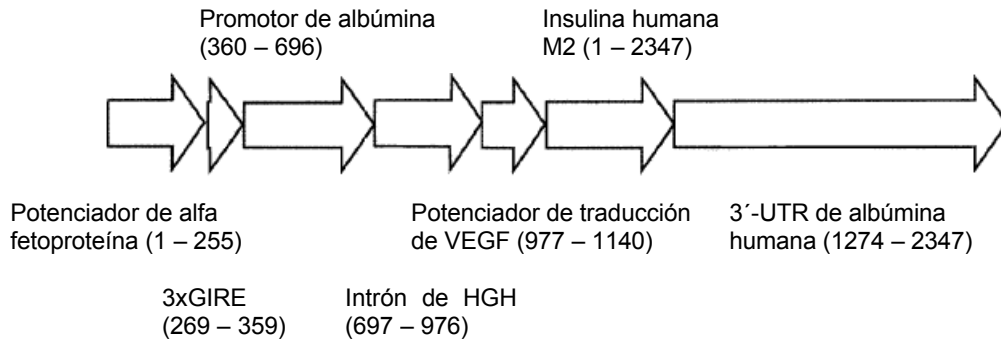


Figura 10

Casete de expresión TA2 (SEQ ID NO: 3)

CCGCCCCCTTcaaccAAGATCTTTTTGATGGCAGAGTTCAGTTTACC GGGTCACATTGTACCTGGGAAGATT  
 CAAGGATTTATGGAAAAAGTCAACAACAGGAGTCAGAGCAGCCGAAAAGCATGGACTCTGTACTTAGGAC  
 TGGCCTTGAGCAATGGCACAGCAAGCTTTAACCCCTGTTGCAGTCAGCACACAACTGTGGTTCAAAGCT  
 CCACTTTATCTCTTCTGTGGAAATTCagatatcagatcagtttaaAccttgcGGCCGCCAGTTCTCACGTG  
 GTGGCCACGTGCTTGGGCACGCCAGTTCTCACGTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACGAATCCAGTTCTCAC  
 GTGGTGGCCACGTGCTTGGGCACCTctagtgcctcaaatgggagacaagagattaagctctTatgtaaaatt:  
 tgctgttttacataactttaatgaatggacaaagtcttgTgcatgggggtgggggtgggggttagaggggaa  
 cagctccagatggcaaacatacgcgaaggatttagtcaaacacttttggcaaatggtatgatttTgt  
 aatggggtaggaaccaatgaaatgcgaggttaagtatggttaataatcTcacgttattggttaagaagtat:  
 attagagcgagtctttctgcacacagAtcaccttctatcaaccccactagcctctggcaaggtaccTTC  
 GAACAGGTAAGCGCCCCTAAATCCCTTTGGCACAATGTGTCTGAGGGGAGAGGCAGCGACCTGTAGATG  
 GGACGGGGGCACTAACCCCTCAGGGTTTGGGGTTCTGAATGTGAGTATCGCCATCTAAGCCCAGTATTTGGC  
 CAATCTCAGAAAGCTCCTGGCTCCCTGGAGGATGGAGAGAGAAAAACAACAGCTCCTGGAGCAGGGAGAG  
 TGTGGCCTCTTGCTCTCCGGCTCCCTCTGTTGCCCTCTGGTTCTCCCCAGGTTTCGAAAggtaccagegca  
 gaGgcttggggcagccgagcggcagccagccccggccccgggctcggttccAgaagggagaggagcccg  
 caaggcgcgcaagagagcgggctgcctcgcaGtccgagccggagagggagcgcgagccgccccgg  
 acggcctccgaaccATGGCCCTGGGATGGCCCTCTGCCCTGCTGGCCCTCTGGCCCTCTGGGGACC  
 TGACCCAGCCGAGCCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAAGCTCTCTACCTAGTGT  
 GCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCagGACCaagCGGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCAGGTG  
 GAGCTGGGGCGGGGGCCCTGGTGAGGCAGCCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCGGCAGAAGCGTGG  
 CATTGTGGAACAATGTGTACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAGACGCAGC  
 CTGCAGGCAGCGTCGAGTAACATCACATTTAAAAGCATCTCAGGTAACATATATTTGAATTTTTTAAAAA  
 GTAACTATAATAGTTATTATTAATAATAGCAAAGATTGACCATTTCCAAGAGCCATATAGACCAGCACCGAC  
 CACTATTCTAAACTATTTATGTATGTAAATATTAGCTTTTAAAAATCTCAAAATAGTTGCTGAGTTGGGAA  
 CCACTATTATTTCTATCGATTCAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTTGTTTTCACTGGTGTAAAT  
 TGCAGAAAGATGATCTAAGTAATTTGGCATTATTTTAAATAGTTTAAAAAACACATGCCATTTTACAAAT  
 AAGACTTATATTTGTCCTTTTGTTTTTTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAAAAGC  
 TTATTTCATCTGTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT  
 CATTTTGCCTCTTTTTCTGTTGCTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGTGGTACAGCACTG  
 TTATTTTTCAAAGATGTGTTGCTATCCTGAAAATCTGTAGGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTCTCTCTTA  
 TTCCACTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTGTGGGCTAATTAATAAATCATTAATACTCTCTAAGTTA  
 TGGATTATAAACATTCAAAATAATATTTTGACATTATGATAATCTGAATAAAAAGAACAAAAACCATGGTA  
 TAGGTAAGGAATATAAACATGGCTTTTACCTTAGAAAAACAATTTCTAAAAATTCATATGGAATCAAAAAA  
 GAGCCTGCaAGGGTG

