

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 394**

51 Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2013 PCT/US2013/052820**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14022455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2013 E 13824780 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2880167**

54 Título: **Métodos y composiciones para la inducción in vivo de la formación de células beta pancreáticas**

30 Prioridad:

31.07.2012 US 201261678077 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.08.2018

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**DOIRON, BRUNO y
DEFRONZO, RALPH, A.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 679 394 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

Métodos y composiciones para la inducción *in vivo* de la formación de células beta pancreáticas

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

Un listado de secuencias requerido por 37 CFR 1.821-1.825 se presenta electrónicamente con la presente solicitud.

5 ANTECEDENTES

La mayoría de los tratamientos médicos con fármacos han utilizado un enfoque reduccionista: una molécula para una afección fisiopatológica celular. Aunque el enfoque reduccionista ha demostrado ser satisfactorio para enfermedades monogénicas, ha fallado para enfermedades complejas. Los médicos han reconocido que se requiere una combinación de enfoques para tratar trastornos complejos tales como diabetes de tipo 1 o tipo 2. Un tratamiento para la diabetes es la administración de inyecciones de insulina, que data de 1922. Sin embargo, las inyecciones de insulina no detienen el desarrollo de las complicaciones diabéticas (por ejemplo, retinopatía, neuropatía, nefropatía, enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular) en muchos pacientes diabéticos de tipo 1 y tipo 2. El coste de tratamiento de estas complicaciones diabéticas es enorme y contribuye de una forma importante a una atención sanitaria de alta coste en los pacientes diabéticos.

Aunque se han hecho avances en la investigación biomédica, los científicos y profesionales clínicos están todavía buscando tratamientos eficaces para la diabetes. En ciertas formas de diabetes, las células beta están dañadas, son deficientes o reducidas. Los posibles tratamientos para la diabetes incluyen terapias basadas en fármacos y terapias basadas en células, ambas de las cuales tienen sus limitaciones. Las terapias basadas en fármacos normalmente tratan síntomas solo y los pacientes son crónicamente dependientes de ellas. Las terapias basadas en células son dificultadas por la escasez de células y su fuente, rechazo inmunitario y altos costes de fabricación y distribución.

La terapia basadas en células es un enfoque al tratamiento de la diabetes y otras afecciones en la que una reducción en el número de células beta pancreáticas o la función de células beta es causante o contribuyente (D'Amour et al., Nature Biotech 24:1392-1401, 2006; Kroon et al., Nature Biotech 26:443-452, 2008). Las mezclas multicomponente es un método de reproducción de precursores embrionarios de células beta, por ejemplo, se ha usado una mezcla de factores de transcripción en la investigación de células madre (Eminli et al., Nature Genetics 41:968-976, 2009) o se ha usado más recientemente una mezcla de vectores virales en el ratón (Zhou et al., Nature 455: 627-632, 2008). En general, estas células no están completamente desarrolladas en su respuesta a glucosa, y aunque las células contienen y expresan insulina, dejan de secretar insulina en presencia de glucosa o en respuesta a cambios en la concentración de glucosa. El documento WO2012/046085 desvela un método de inducción de la producción de insulina en una célula regulando por incremento un gen diana implicado en la producción de insulina en la célula usando un ARNac (ácido ribonucleico activante corto). El documento WO2004050646 desvela derivados de 1,1-dióxido de 1,2,5-tiadiazalon-3-ona y su uso como inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa PTP1B y su uso para el tratamiento de diabetes mellitus. El documento US2005042754 desvela un método de inducción de la formación de células productoras de insulina que comprende transferir un gen de factor de transcripción asociado a células beta pancreáticas (Pdx-1) al páncreas para inducir la formación de células productoras de insulina. El documento WO2010022395 se refiere a métodos para reprogramar una célula de un origen de endodermo, más particularmente una célula pancreática, a una célula que tiene características de célula β pancreática aumentando la expresión de proteínas de factores de transcripción, más específicamente Pdx1.

Así, sigue existiendo una necesidad de métodos de tratamiento de diabetes, tales como de producción de células beta que expresan y secretan insulina *in vivo* en un sujeto.

SUMARIO

La invención proporciona una combinación para inducir la formación de células beta de una célula de mamífero *in vitro*, o *in vivo*, para su uso como un medicamento, siendo la combinación como se presenta en la reivindicación 1. La invención proporciona además un método de inducción de la formación de células beta de células *in vitro*, como se presenta en la reivindicación 9. Características opcionales se presentan en las reivindicaciones dependientes

Los métodos descritos en el presente documento inducen la formación de células beta pancreáticas *in vitro* o *in vivo*. En ciertos aspectos, los métodos inducen la formación de células beta pancreáticas en sujetos adultos sin desdiferenciar células para dar lugar a la vía embrionaria. En aspectos adicionales, los métodos inducen la formación de células beta pancreáticas en células que están en diversas etapas de diferenciación. En otros aspectos, los métodos pueden usarse para inducir *in vitro* la formación de células beta. Ciertas realizaciones del enfoque descrito en el presente documento se dirigen específicamente a la inducción post-embrionaria de la formación de células beta pancreáticas sin reproducir el proceso de formación embrionaria del páncreas - el proceso de formación embrionaria conduce a la generación de múltiples tipos de células endocrinas pancreáticas. La capacidad para generar nuevas células beta *in vivo* en sujetos adultos puede proporcionar un novedoso enfoque terapéutico para el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y 2, además de otros tipos de diabetes. La capacidad para aumentar el número de células beta pancreáticas en sujetos adultos puede ser terapéutica, profiláctica y/o curativa con respecto a la diabetes.

Ciertas realizaciones se refieren a composiciones y métodos que modulan e integran tres niveles de la fisiología de las células beta: (i) metabolismo de la glucosa, (ii) función de receptor de membrana, y (iii) factores de transcripción. En ciertos aspectos, los métodos descritos en el presente documento se dirigen a los procesos de inducción post-embionaria de la formación de células beta pancreáticas. Como el proceso embrionario conduce a múltiples tipos de células endocrinas, los métodos post-embionarios descritos en el presente documento se diseñan para inducir principalmente o solo la formación de células beta. En ciertos aspectos, se forman células beta *in vivo* en órganos o tejidos, tales como el páncreas, o *in vitro* sin causar la formación de niveles detectables de otros tipos de células endocrinas (por ejemplo, células alfa que secretan glucagón o células delta que secretan somatostatina). Los inventores no saben de ningún informe en el que la formación de células beta pancreáticas se induzca *in vivo* en un sujeto adulto sin inducir otros tipos de células endocrinas pancreáticas. Esta capacidad para generar células beta *in vivo* en sujetos adultos proporciona un novedoso enfoque terapéutico para el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y 2, además de otros tipos de diabetes.

Ciertas realizaciones emplean un enfoque de transferencia génica para modular dianas intracelulares para la formación de células beta pancreáticas. Otras realizaciones usan agentes terapéuticos que imitan el proceso celular modulado por la metodología de transferencia génica. Todavía otras realizaciones usan una combinación de transferencia génica y agentes terapéuticos.

En ciertos aspectos, se proporciona glucocinasa (GK) (Nº de acceso de GenBank NP_034422.2 (GI:31982798) o NP_000153.1 (GI:4503951), segmentos funcionales o variantes de la misma, o un activador de molécula pequeña de glucocinasa seleccionado de R00281675, R04389620 (piragliatina), LY2121260, PSN-GKI o GKA-50 para aumentar la velocidad metabólica de la glucosa. También se contempla el uso de otros ácidos nucleicos de GK transcritos del gen GK (véase el acceso de GenBank NG_008847.1). En ciertos aspectos, también puede usarse una variante de GK que mantiene la actividad enzimática de GK. En un aspecto adicional, se proporciona un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTB1B) que es un inhibidor de ARNhp de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) o un ADN antisentido de PTP1B para aumentar la actividad de receptor de tirosina cinasa o receptor asociado a tirosina cinasa. En todavía un aspecto adicional, se proporciona Pdx-1 (Nº de acceso de GenBank NP_000200 (GI:4557673), un segmento funcional o variante del mismo para los genes diana implicados en la formación de células beta. En ciertos aspectos, también puede usarse una variante de Pdx-1 que mantiene capacidad de activación de la transcripción de Pdx-1. También se contempla el uso de otros ácidos nucleicos de Pdx-1 transcritos del gen Pdx-1 (véase el acceso de GenBank NG_008183). En ciertos aspectos, se administra un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. En un aspecto adicional, cada proteína o inhibidor está comprendido en un casete de expresión o vector de expresión individual o separado. En otros aspectos, dos o más proteínas son codificadas en un único casete de expresión o vector de expresión.

En ciertos aspectos, el (los) agente(s) inductor(es) de células beta se administran directamente al páncreas. En ciertos aspectos, la(s) composición (composiciones) inductora(s) de células beta se administran a través del conducto pancreático. En un aspecto adicional, se administran agentes inductores de células beta por vía oral o por vía intravascular.