Figura 11

Potenciador de alfa fetoproteína: **AAGAT...ttgc**

GIRE: **CACGTGGTGGC...CACGTG**

Promotor de albúmina: **ctcaaa...ggtacc**

Intrón de hormona de crecimiento humano: **TTCG...ggtac**

Potenciador de traducción de VEGF: Cag...aaacc

Secuencia de codificación del gen de insulina humana con mutaciones para compatibilidad con furina: **ATG...TAG**

Región 3' no traducida de albúmina humana: secuencia detrás del codón final: **TAG**

Figura 11 (continuación)

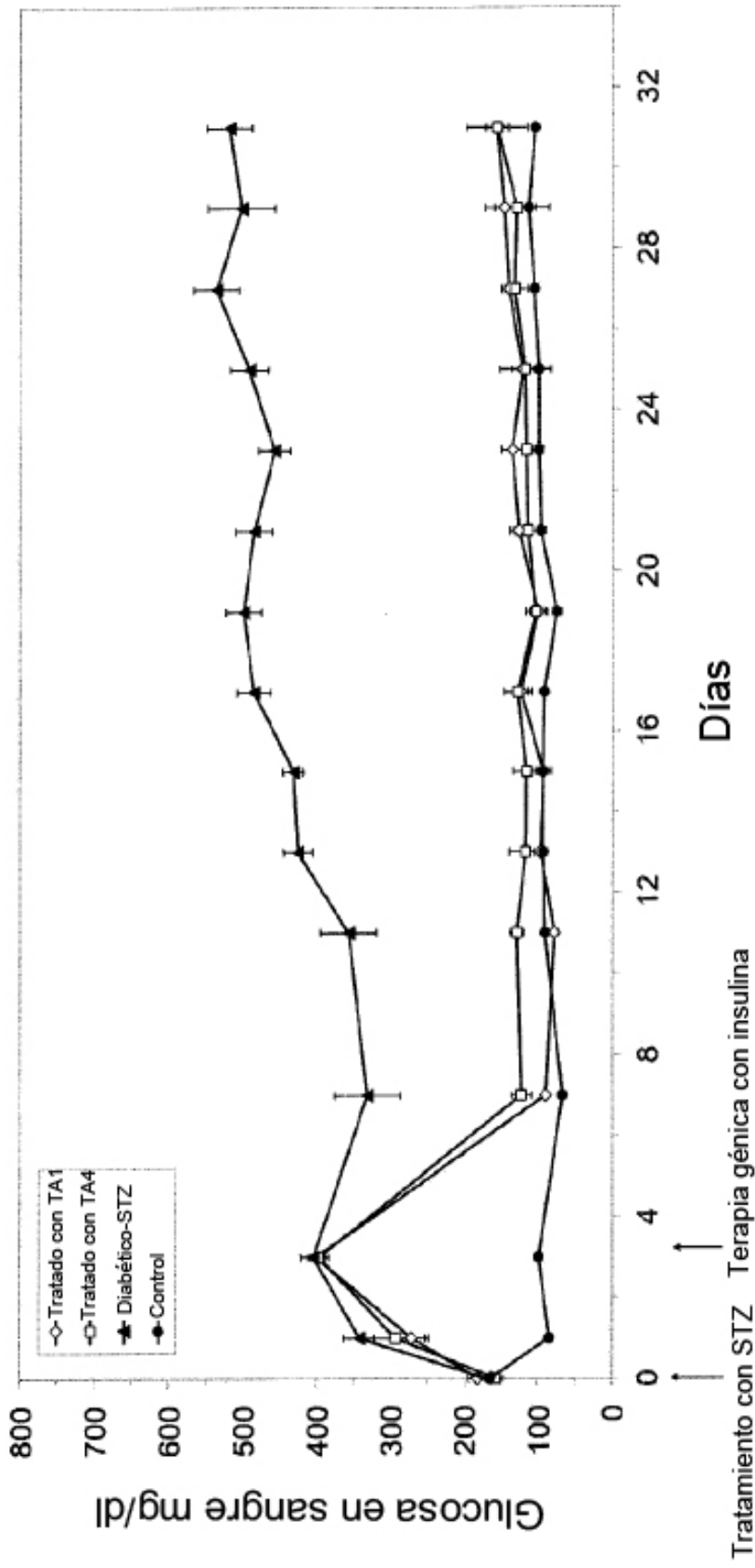


Figura 12



### Efecto del tratamiento mediado por adenovirus con TA1 y TA4 sobre pesos corporales en ayunas

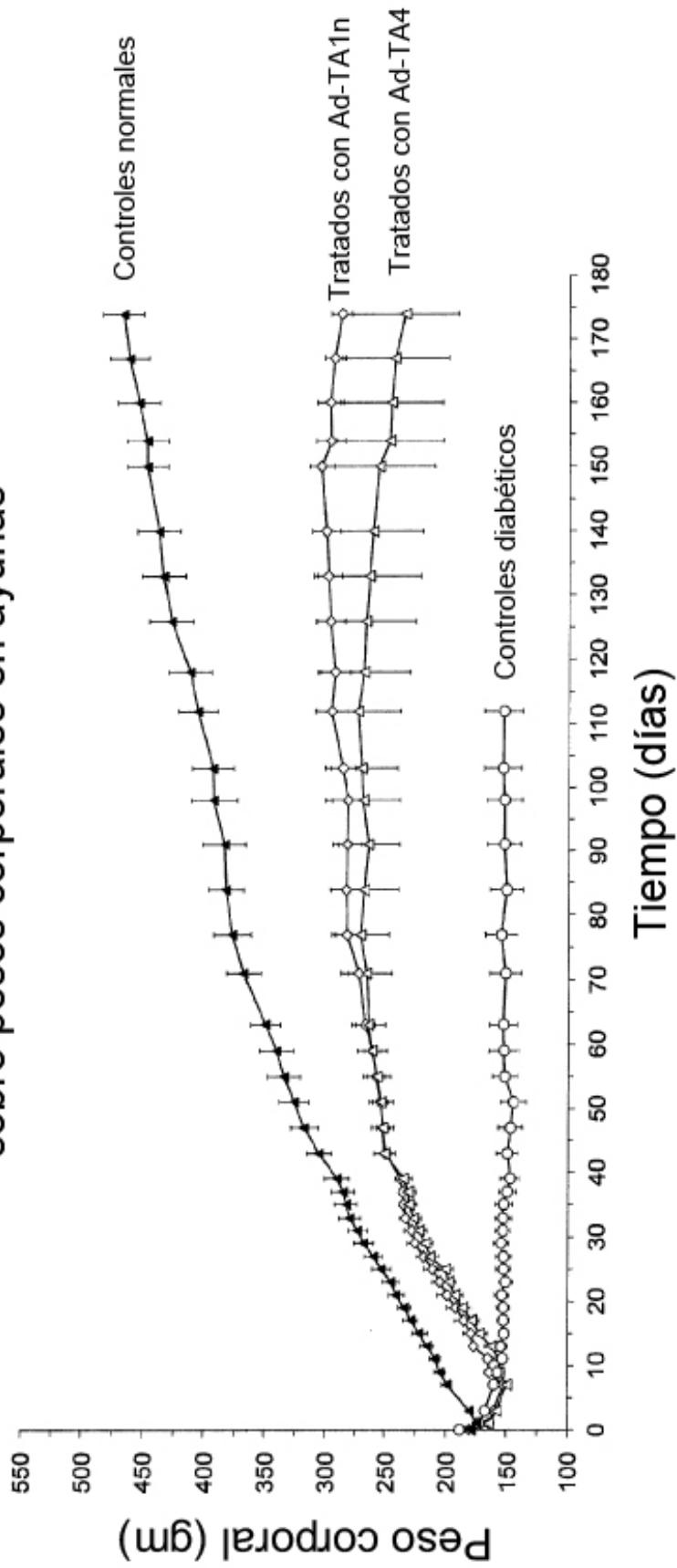


Figura 13

# Efecto del tratamiento mediado por adenovirus con TA1 y TA4 en pesos corporales en ayunas

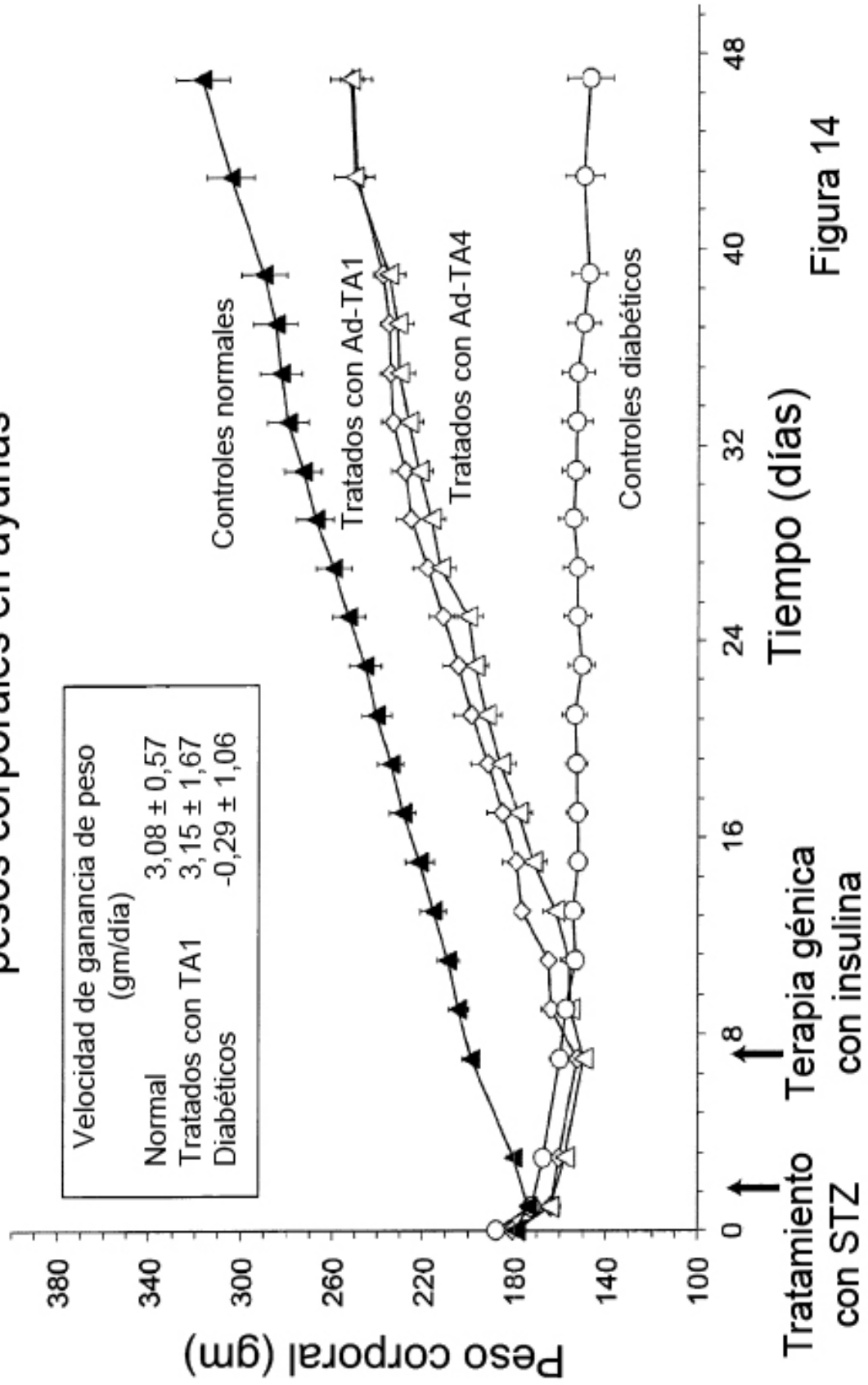


Figura 14

## Insulina humana en suero de ratas diabéticas tratadas con plásmido o ADN minicírculo

Construcción de insulina	Insulina, mUI (Media $\pm$ D.E.)
TA1 minicírculo	22,1
TA1/SMAR minicírculo	36,5 $\pm$ 21,1
pTED110	12,4 $\pm$ 10,8
TA1/pENTR	1,3 $\pm$ 0,2
Diabéticos-STZ	0,4 $\pm$ 0,2
Control normal	0,6 $\pm$ 0,6