En un aspecto adicional, el (los) agente(s) inductor(es) de células beta se administran a una célula *in vitro*. En un cierto aspecto, la célula tratada *in vitro* son células que son heterólogas o autólogas al sujeto que está tratándose. En un aspecto, se aíslan células autólogas de un paciente, se administran con el (los) agente(s) inductor(es), y entonces las células *in vitro* tratadas se implantan en el paciente. En otros aspectos, se obtiene una célula heteróloga, se administran el (los) agente(s) inductor(es), y las células *in vitro* tratadas se implantan entonces en el paciente.

En ciertos aspectos, una diana de órgano, tejido o célula es una que puede ser inducida para detectar el nivel de glucosa y secretar insulina. En ciertos aspectos, una célula o tejido diana presenta la capacidad de inducir o ser manipulada para la expresión de Glut 2 y/o glucocinasa; expresión de proinsulina; y expresión de proteínas convertasas para escindir la proinsulina. Están presentes células en el cuerpo humano que tienen al menos dos características de una célula beta. Una células K intestinal es un ejemplo de una célula tal. Las células K intestinales expresan Glut 2, glucocinasa y proteína convertasa, por tanto se necesita inducción de la expresión de insulina. En otro ejemplo, las células del hígado también expresan Glut 2 y glucocinasa.

Ciertas realizaciones se refieren a métodos de inducción de la formación de células beta a partir de células pancreáticas post-embionarias *in vivo*. En ciertos aspectos, el método incluye proporcionar a un páncreas *in vivo* una combinación de (i) un primer agente que aumenta los niveles o actividad de glucocinasa (GK), (ii) un segundo agente que aumenta la actividad de cinasa de receptor de tirosina, y (iii) un tercer agente que aumenta la transcripción mediada por Pdx-1.

En ciertos aspectos, el primer agente es un ácido nucleico que codifica glucocinasa. El ácido nucleico que codifica glucocinasa puede incorporarse en un vector viral. En ciertos aspectos, el vector viral es un vector de lentivirus u otro vector o partícula de administración de ácido nucleico. El ácido nucleico puede comprender un elemento regulador postranscripcional 3' de la secuencia codificante, por ejemplo, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRES). En ciertas realizaciones, puede administrarse un polipéptido que comprende un dominio de transducción de proteína a una célula o sujeto. En ciertos aspectos, se proporciona glucocinasa como

una fusión de proteína recombinante que comprende dominios de transducción de proteína. Los dominios de transducción de proteína (PTD o proteínas permeables a la célula (CPP) o secuencias de translocación de la membrana (MTS)) son péptidos pequeños que son capaces de transportar moléculas mucho más grandes en células independientemente de la endocitosis clásica. Muchos PTD conocidos se unen a las mismas moléculas de superficie (proteoglicanos de sulfato de heparano, HSPG) antes de la internalización, y esa internalización depende de estas moléculas. En aspectos adicionales, el primer agente puede ser un activador de molécula pequeña de glucocinasa seleccionado de RO0281675, RO4389620 (piragliatina), LY2121260, PSN-GK1 o GKA-50.

En ciertos aspectos, el segundo agente es un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B. El inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B puede ser un inhibidor de ARNhp de proteína tirosina cinasa fosfatasa 1B. En ciertos aspectos, el inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B puede ser oligonucleótidos antisentido diseñados para regular por disminución la expresión de PTP1B

En aún aspectos adicionales, el tercer agente es un activador transcripcional selectivo de células beta que es un ácido nucleico que codifica Pdx-1. En ciertos aspectos, se administra un activador transcripcional a una célula o sujeto como una fusión de proteína recombinante con un dominio de transducción de proteína. En ciertos aspectos, pueden usarse otros activadores transcripcionales usados solos o en combinación con uno o más de NeuroD, Isl1, Nkx6.1 y/o Pax4. En una realización adicional, puede proporcionarse el compuesto troglitazona en lugar de o conjuntamente con la activación transcripcional de Pdx-1.

En ciertos aspectos, se proporcionan el primer, segundo y tercer agentes en una única composición. En otro aspecto, se proporcionan el primer, segundo y tercer agentes por separado. Los agentes pueden administrarse casi simultáneamente o dentro de una ventana de administración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minuto(s) u hora(s). En ciertas realizaciones, se proporciona secuencialmente el primer, segundo y tercer agente. En otras realizaciones, se proporcionan el primer, segundo y tercer agente simultáneamente. En ciertas realizaciones, el primer y segundo agentes, primer y tercer agentes, o el segundo y tercer agentes son el mismo agente.

En ciertos aspectos, se proporcionan el primer, segundo y tercer agente mediante inyección o infusión en el páncreas, u otro órgano o tejido diana. En un aspecto adicional, la inyección o infusión en el páncreas es a través del conducto pancreático.

Otras realizaciones incluyen métodos de tratamiento de diabetes que comprenden: proporcionar una composición terapéutica a un páncreas u otro órgano o tejido *in vivo* que comprende los agentes descritos anteriormente. En ciertos aspectos, la composición terapéutica comprende (i) casete de expresión de glucocinasa configurado para expresar una proteína glucocinasa funcional, (ii) un inhibidor de tirosina fosfatasa 1B que es un inhibidor de ARNhp de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) o un ADN antisentido de PTP1B y (iii) un casete de expresión de Pdx-1 configurado para expresar una proteína Pdx-1 funcional, en el que se inducen células beta pancreáticas. En una realización adicional, pueden proporcionarse los compuestos troglitazona conjuntamente con Pdx-1.

Ciertas realizaciones incluyen métodos de tratamiento de diabetes que comprenden: obtener una célula diana heteróloga a un paciente o aislar una célula diana autóloga de un paciente y proporcionar una composición terapéutica a la célula *in vitro* que comprende los agentes descritos anteriormente. En ciertos aspectos, la composición terapéutica comprende (i) casete de expresión de glucocinasa configurado para expresar una proteína glucocinasa funcional, (ii) un inhibidor de tirosina fosfatasa 1B que es un inhibidor de ARNhp de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) o un ADN antisentido de PTP1B y (iii) un casete de expresión de Pdx-1 configurado para expresar una proteína Pdx-1 funcional, en el que se inducen células beta pancreáticas. En una realización adicional, pueden proporcionarse los compuestos troglitazona conjuntamente con Pdx-1. Los métodos comprenden además implantar la célula diana tratada en un paciente.

En ciertos aspectos, pueden usarse uno, dos o más ácidos nucleicos (es decir, genes). En ciertos aspectos, se usan tres ácidos nucleicos. En un aspecto adicional, pueden combinarse uno, dos o tres ácidos nucleicos con uno o más agentes químicos. En aún aspectos adicionales, pueden usarse agentes químicos que modulan positivamente o negativamente las vías diana sin ácidos nucleicos.

En ciertas realizaciones, un único agente puede (i) modular positivamente actividad de glucocinasa, y modular positivamente actividad de receptor de tirosina cinasa y/o actividad de receptor asociado a tirosina cinasa; (ii) modular positivamente actividad de glucocinasa, y positivamente modula célula beta específica transcripción; o (iii) modular positivamente actividad de receptor de tirosina cinasa y/o actividad de receptor asociado a tirosina cinasa (por ejemplo, inhibir PTP1B), y modular positivamente la transcripción específica de células beta.

En ciertos aspectos, activador(es) de GK de agentes químicos pueden actuar a dos niveles aumentando la velocidad de metabolismo de la glucosa y aumentando la expresión génica mediada por Pdx-1. Inhibidor(es) de PTP1B de agentes químicos en combinación con activador(es) de GK de agentes químicos pueden dirigirse a cada una de las tres vías descritas en el presente documento.

En ciertos aspectos, en estados de enfermedad tales como diabetes de tipo II, inhibidor(es) de PTP1B de agentes químicos pueden actuar a tanto el nivel de receptor de tirosina cinasa como a niveles de GK en presencia de insulina. En ciertos aspectos, un activador(es) de GK pueden aumentar el metabolismo de la glucosa y la actividad