Figura 15

Efecto del tratamiento con TA1 y TA3 minicirculo sobre la glucosa en sangre en ayunas

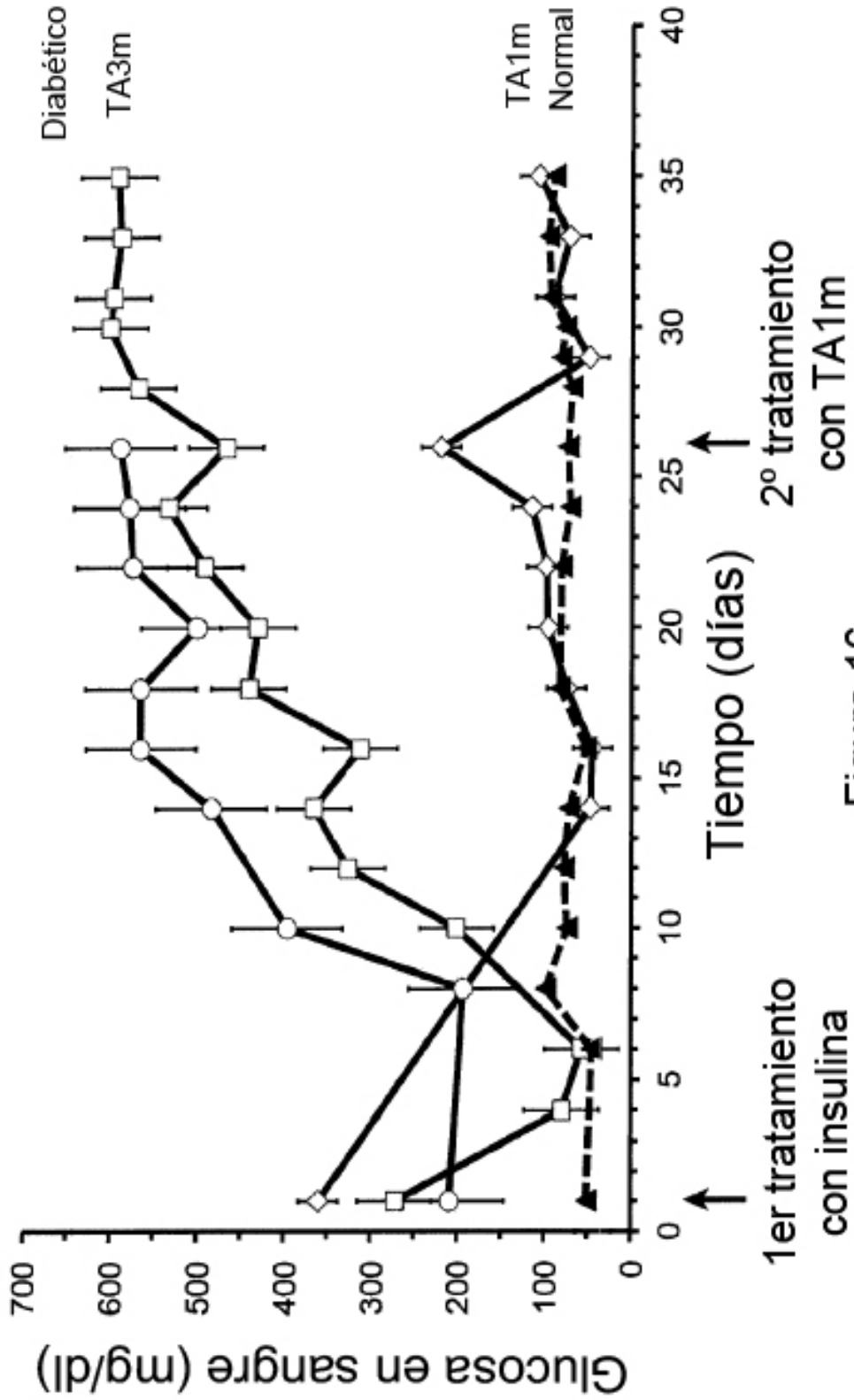


Figura 16

**Producción de insulina glucoasa dependiente a partir de células madre humana derivadas de hepatocitos**

Derivación de hepatocitos	Insulina humana ng/día/cm <sup>2</sup> (Media ± D.E.)		Aumento de insulina en glucosa alta (Alta/baja)
	Glucosa alta	Glucosa baja	
Células hES	266 ± 48	61 ± 34	4,4
Células iPS	121 ± 8	12 ± 5	10,1
Ratas normales	88 ± 15	11 ± 1	8,0