- transcripcional mediada por Pdx-1. Por ejemplo, la rosiglitazona aumenta la expresión de efectos mediados por GK y Pdx-1. Inhibidor(es) de PTP1B de agente químico en combinación con la competencia de secreción de insulina pueden aumentar el metabolismo de la glucosa y aumentar la actividad de receptor de tirosina cinasa. Además, la familia de activador(es) de PPAR-gamma como rosiglitazona aumenta la expresión de GK y la expresión de Pdx-1.
- 5 Así, puede administrarse un único agente para modular múltiples vías diana.
- Como se usa en el presente documento, "célula diana" y "células diana" se refieren a células precursoras, células aisladas, células madre adultas, células del páncreas u otros órganos o tejidos que pueden ser inducidos para formar células beta o células de tipo células beta. Las células pueden ser células beta o células no beta antes de la inducción. Una célula precursora es una célula que no está completamente diferenciada.
- 10 Como se usa en el presente documento, expresión se refiere a niveles de ARNm (expresión de ácido nucleico) y/o niveles de proteína (expresión de proteínas). Pueden diseñarse oligonucleótidos adecuados para detectar ARNm, por ejemplo, usando RT-PCR, usando técnicas rutinarias en la materia. Alternativamente o además, puede evaluarse la expresión de proteínas usando cualquier técnica reconocida en la materia (por ejemplo, cualquier técnica de detección basada en anticuerpos).
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento", cuando se usa en el contexto de una estrategia terapéutica para tratar una enfermedad o trastorno, significa cualquier manera en la que mejoran uno o más de los síntomas de una enfermedad o trastorno o se alteran beneficiosamente de otro modo. Como se usa en el presente documento, mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular se refiere a cualquier reducción, tanto permanente como temporal, duradera o transitoria que puede atribuirse a o asociarse al tratamiento por las
- 20 composiciones y métodos de la presente invención.
- Los términos "cantidad eficaz" y "eficaz para tratar", como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad o una concentración de uno o más compuestos o una composición farmacéutica descrita en el presente documento utilizada durante un periodo de tiempo (incluyendo administración aguda o crónica *in vivo*, y administración periódica o continua) que es eficaz dentro del contexto de su administración para causar un efecto
- 25 previsto o desenlace fisiológico.
- Cantidades eficaces de uno o más compuestos, o una composición farmacéutica para su uso en la presente invención, incluyen cantidades que promueven la formación de células beta o madurez, por ejemplo, un aumento en las células secretoras de insulina dependientes de glucosa o un aumento en la secreción dependiente de glucosa de una célula.
- 30 El término "sujeto" se usa en toda la memoria descriptiva para describir un animal, humano o no humano, al que se proporciona tratamiento según los métodos de la presente invención. En ciertos aspectos, el sujeto es un ser humano.
- El término "proporcionar" se usa según su significado habitual "suministrar o proveer para el uso". En algunas realizaciones, se proporciona una proteína directamente administrando la proteína, mientras que en otras realizaciones, la proteína se proporciona administrando un ácido nucleico que codifica la proteína. En otras
- 35 realizaciones, puede proporcionarse un inhibidor tal como un ARNhp para reducir los niveles de proteína en una célula. En ciertos aspectos, la invención contempla composiciones que comprenden diversas combinaciones de ácidos nucleicos terapéuticos, péptidos y/o moléculas pequeñas.
- Otras realizaciones de la invención se tratan en toda la presente solicitud. Cualquier realización tratada con respecto a un aspecto de la invención también se aplica a otros aspectos de la invención y viceversa. Cada realización descrita en el presente documento se entiende que es realizaciones de la invención que son aplicables a todos los aspectos de la invención. Se contempla que cualquier realización tratada en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, pueden usarse composiciones y kits de la invención para lograr los métodos de la invención.
- 40
- 45 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa conjuntamente con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también está de acuerdo con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".
- En toda la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.
- 50 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o", a menos que se índice explícitamente que se refiere a alternativas solo o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere a solo alternativas y "y/o."
- Como se usa en esta memoria descriptiva y la(s) reivindicación (reivindicaciones), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluyen") o
- 55

"que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son incluyentes o de extremos abiertos y no excluyen elementos adicionales o etapas de método.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan solo a modo de ilustración.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar además ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de la memoria descriptiva presentada en el presente documento.

FIG. 1. Un ejemplo de un enfoque que usa una mezcla de inducción que comprende tres moléculas para inducir la formación de células beta pancreáticas *in vivo* en el páncreas adulto.

FIG. 2A-2C. Ilustra el diseño y validación de construcciones lentivirales, (A) glucocinasa, (B) Pdx-1 y (C) PTP1B de ARNhp.

FIG. 3. Expresión en exceso *in vivo* de PDX-1 y GK, y supresión de la expresión de PTP1B por la mezcla de CNIP (Lenti-GCK + Lenti-Pdx-1 y Lenti-PTP1B de ARNhp).

FIG. 4. Cuantificación de la tinción de células beta individuales en el tejido pancreático adulto en ratones inyectados con una mezcla de formación de células beta en comparación con un grupo de control inyectado con mezcla de placebo.

FIG. 5. Un ejemplo de una mezcla de formación de células beta que comprende tres moléculas (GK, inhibidor de PTP1B y Pdx-1) que indujo proliferación en el páncreas de ratón adulto en comparación con el grupo de ratones adultos de control inyectado con placebo.

FIG. 6. La masa de células beta pancreáticas aumentó significativamente en ratones adultos inyectados con una mezcla de formación de células beta (GK, inhibidor de PTP1B y Pdx-1) en comparación con el grupo de ratones adultos de control inyectado con el placebo. Se capturaron imágenes de inmunofluorescencia de tinción de insulina usando microscopía confocal. Se cuantificaron las áreas de células beta y pancreáticas totales con Image J (NIH, Bethesda MD). Se calculó la masa de células beta total como el área de células beta total expresada como un porcentaje del área total del páncreas.

FIG. 7. Ilustra el número de agrupaciones de células beta en el páncreas (densidad de agrupaciones) en el grupo de ratones adultos inyectado con la mezcla de formación de células beta en comparación con el grupo de ratones adultos de control inyectado con el placebo. Se determinó la densidad de agrupaciones como el número de agrupaciones de células beta dividido entre el área total del páncreas.

FIG. 8. Ilustra la concentración de insulina en plasma en ayunas en el grupo de ratones adultos inyectado con una mezcla de formación de células beta (GK, inhibidor de PTP1B y Pdx-1) en comparación con el grupo de ratones adultos de control inyectado con placebo.

FIG. 9. Marcador BrdU de proliferación en islotes y tejido exocrino 4 semanas después de la inyección de la mezcla (Lenti-GCK + Lenti-Pdx-1 + Lenti-PTP1B de ARNhp) o por dos moléculas o cada molécula individualmente. La figura es representativa de un área del páncreas examinada en diez secciones por animal (n=3 a 4 para cada grupo), separadas 200 μ m. Los resultados se expresan como el aumento en veces en el número de células marcadas con BrdU en comparación con controles. Se usó microscopía de láser confocal para el análisis. Lenti = Lentivirus; GCK = glucocinasa; PTP1B = proteína-tirosina fosfatasa 1B. Los datos se presentan como media \pm EE. * = p < 0,001 mezcla de CNIP frente a control; \dagger = p < 0,05 mezcla de CNIP frente a [GK + PTP1B]; # = p < 0,01 [GK + PTP1B] frente a control.

FIG. 10. Masa de células beta 4 semanas después de la inyección con la mezcla CNIP (Lenti-GCK + Lenti-Pdx-1 + Lenti-PTP1B de ARNhp) o por dos moléculas o cada molécula individualmente en comparación con control de mezcla y entre sí (n=3 a 4 para cada grupo). Se midieron áreas de tinción positiva pancreática y de insulina totales de cada sección usando Image J (NIH, Bethesda, EE.UU.). Se calculó la masa de células beta como la relación de área positiva de insulina total con respecto a área pancreática total de todas las secciones, multiplicado por el peso húmedo de tejido pancreático. La figura es representativa de un área del páncreas examinada en diez secciones por animal, separadas 200 μ m. Se usó microscopía de láser confocal para análisis. Lenti = Lentivirus; GCK = glucocinasa; PTP1B = proteína-tirosina fosfatasa 1B. * = p < 0,001 = mezcla de CNIP frente a control; p < 0,001 mezcla de CNIP frente a [GK + Pdx-1]; p < 0,001 mezcla de CNIP frente a [PTP1B + Pdx-1]; ■ = p < 0,05 mezcla de CNIP frente a [GK + PTP1B]. # = p < 0,05 [GK + PTP1B] frente a [PTP1B + Pdx-1]; p < 0,05 [GK + PTP1B] frente a control. Los datos se presentan como media \pm EE.

DESCRIPCIÓN

Ciertos métodos descritos en el presente documento representan un concepto que contradice la doctrina científica de una molécula para un proceso de control celular. En ciertos aspectos, los métodos incluyen la integración de tres niveles de fisiología celular: metabolismo, función de receptor de membrana y transcripción génica. La integración de múltiples niveles de fisiología celular produce un efecto sinérgico sobre la formación de células beta. La sinergia requiere que múltiples moléculas trabajen conjuntamente para producir un efecto que es mayor que la suma de sus efectos individuales. Usando el enfoque sinérgico descrito en el presente documento, los inventores han inducido satisfactoriamente la formación de células beta pancreáticas en el páncreas adulto. La capacidad para generar células beta *in vivo* en animales adultos y seres humanos proporciona un novedoso enfoque terapéutico para el tratamiento de sujetos con diabetes mellitus de tipo 1 y tipo 2.

I. Métodos de tratamiento de diabetes

Los inventores han demostrado que, utilizando "Integración y procesamiento de red celular" (CNIP), la formación de células beta pancreáticas puede aumentarse *in vivo* en sujetos adultos. Según el enfoque de CNIP, los inventores toman parte en tres niveles importantes en el procesamiento celular: (1) primero, al nivel del metabolismo intracelular de los hidratos de carbono, (2) segundo, al nivel de la función de receptor de membrana, (3) tercero, al nivel de expresión génica. Dirigiéndose a estos tres niveles, puede generarse una interacción sinérgica que induce la formación de células beta. Los inventores se refieren a un ejemplo de este método como "Syner-III," siendo Syner el prefijo del nombre griego sinérgico y III es el número romano tres.

El enfoque de CNIP se diseña para imitar la formación de células beta en sujetos adultos y no para reprogramar la célula en la etapa de desarrollo embrionario. Los inventores observan que la mezcla de factores de transcripción usada en la investigación de células madre o en la mezcla de vectores virales usada más recientemente en el modelo de ratón (Zhou et al., Nature 455: 627-32, 2008) se usan para generar células beta reproduciendo la etapa embrionaria de desarrollo. A diferencia, el enfoque de CNIP se diseña para actuar en el estado adulto y utiliza un mecanismo que integra los tres niveles de regulación celular para inducir la formación de células beta.

Los métodos descritos en el presente documento inducen la formación de células beta pancreáticas *in vivo* en sujetos adultos sin desdiferenciar células para dar lugar a la vía embrionaria. El enfoque de CNIP se dirige específicamente a la inducción post-embionaria de la formación de células beta pancreáticas sin reproducir el proceso de formación embrionaria del páncreas - el proceso de formación embrionaria conduce a la generación de múltiples tipos de células endocrinas pancreáticas. La capacidad para generar nuevas células beta *in vivo* en sujetos adultos puede proporcionar un novedoso enfoque terapéutico para el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y 2, además de otros tipos de diabetes. La capacidad para aumentar el número de células beta pancreáticas en sujetos adultos puede ser terapéutica, profiláctica y/o curativa con respecto a la diabetes.

En ciertas realizaciones, pueden aplicarse composiciones y métodos descritos en el presente documento a tejidos distintos del páncreas. En ciertos aspectos, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en las células K endocrinas intestinales y ser capaces de formar célula beta de tipo insulina que secretaría insulina en respuesta a una elevación de la glucosa en sangre. En un aspecto adicional, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse al hígado para inducir la formación de células beta que responden a glucosa. En todavía otros aspectos, las composiciones descritas en el presente documento pueden aplicarse en la última etapa de diferenciación y/o desdiferenciación de células madre para formar células beta. En ciertos aspectos, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a diversas células y/o tejidos en el cuerpo para formar células beta y, por tanto, no se limitan a los ejemplos específicos descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, células diana se tratan *in vitro*. Células diana son aquellas células que tienen la capacidad o puede ser inducidas para tener la capacidad de formar células beta. Métodos para proporcionar u obtener tales células diana son conocidos en la técnica e incluyen ya sea proporcionar tejido que contiene células diana y aislar las células diana por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo con la ayuda de anticuerpos específicos de superficie celular, y usar un FACS (clasificador de células) o cultivo de las células en condiciones específicas que permiten el crecimiento de células diana. En ciertos aspectos, existen líneas celulares diana adecuadas (Lieber et al., Int J Cancer 15(5):741-47, 1975).

Cualquier célula que sea capaz de diferenciarse en células beta pancreáticas puede ser usada como una célula diana del método de la invención. Esto incluye células precursoras derivadas de tejido humano o animal (por ejemplo, mamífero). En ciertas realizaciones, la célula diana es una célula diana autóloga, es decir, contiene la misma información genética que las células del sujeto que está tratándose. En ciertos aspectos, la célula diana no ha sido genéticamente modificada antes de administrar el tratamiento. En ciertos aspectos, se selecciona una célula diana del grupo que consiste en una célula precursora pancreática, una célula precursora del intestino delgado, una célula precursora de hígado, una célula precursora derivada de la población de conductos pancreáticos, precursor de célula neuroendocrina y una célula madre pancreática. Esto incluye todas las células somáticas diferenciadas de un tejido humano o animal. En ciertos aspectos, se selecciona una célula diana del grupo que consiste en célula

somática diferenciada del hígado, célula intestinal endocrina, célula de conducto pancreático, célula pancreática exocrina y endocrina, y célula neuroendocrina.

Una vez se han obtenido o proporcionado las células diana, las células pueden cultivarse y manipularse en un sistema de cultivo celular *in vitro*, que incluye sistemas de cultivo celular estándar como placas de cultivo de tejido y placas de 6 pocillos, 24 pocillos o 96 pocillos. Las condiciones de cultivo dependerán de la célula diana y el experto en la materia sabrá como cultivar las células.

A. Metabolismo de la glucosa

El metabolismo de la glucosa es el primer aspecto en el enfoque de CNIP para inducir la formación de células beta en el páncreas adulto u otros órganos o tejidos. La glucosa es la principal fuente de energía utilizada por la célula de mamífero, y el metabolismo de la glucosa proporciona la energía para la función y proliferación celular (Bohnsack y Hirschi, *Annu Rev Nutr.* 24: 433-453, 2004). La inhibición de la glucólisis detiene la progresión del ciclo celular, documentando la necesidad del metabolismo de la glucosa para inducir la proliferación (Newcomb et al., *Eucaryot. Cell.* 2:143-149, 2003). Factores que inducen la formación de células beta pancreáticas *in vivo* incluyen un aumento en el metabolismo de la glucosa (Bernard et al., *FASEB J.* 13:1195-1205, 1999; Alonso et al., *Diabetes* 56:1792-1801, 2007). La infusión de glucosa en ratas adultas durante un periodo de solo 24 h aumentó el número de células beta ~50 % (Bernard et al., *FASEB J.* 13:1195-1205, 1999). Además, la glucosa promueve la supervivencia de células beta suprimiendo un programa apoptótico constitutivo *in vitro* (Hoorens et al., *J. Clin. Invest.* 98:1568-1574, 1996). El metabolismo de la glucosa sensibiliza al páncreas para la inducción de la formación de células beta pancreáticas.

En ciertos aspectos, la tasa de metabolismo de la glucosa aumenta, proporcionando un ácido nucleico que codifica glucocinasa, o aumentando la actividad de glucocinasa u otras enzimas o reguladores. En ciertas realizaciones, las funciones atribuidas al ácido nucleico descritas en el presente documento pueden ser proporcionadas administrando diversos compuestos químicos o moléculas pequeñas que aumentan el metabolismo de la glucosa. Compuestos activadores de glucocinasa incluyen, pero no se limitan a, Roche Inc., compuesto R1440; Hoffman-La Roche Inc., compuesto RO0281675; Hoffman-La Roche Inc., compuesto RO4389620 (piragliatina); Eli Lilly Inc., compuesto LY2121260; OSI Pharmaceuticals, Inc., compuesto PSN-GK1; Astra-Zeneca, Inc., compuesto GKA-50; Pfizer Inc., activadores de glucocinasa descritos en la publicación de patente internacional WO/2007122482; Merck-Banyu Inc., activadores de glucocinasa descritos en la publicación de patente internacional WO/2003080585; Takeda Inc., activadores de glucocinasa descritos en la publicación de patente internacional WO/200710434; Johnson & Johnson Inc., activador de glucocinasa descrito en la publicación de patente internacional WO/2007075847; y similares.

B. Tirosina cinasas de receptor y receptores asociados a tirosina cinasa.

La(s) tirosina cinasa(s) de receptor de membrana y/o receptores asociados a tirosina cinasa son un segundo componente del enfoque de CNIP para inducir la formación de células beta pancreáticas en un sujeto adulto. El segundo aspecto en la generación de células beta pancreáticas tras un estímulo fisiológico es para que la célula reciba el mensajero a través de sus receptores de membrana. Los receptores de membrana responsables de la estimulación de la masa de células beta pancreáticas son de la familia de tirosina cinasa de receptores y familia asociada a tirosina cinasa de receptores. Durante el embarazo, la masa de células beta pancreáticas aumenta en respuesta al desarrollo de resistencia a la insulina y elevado consumo de energía fetal/por la placenta y este efecto está mediado por la elevada secreción de prolactina, estrógeno y lactógeno placentario (Heit et al., *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 22:311-338, 2006). La incapacidad de la célula beta para compensar aumentando su secreción de insulina conduce a diabetes gestacional. Se han observado agrandamiento de los islotes e hiperplasia de células beta en la autopsia de mujeres embarazadas (Van Assche et al., *Br. J. Obstet Gynaecol* 85: 818-820, 1978). Los estímulos hormonales (prolactina, estrógeno y lactógeno placentario) durante el embarazo para aumentar la masa de células beta pancreáticas actúan mediante receptores asociados a tirosina cinasa (Nielsen et al., *Diabetes* 50 (Suppl. 1): S25-S29, 2001). Otras hormonas que aumentan la masa de células beta también actúan mediante la familia de tirosina cinasa de receptores e incluyen factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, hormona de crecimiento, insulina, IGF-1 y EGF (Nielsen et al., *Diabetes* 50 (Suppl. 1): S25-S29, 2001). Digno de mención, el efecto de estas hormonas sobre la masa de células beta también se basa en el metabolismo de la glucosa. En ausencia de glucosa, se pierde la capacidad de las hormonas que actúan mediante la familia de tirosina cinasa para aumentar la masa de células beta pancreáticas (Cousin et al., *Biochem. J.* 344:649-658, 1999). Por consiguiente, el enfoque de CNIP combina el efecto del metabolismo de la glucosa y tirosina cinasa(s) de membrana y/o receptores asociados a tirosina cinasa(s) para inducir la formación de células beta en el páncreas adulto.