Figura 17

Efecto del tratamiento con ADN minicirculo sobre los pesos corporales en ayunas (Ratas diabéticas tratadas con TA1m, TA2m, y TA3m)

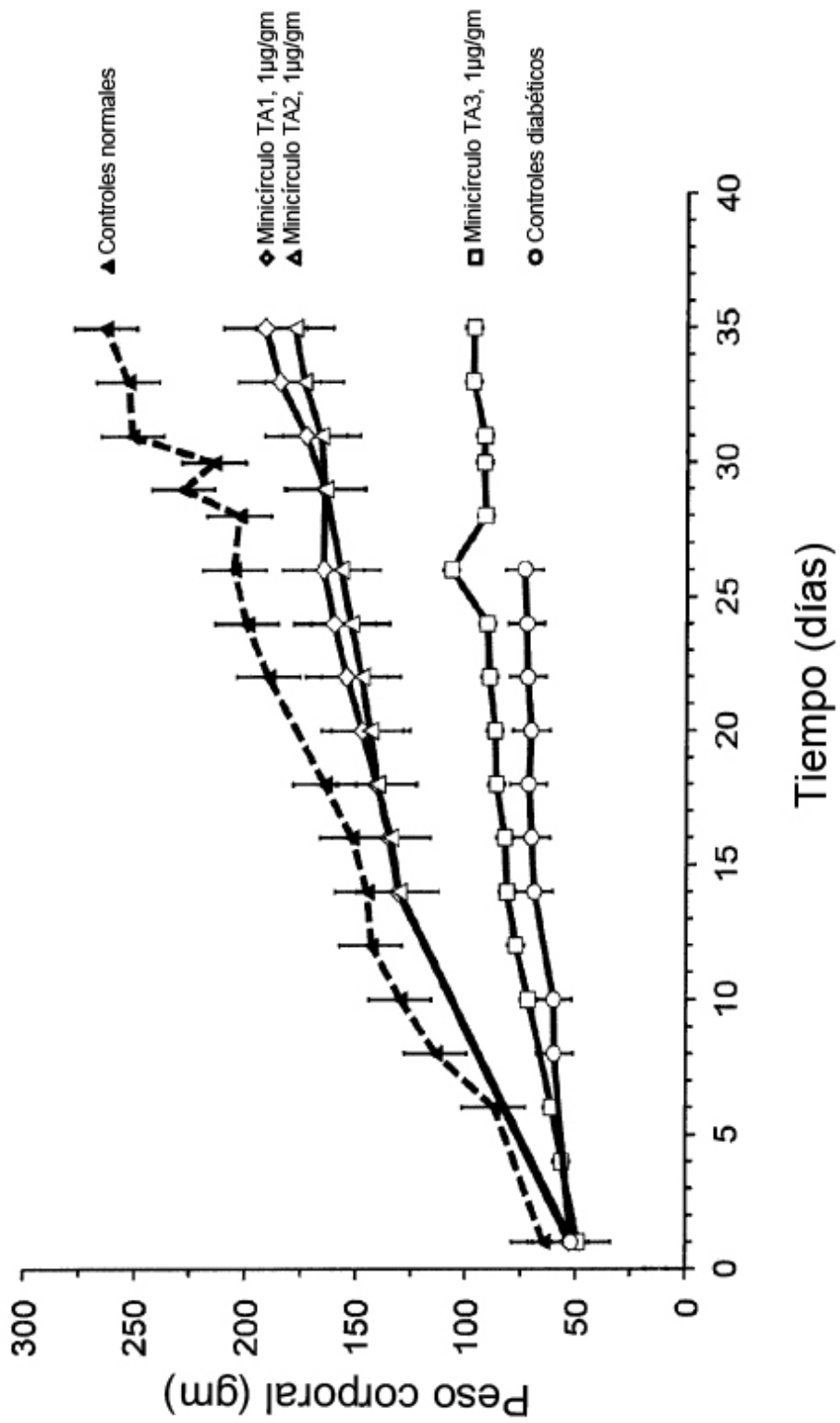


Figura 18