En ciertas realizaciones, la(s) función (funciones) atribuidas a los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden proporcionarse administrando un agente que aumenta la actividad de receptor de tirosina cinasa y/o asociado a tirosina-cinasa(s) para la formación de células beta en un páncreas adulto que es un inhibidor de ARNhp de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) o un ADN antisentido de PTP1B.

Otros ARNhp que se dirigen a proteínas de la familia de tirosina fosfatasa pueden incluirse solos o en combinación con PTP1B de ARNhp. PTP1B actúa sobre la mayoría de la familia de tirosina 17 cinasa de receptores que

participan en la función de células beta pancreáticas en el páncreas adulto. Sin embargo, se ha mostrado que la proteína tirosina fosfatasa de linfocitos T (TCPTP) y SHP-2, otros dos miembros de la proteína fosfatasa intracelular, se dirigen a las tirosina cinasas de receptor implicadas en la señalización de insulina (Tonks, Nat Rev. Mol Cell Biol 7:833-46, 2006). SHP-2 (fosfatasa-2 que contiene el dominio SH2) es una proteína tirosina fosfatasa intracelular ubicuamente expresada que contiene dos dominios de homología 2 Src del extremo amino (SH2). SH2-2 se une a tanto el receptor de insulina fosforilado con tirosina como a IRS-1. TCPTP existe en dos formas: una forma de 48 kDa dirigida al retículo endoplásmico (TC48) y una forma de 45 kDa nuclear (TC45). Se ha demostrado que TC-PTP regula negativamente la señalización de insulina y el receptor de prolactina (Aoki y Matsuda, J. Biol. Chem. 275:39718-26, 2000; Tonks, Nat Rev. Mol Cell Biol 7:833-46, 2006). Por tanto, pueden usarse ácidos nucleicos que expresan ARNhp-SHP-2 y ARNhp-TC-PTP en los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

C. Transcripción específica de células beta

El tercer aspecto en el enfoque de CNIP se refiere al nivel de expresión génica e implica un activador transcripcional o factor de transcripción, que se utiliza como atrayente para converger y enfocar el efecto del metabolismo de la glucosa y los efectos metabólicos/moleculares generados por glucocinasa, y el (los) receptor(s) de tirosina cinasa y receptor(es) asociado(s) a tirosina cinasa para formar células beta en el páncreas adulto. El término "transcripción" se refiere al proceso de copiar una secuencia de ADN de un gen en un producto de ARN, generalmente realizado por una ARN polimerasa dirigida a ADN usando el ADN como molde. Cada sistema tiene un atrayente modulador, como en la física. En un sistema caótico, la dirección del punto final de la red seguirá a la fuerza del atrayente. Desde un punto de vista simplista, la diana de impacto de un proyectil dependerá de la fuerza inicial de propulsión combinada con la resistencia al aire y el efecto de la gravedad sobre el proyectil. Las fuerzas iniciales, resistencia al aire y gravedad, actuarán en sinergia como un atrayente para determinar el destino final del proyectil. El organismo vivo es un sistema dinámico no lineal que existe en un estado "caótico". Al nivel transcripcional, la expresión de un conjunto de genes sigue sin cambiar y aquellos genes se llaman genes "de mantenimiento". Llevan a cabo las funciones rutinarias de la célula, mientras que otras clases de genes se expresan en respuesta a estímulos medioambientales. En la adaptación de células beta pancreáticas a un estrés fisiológico, la regulación por incremento de la expresión génica es esencial para la inducción de la formación de células beta pancreáticas (Bouwens y Rooman, Physiol Rev 85:1255-1270, 2005). Un mediador clave de esta respuesta adaptativa a un estrés fisiológico al nivel de expresión génica implica la activación de atrayente(s) modular(es) en forma de factores de transcripción (Albert y Barabasi, Rev Mod Physics 74:47-97, 2002; Albert y Othmer, J Theor Biol 223,1-18, 2003). Por tanto, el enfoque de CNIP incluye factor(es) de transcripción (como atrayente modular) que participan en la formación de células beta en el páncreas adulto en respuesta a estrés fisiológico.

Podrían usarse expresión en exceso de Pdx-1 solo con una fuerza de convergencia sinérgica de otros FT para canalizar el patrón de expresión génica de CNIP para inducir la formación de células beta pancreáticas. Por tanto, otros FT implicados en la formación de células beta pancreáticas adultas y que pueden aumentar el efecto de Pdx-1 sobre la formación de células beta *in vivo* se describen en el presente documento. En ciertos aspectos, pueden usarse los FT implicados en la formación de células beta. Pueden excluirse FT implicados en la formación de otras células endocrinas. Los FT implicados en la formación de células beta pancreáticas en el periodo después del desarrollo añadidos en combinación con o en lugar de Pdx-1 incluyen: NeuroD, Isl1, Nkx6.1 y Pax4. También pueden usarse compuestos antidiabéticos tales como tiazolidindionas antidiabéticas (por ejemplo, troglitazona) conjuntamente con FT para aumentar la formación de células beta. Por ejemplo, la troglitazona aumenta la expresión de Pdx-1 en islotes de ratón mediante el elemento de respuesta del receptor gamma activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR γ) funcional en el promotor de Pdx-1 (Gupta et al., J Biol Chem. 283(47):32462-70, 2008). También se contempla la inducción de Pdx-1 mediante modulación positiva del elemento de respuesta de PPAR γ en el promotor del gen Pdx-1.

D. Composiciones terapéuticas

En ciertos aspectos, 1, 2, 3 o más de los restos terapéuticos descritos en el presente documento pueden combinarse en una o más composiciones o administrarse en combinación. En un aspecto, se proporcionan uno o más restos terapéuticos como una mezcla de 1, 2, 3 o más vector(es) de administración nucleica y/o agente(s) terapéutico(s). Tal mezcla puede administrarse por vía oral, localmente, o por vía sistémica como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, 2, 3 o más de los restos terapéuticos pueden unirse para crear una composición bivalente, trivalente o tetravalente. Una composición tal puede administrarse por vía oral, localmente o por vía sistémica como se describe en el presente documento. En ciertos aspectos, tales composiciones se administran por vía oral. En otros aspectos, las composiciones se inyectan o se infunden localmente.

En aún un aspecto adicional, 1, 2, 3 o más restos terapéuticos pueden unirse en una molécula por sistemas de adaptadores químicos. Una composición tal puede administrarse por vía oral, localmente o por vía sistémica como se describe en el presente documento.

II. Composiciones de ácido nucleico

El término "vector de ácido nucleico" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que puede insertarse una secuencia de ácidos nucleicos para introducción en una célula donde puede ser replicada, transcrita y/o traducida (es decir, expresada). Una secuencia de ácidos nucleicos puede ser "exógena", que significa que es extraña a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es "endógena" a la célula pero en una posición dentro de la célula hospedadora en la que la secuencia generalmente no se encuentra. En ciertos aspectos, un vector exógeno puede codificar un ácido nucleico endógeno. Vectores de ácido nucleico incluyen plásmidos, cósmidos, genomas virales y otros vectores de expresión (bacteriófago, virus de animal y virus de planta), cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC), y similares. Dada la presente divulgación, un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (véanse, por ejemplo, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, New York City, NY, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

El término "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz de ser traducido. En algunos casos, moléculas de ARN son entonces traducidas en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no son traducidas, por ejemplo, en la producción de ARN inhibidor, moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia codificante operativamente unida en una célula hospedadora particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que sirven a otras funciones también y se describen en el presente documento.

Ciertos aspectos implican el uso de ácidos nucleicos que codifican componentes inductores de células beta. Ejemplos de ácidos nucleicos incluyen GK como se proporciona en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4; ARNhp de PTB1B como se proporciona en SEQ ID NO: 2; y Pdx-1 como se proporciona en SEQ ID NO: 3; o el equivalente como se reconocería por un experto en la materia. En ciertos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es el 80, 85, 90, 95, 98 o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1, 2, 3 y/o 4. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención codifican proteínas que son el 80, 85, 90, 95, 98 o el 100 % idénticas a las proteínas de SEQ ID NO: 5 (GK) o SEQ ID NO: 6 (Pdx-1) y mantienen la actividad apropiada.

Las secuencias pueden modificarse, dada la capacidad de varios codones diferentes para codificar un único aminoácido, aunque todavía codifiquen la misma proteína o polipéptido. La optimización de la selección de codones también puede ser realizada en vista del organismo particular usado para la expresión.

A. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácidos nucleicos en la que están controlados la iniciación y tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos en los que proteínas y moléculas reguladoras pueden unirse, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácidos nucleicos. Los términos "operativamente posicionado", "operativamente unido", "bajo el control" y "bajo el control de la transcripción" significan que un promotor está en una localización funcional correcta y/u orientación en relación con una secuencia de ácidos nucleicos para controlar la iniciación de la transcripción y/o expresión de esa secuencia.

Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona posicionando el sitio de inicio para la síntesis de ARN. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación de la transcripción. Normalmente, éstos se localizan en la región 30-110 pb en la dirección 5' del sitio de inicio, aunque también se ha mostrado que varios promotores contienen elementos funcionales en la dirección 3' del sitio de iniciación. Para poner una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del marco de lectura transcripcional se posiciona "en la dirección 3'" (es decir, 3') del promotor elegido. El promotor "en la dirección 5'" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN. La separación entre elementos promotores frecuentemente es flexible, de manera que la función del promotor se preserva cuando los elementos se invierten o se mueven los unos con respecto a los otros. Dependiendo del promotor, parece que elementos individuales pueden funcionar tanto cooperativamente como independientemente para activar la transcripción. Un promotor puede o puede no usarse conjuntamente con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en *cis* que participa en la activación transcripcional de una secuencia de ácidos nucleicos.

Un promotor puede ser uno naturalmente asociado a una secuencia de ácidos nucleicos, como puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes en 5' localizadas en la dirección 5' del segmento codificante y/o exón. Un promotor tal puede denominarse "endógeno" u "homólogo". Similarmente, un potenciador puede ser uno naturalmente asociado a una secuencia de ácidos nucleicos, localizado tanto en la dirección 3' como en la dirección 5' de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrán ciertas ventajas posicionando el ácido nucleico bajo el control de un promotor recombinante, exógeno o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente se asocia a una secuencia de ácidos nucleicos en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo también se refiere a un potenciador normalmente no asociado a una secuencia de ácidos nucleicos en su entorno natural. Tales

promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores que "no se producen naturalmente", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones transcripcionales reguladoras, y/o mutaciones que alteran la expresión.

- 5 Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirige eficazmente la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, célula, tejido, órgano u organismo elegido para la expresión. Aquellos expertos en la materia de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. I. 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Los promotores empleados
10 pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles bajo las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas recombinantes y/o péptidos. Un promotor puede ser heterólogo o endógeno.

- Además, también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según, por ejemplo, la base de datos de promotores eucariotas EPDB, internet en epd.isb-sib.ch/) para accionar la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplásmico T3, T7 o SP6 es otra posible realización. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplásmica de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, tanto como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión genética adicional.
15

- En ciertos aspectos, un ácido nucleico de la invención puede comprender un promotor no inducible o inducible que se expresará específicamente en los tejidos pancreáticos. Tales promotores no inducibles incluyen promotores de páncreas específicos de tejido del gen de insulina, gen de glucagón, gen de amilasa, etc. Tales promotores inducibles incluyen promotores específicos del páncreas bajo el control del elemento de respuesta de glucosa o promotor específico del páncreas bajo el control de un elemento de respuesta que es inducible por productos químicos, péptido, ligando o metabolitos.
20

B. Señales de iniciación

- 25 También puede requerirse una señal de iniciación específica para la eficaz traducción de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede que se necesite proporcionar señales de control de la traducción exógenas, que incluyen el codón de iniciación ATG. Un experto habitual en la materia podría determinar fácilmente esto y proporcionar las señales necesarias. Es muy conocido que el codón de iniciación debe estar "en marco" con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción del inserto completo. Las señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser tanto naturales como sintéticas. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.
30

C. Sitios de clonación múltiple

- Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácidos nucleicos que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de las cuales puede usarse conjuntamente con tecnología recombinante convencional para digerir el vector. "Digestión con enzima de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están comercialmente disponibles. El uso de tales enzimas es ampliamente entendido por aquellos expertos en la materia. Frecuentemente, un vector se linealiza o fragmenta usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que secuencias exógenas se ligen al vector. "Ligación" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o pueden no ser contiguos entre sí. Las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligación son muy conocidas para aquellos expertos en la materia de la tecnología recombinante.
35
40

D. Señales de terminación

- 45 Los vectores o construcciones de la presente invención generalmente comprenderán al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" comprende las secuencias de ADN que participan en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Así, en ciertas realizaciones se contempla una señal de terminación que termina la producción de un transcrito de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para lograr niveles de mensajero deseables.

- 50 Terminadores contemplados para su uso en la invención incluyen cualquier terminador conocido de la transcripción descrita en el presente documento o conocida para un experto habitual en la materia, que incluye, pero no se limita a, las secuencias de terminación tales como el terminador de la hormona de crecimiento bovina o secuencias de terminación virales, tales como el terminador SV40. En ciertas realizaciones, la señal de terminación puede ser una falta de secuencia transcribible o traducible, tal como debido a una truncación de secuencias.
55

E. Elementos reguladores postranscripcionales (PRE)

La regulación postranscripcional es el control de la expresión génica al nivel de ARN, es decir, entre la transcripción y la traducción del gen. En ciertos aspectos, se usa el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). WPRE aumenta los niveles de transcritos nucleares y facilita la exportación de ARN. WPRE puede facilitar otras etapas en el procesamiento de ARN, dirigiendo ARN que normalmente serían degradados dentro del núcleo para ser eficientemente expresados. El WPRE también puede funcionar para facilitar la generación de complejos de ARN-proteína que protegerían los transcritos recién sintetizados de la degradación en el núcleo (Zufferey et al., Journal of Virology, 73: 2886-2892, 1999 y patente de EE.UU. 6284469).

F. Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente expresión eucariota, normalmente se incluirá una señal de poliadenilación para efectuar la apropiada poliadenilación del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la satisfactoria práctica de la invención, y puede emplearse cualquier secuencia tal. Realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, conveniente y conocida por funcionar bien en diversas células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplásmico.

G. Orígenes de replicación

Con el fin de propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (frecuentemente llamados "ori"), que es una secuencia de ácidos nucleicos específica en la que se inicia la replicación. Alternativamente puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es levadura.

H. Marcadores de selección y de exploración

En ciertas realizaciones de la invención, células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo la fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativo es uno en el que su presencia previene su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

Normalmente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basándose en la implementación de condiciones también se contemplan otros tipos de marcadores que incluyen marcadores de exploración tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, pueden utilizarse enzimas de exploración tales como la timidina cinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con citometría de flujo asistida por fluorescencia (FACS) y/o inmunohistoquímica. No se cree que el marcador usado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores de selección y de exploración son bien conocidos para un experto en la materia.

III. Composiciones de polipéptidos

Pueden hacerse modificaciones y/o cambios en la composición de aminoácido de los polipéptidos, y así la presente invención contempla variación en secuencias de los polipéptidos, y ácidos nucleicos que los codifican, donde son, sin embargo, capaces de retener actividad sustancial con respecto a los aspectos terapéuticos, preventivos y curativos de la presente invención.

El equivalente funcional biológico puede comprender un polinucleótido que ha sido manipulado para contener distintas secuencias, mientras que al mismo tiempo retiene la capacidad para codificar el péptido "no mutante" o péptido estándar. Esto puede llevarse a cabo mediante la degeneración del código genético, es decir, la presencia de múltiples codones, que codifican los mismos aminoácidos. En un ejemplo, un experto en la materia puede desear introducir una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción en un polinucleótido mientras que no altere la capacidad de ese polinucleótido para codificar una proteína.

En otro ejemplo, un polinucleótido puede codificar un equivalente funcional biológico con cambios más significativos. Ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos con otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos, sitios de unión sobre moléculas de sustrato, receptores, y similares. Los llamados cambios "conservativos" no alteran la actividad biológica de la proteína, ya que el cambio estructural no es uno que afecte la capacidad de la proteína para llevar a cabo su función designada. Así, se contempla por los inventores que pueden

hacerse diversos cambios en la secuencia de genes y proteínas desveladas en el presente documento, mientras que todavía se cumplen los objetivos de la presente invención.

En términos de equivalentes funcionales, es bien entendido por el experto que, inherente en la definición de una proteína y/o polinucleótido "equivalente biológicamente funcional", está el concepto de que existe un límite al número de cambios que pueden hacerse dentro de una porción definida de la molécula mientras que retiene una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Equivalentes biológicamente funcionales se definen así en el presente documento como aquellas proteínas (y polinucleótidos) en las que pueden estar sustituidos aminoácidos seleccionados (o nucleótidos). En ciertos aspectos, un polipéptido es el 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o el 100 % idéntico a la forma no mutante del polipéptido. En ciertos aspectos, se usan el (los) polipéptido(s) el 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o el 100 % idénticos a SEQ ID NO: 5 o 6 o ácidos nucleicos que los codifican.

En general, cuanto más corta sea la longitud de la molécula, menos cambios pueden hacerse dentro de la molécula mientras que se retiene la función. Dominios más largos pueden tener un número intermedio de cambios. La proteína de longitud completa tendrá la mayor tolerancia para un número más grande de cambios. Sin embargo, debe apreciarse que ciertas moléculas o dominios que son altamente dependientes de su estructura pueden tolerar poca o ninguna modificación. La función de un polipéptido puede ser determinada usando diversos ensayos conocidos para detectar la actividad del polipéptido de interés.

Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y/o similares. Un análisis del tamaño, forma y/o tipo de los sustituyentes de cadena lateral del aminoácido revela que la arginina, lisina y/o histidina son todos restos positivamente cargados; que la alanina, glicina y/o serina tienen todos un tamaño similar; y/o que la fenilalanina, triptófano y/o tirosina tienen todos una forma generalmente similar. Por tanto, basándose en estas consideraciones, la arginina, lisina y/o histidina; alanina, glicina y/o serina; y/o fenilalanina, triptófano y/o tirosina se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

Para efectuar cambios más cuantitativos, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. Cada aminoácido ha sido asignado a un índice hidropático basándose en su hidrofobia y/o características de carga, éstas son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y/o arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático de aminoácidos en conferir función biológica interactiva a una proteína es generalmente entendida en la materia (Kyte & Doolittle, 1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos con otros aminoácidos que tienen un índice hidropático similar y/o puntuación y/o todavía retienen una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , son particularmente preferidos aquellos que están dentro de ± 1 , y/o son incluso más particularmente preferidos aquellos dentro de $\pm 0,5$.

También se entiende en la materia que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente basándose en la hidrofilia. Como se detalló en la patente de EE.UU. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al hacer cambios basados en valores de hidrofilia similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de ± 2 , son particularmente preferidos aquellos que están dentro de ± 1 , y/o son incluso más particularmente preferidos aquellos dentro de $\pm 0,5$.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos recombinantes que se describen en el presente documento comprenden dominios de transducción de proteína. Los dominios de transducción de proteína (PTD) tienen la capacidad de translocar a través de membranas biológicas. Los PTD son secuencias relativamente cortas (uno a 35 aminoácidos) que confieren esta evidente actividad de translocación a proteínas y otra carga macromolecular a las que están conjugadas, complejadas o fusionadas. El péptido TAT derivado de VIH (YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:7)), por ejemplo, se ha usado ampliamente para la administración intracelular de diversos agentes que oscilan de moléculas pequeñas a proteínas, péptidos, variedad de nanoportadores farmacéuticos y agentes de obtención de imágenes. Alternativamente, también pueden usarse mecanismos endocíticos mediados por receptor para la administración de fármacos intracelular. Por ejemplo, la vía de internalización mediada por el receptor de transferrina es una vía de captación celular eficiente que ha sido explotada para administración específica de sitio de fármacos y proteínas. Esto se logra ya sea químicamente por conjugación de transferrina con fármacos terapéuticos o proteínas o genéticamente por infusión de péptidos terapéuticos o proteínas en la estructura de transferrina. Las proteínas que existen naturalmente (tales como la proteína de unión a hierro transferrina) son muy útiles en esta área de direccionamiento de fármaco ya que estas proteínas son biodegradables, no tóxicas y no inmunogénicas. Los dominios de transducción de proteína incluyen, pero no se limitan a, PTD derivados de proteínas tales como virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) TAT (Ruben et al., J. Virol. 63:1-8, 1989), por ejemplo, GRKKRRQRRR (TA 48-57, SEQ ID NO:8); la proteína VP22 del tegumento del virus del herpes (Elliott y O'Hare Cell 88:223-33, 1997); la proteína homeótica de la proteína de *Drosophila melanogaster* Antennapedia (Antp) (PTD de penetratina; Derossi et

al. J. Biol. Chem. 271:18188-93, 1996); el péptido antimicrobiano de protegrina 1 (PG-1) SynB (por ejemplo, SynB1, SynB3 y SynB4; Kokryakov et al. FEBS Lett. 327:231-36, 1993); y factor de crecimiento de fibroblastos básico (Jans FASEB J. 8:841-47, 1994). Los PTD también incluyen PTD sintéticos, tales como, pero no se limitan a, péptidos de poliarginina (Futaki et al., J. Mol. Recognit. 16:260-64, 2003; Suzuki et al., J. Biol. Chem. 276:5836-40, 2001); transportano (Pooga et al., FASEB J. 12:67-77, 1988; Pooga et al., FASEB J. 15:1451-53, 2001); MAP (Oehlke et al., Biochim. Biophys. Acta. 1414:127-39, 1998); KALA (Wyman et al., Biochemistry 36:3008-17, 1997); y otros péptidos catiónicos, tales como, por ejemplo, diversos péptidos β -catiónicos (Akkarawongsa et al., Antimicrob. Agents and Chemother. 52(6):2120-29, 2008).

IV. Vectores de administración

10 En ciertos aspectos, se proporcionan componentes a un páncreas u otro órgano o tejido usando ácidos nucleicos que codifican o expresan tales componentes. Pueden usarse vectores de administración virales y no virales en los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, Syner-III). El término "ácidos nucleicos", "moléculas de ácidos nucleicos", "secuencias de ácidos nucleicos", "secuencias de nucleótidos" y "moléculas de nucleótido" se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que se especifique de otro modo, se refieren a un polímero de ácido desoxirribonucleicos, que incluyen ADNc, ADN, PNA, o polímeros de ácidos ribonucleicos (ARN).
15 El ácido nucleico puede obtenerse a partir de un extracto celular, ADN genómico o extragenómico, ácidos nucleicos virales, o moléculas artificialmente/químicamente sintetizadas. El término puede incluir ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos bicatenarios o monocatenarios.

A. Administración viral

20 La capacidad de ciertos virus para infectar células o entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor, y para expresar genes viralmente codificados ha hecho que sean candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños en células (por ejemplo, células de mamífero). Así, pueden utilizarse virus que codifican y expresan agentes para aumentar la actividad del metabolismo de la glucosa, aumentar la actividad de receptor de tirosina cinasa y aumentar la transcripción de genes asociados a células beta. Ejemplos no limitantes de vectores de virus que pueden usarse para administrar ácidos nucleicos se describen a continuación.

Vectores adenovirales. Un método particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores de adenovirus tienen una baja capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica se compensa por la alta eficacia de transferencia de genes producida por estos vectores. "Vector de expresión de adenovirus" se entiende que incluye aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el encapsidación de la construcción y (b) finalmente expresar una construcción específica de tejido o célula que se haya clonado en el mismo. El conocimiento de la organización genética o adenovirus, un virus de ADN bicatenario lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes trozos de ADN adenoviral con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, Semin. Virol. 3, 237-252, 1992).

35 *Vectores de AAV.* El ácido nucleico puede introducirse en la célula usando transfección asistida por adenovirus. Se ha informado de elevadas eficiencias de transfección en sistemas de células usando sistemas acoplados a adenovirus. El virus adenoasociado (AAV) tiene una baja frecuencia de integración y puede infectar células que no están en división, haciéndolos de este modo útiles para la administración de genes en células de mamífero en cultivo de tejido o *in vivo*. El AAV tiene un amplio espectro de huésped para infectividad. Se describen detalles con respecto a la generación y uso de vectores rAAV en las patentes de EE.UU. 5.139.941 y 4.797.368.

40 *Vectores retrovirales.* Los retrovirus tienen la capacidad de integrar sus genes en el genoma huésped, transfiriendo una gran cantidad de material genético extraño, infectando un amplio espectro de especies y tipos de células y encapsidándose en líneas celulares especiales. Con el fin de construir un vector retroviral de la vacuna de variante de proteína de unión a folato, un ácido nucleico (por ejemplo, uno que codifica una proteína de interés) se inserta en el genoma viral en el sitio de ciertas secuencias virales para producir un virus que sea deficiente en la replicación.
45 Con el fin de producir viriones, se construye una línea celular de encapsidación que contenga los genes gag, pol y env pero sin las LTR y componentes de encapsidación. Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retroviral y las secuencias de encapsidación, se introduce en una línea celular especial (por ejemplo, por precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de encapsidación permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se encapside en partículas virales, que después se secretan en el medio de cultivo. El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge después, opcionalmente se concentra y se usa para la transferencia de genes. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia variedad de tipos de células.

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia simia: VIS. Los vectores lentivirales se han generado atenuando múltiplemente los genes de la virulencia del VIH, por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef se delecionan haciendo el vector biológicamente seguro.

Los vectores lentivirales recombinantes pueden infectar células que no están en división y pueden usarse para la transferencia de genes tanto in vivo como ex vivo y expresión de secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, lentivirus recombinantes que pueden infectar una célula que no está en división en la que una célula huésped adecuada se transfecta con dos o más vectores que llevan las funciones de encapsidación, concretamente *gag*, *pol* y *env*, además de *rev* y *tat*, se describen en la patente de EE.UU. 5.994.136.

Puede elegirse como diana el virus recombinante por enlace de la proteína de una envuelta con un anticuerpo o un ligando particular para dirigirse a un receptor de un tipo de célula particular. Insertando de una secuencia (que incluye una región reguladora) de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor sobre una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico para diana. Tales vectores virales pueden ser dirigidos a células del páncreas.

Otros vectores virales. Pueden emplearse otros vectores virales en los métodos de la presente invención. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como virus de la variolovacuna (Ridgeway, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988; Baichwal y Sugden, en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986; Coupar et al., *Gene* 68:1-10, 1988), virus de sindbis, citomegalovirus y virus del herpes simple. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero (Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989; Ridgeway, en: *Vectores: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988; Baichwal y Sugden, en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986; Coupar et al., *Gene* 68:1-10, 1988; Horwich et al., *J. Virol.* 64:642-650, 1990).

Virus modificados. Un ácido nucleico que va a administrarse puede alojarse dentro de un virus infeccioso que se ha manipulado para expresar o se acopla a un ligando de unión específica. La partícula de virus se unirá de este modo específicamente a los receptores afines de la célula diana y administrará el contenido a la célula. Recientemente se desarrolló un novedoso enfoque para permitir el direccionamiento específico de vectores de virus basándose en la modificación química o genética de un virus por la adición química o manipulación recombinante de restos a o en proteínas de la superficie del virus. Una modificación tal usando restos de lactosa puede permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglucoproteína.

Se diseñó otro enfoque para dirigir los virus recombinantes en los que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de la superficie viral y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos pueden acoplarse mediante biotina usando estreptavidina (Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-83, 1989). Usando anticuerpos contra antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y de clase II demostraron la infección de una variedad de células humanas que alojaban aquellos antígenos de superficie con un virus ectotrópico *in vitro* (Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-83, 1989).

En ciertos aspectos, puede usarse un sistema adaptador, es decir, una molécula que se une tanto al vector de administración como a un receptor de células pancreáticas diana para facilitar la transducción en el páncreas. En un aspecto adicional, el uso de un receptor de vector viral nativo puede fusionarse con el ligando de direccionamiento del páncreas. En otro aspecto adicional, un anticuerpo biespecífico, dos anticuerpos acoplados juntos, pueden acoplarse al vector de administración resultando el vector de administración que tiene especificidad por las células pancreáticas diana. En ciertos aspectos, puede unirse un resto de direccionamiento al vector de administración por medios químicos. En aspectos adicionales, puede usarse un anticuerpo que se une a un dominio de unión de Ig genéticamente incorporado del vector de administración para potenciar la administración. En aspectos adicionales, pueden insertarse motivos de direccionamiento pequeños en la cápside, envuelta, unión viral, otras proteína de la superficie viral para dirigir a las células pancreáticas.

En ciertos aspectos, una construcción viral puede codificar dos componentes de proteína heteróloga (por ejemplo, GK y Pdx-1) y expresar una PTP1B de ARNhp. En un aspecto adicional, cada componente puede estar comprendido en virus individuales y separados.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a través del conducto pancreático mediante endoscopia. Brevemente, el paciente es sedado o anestesiado, y se inserta un endoscopio flexible por la boca, hasta el esófago, en el estómago, a través del píloro en el duodeno donde está la ampolla de Vater (la abertura del conducto biliar común y el conducto pancreático). El esfínter de Oddi es una válvula muscular que controla la abertura de la ampolla. La región puede ser directamente visualizada con la cámara endoscópica mientras que se realiza el procedimiento. Se inserta un catéter de plástico o cánula a través de la ampolla, y la composición inductora de células beta (por ejemplo, Syner-III) se introduce en el conducto biliar pancreático para dirigirse al páncreas. La composición inductora de células beta también puede administrarse por vía intravenosa acoplado un vector viral con un resto de direccionamiento del páncreas, por ejemplo, modificando la estructura de envuelta del vector viral para dirigirse solo a los tejidos pancreáticos.

B. Transfección mediada por lípidos

En otra realización de la invención, un ácido nucleico puede ser atrapado en una partícula de lípido tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de

fosfolípido y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípidos separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de disolución acuosa. Los componentes de lípidos experimentan transposición propia antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, en: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991). También se contempla un ácido nucleico complejado con lipofectamina (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

La administración de ácidos nucleicos mediada por lípidos y la expresión de ADN extraño *in vitro* ha sido muy satisfactoria (Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982; Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979; Nicolau et al., Methods Enzymol. 149:157-176, 1987). También se ha demostrado la viabilidad de la administración mediada por lípidos y la expresión de ADN extraño en células de embrión de pollo cultivadas, HeLa y de hepatoma (Wong et al., Gene 10:87-94 1980).

En ciertas realizaciones de la invención, una partícula de lípido puede complejarse con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha mostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada de ADN encapsulado por lípido (Kaneda et al., Science 243:375-378 1989). En otras realizaciones, una partícula de lípido puede complejarse o emplearse conjuntamente con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato et al., J. Biol. Chem. 266:3361-3364, 1991). En aún realizaciones adicionales, una partícula de lípido puede complejarse o emplearse conjuntamente con tanto HVJ como HMG-1. En otras realizaciones, un vehículo de administración puede comprender un ligando y una partícula de lípido.

En ciertos aspectos, los componentes descritos en el presente documento, que incluyen ARNhp de PTP1B y ácidos nucleicos que codifican Pdx-1 y glucocinasa, pueden administrarse por liposomas. Liposomas que contienen los ácidos nucleicos podrían administrarse por vía intravenosa y liberarse cuando llegaran a los tejidos pancreáticos. En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos de la invención se incorporan en liposomas que contienen ligandos químicamente acoplados que se presentan sobre la superficie del liposoma. Los ligandos se dirigen específicamente a células pancreáticas. Usando esta estrategia, pueden anclarse una variedad de ligandos o receptores, tales como anticuerpos, factores de crecimiento, citocinas, hormonas y toxinas, sobre la superficie del liposoma de manera que los componentes inductores de células beta puedan ser dirigidos a e introducidos en células pancreáticas.

C. Transfección mediada por receptor

Todavía además, puede suministrarse un ácido nucleico a una célula diana mediante vehículos de administración mediados por receptor. Éstos tienen la ventaja de la captación selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por un receptor, que sucederá en una célula diana. En vista de la distribución específica del tipo de célula de diversos receptores, este método de administración añade otro grado de especificidad a la presente invención.

Ciertos vehículos que eligen como diana genes mediados por receptor comprenden un ligando específico de receptor celular y un agente de unión a ácido nucleico. Otros comprenden un ligando específico de receptor celular al que el ácido nucleico que tiene que administrarse se ha unido de forma operativa. Se han usado varios ligandos para la transferencia de genes mediada por receptor (Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987; patente EP 0273085), que establece la operabilidad de la técnica. En ciertos aspectos de la presente invención, un ligando se elegirá para corresponderse con un receptor expresado específicamente en la población de células diana.

En otras realizaciones, un componente del vehículo de administración de ácido nucleico de un vehículo que elige como diana ácido nucleico específico de células puede comprender un ligando de unión específica en combinación con una partícula de lípido. El (Los) ácido(s) nucleico(s) a administrar están alojados dentro de la partícula de lípido y el ligando de unión específica está funcionalmente incorporado en la partícula de lípido. La partícula de lípido se unirá así específicamente al (a los) receptor(es) de una célula diana y administrará el contenido a una célula. Se ha mostrado que tales sistemas son funcionales usando sistemas en los que, por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la administración mediada por receptor de un ácido nucleico a células que muestran regulación por incremento del receptor de EGF.

En aún realizaciones adicionales, el componente del vehículo de administración de ácido nucleico de un vehículo de administración dirigida puede ser una propia partícula de lípido, que preferiblemente comprenderá uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica de células. Por ejemplo, lactosil-ceramida, un asialogangliósido terminal de galactosa, se ha incorporado en partículas de lípido y se observó que aumentaba la captación del gen de la insulina por los hepatocitos (Nicolau et al., Methods Enzymol. 149:157-176, 1987). Se contempla que las construcciones transformantes específicas del tejido de la presente invención pueden administrarse específicamente a una célula diana de una manera similar o como se describe en el presente documento.

D. Bombardeo con microproyectiles

Las técnicas de bombardeo con microproyectiles pueden usarse para introducir un ácido nucleico en al menos un orgánulo, célula, tejido u organismo (patentes de EE.UU. 5.550.318; 5.538.880; nº 5.610.042; y solicitud PCT WO 94/09699). Este método depende de la capacidad para acelerar microproyectiles recubiertos de ADN a una velocidad muy alta que les permite perforar membranas celulares y entrar en las células sin destruirlas (Klein et al.,

Nature 327, 70-73, 1987). Se conoce una amplia variedad de técnicas de bombardeo con microproyectiles en la técnica, muchas de las cuales son aplicables a la invención.

5 En este bombardeo con microproyectiles, una o más partículas pueden recubrirse con al menos un ácido nucleico y administrarse a células por una fuerza impulsora. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Un dispositivo tal se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motora. Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como tungsteno o partículas de oro o perlas. Partículas a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden tungsteno, platino y oro. Se contempla que en algunos casos la precipitación de ADN sobre partículas metálicas no sería necesaria para la administración de ADN a una célula receptora usando bombardeo con microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas pueden contener ADN en vez de recubrirse con ADN. Las partículas recubiertas de ADN puede aumentar el nivel de administración de ADN mediante bombardeo de partículas pero no son, de por sí, necesarias.

15 Puede transferirse ADN de plásmido desnudo a una célula por pistola de aire (pistola de genes). Podría inyectarse el plásmido Syner-III mediante el conducto pancreático usando el enfoque de pistola de genes con endoscopia para llegar a los tejidos pancreáticos. Los bombardeos de ADN de plásmido a través de una pistola de genes entran en la célula por presión física que abre los poros de membrana y/o facilitando la difusión del ADN de plásmido desnudo a través de la membrana celular.

E. Nanopartículas

20 Pueden incorporarse ácidos nucleicos de la invención en estructuras multicomponente tridimensionales de nanopartículas que se dirigen a tejidos pancreáticos u otros tejidos. Las nanopartículas usadas incluyen, pero no se limitan a, liposomas, polímeros, proteínas, micelas, dendrímeros, puntos cuánticos, nanocubiertas, nanocristales, nanopartículas de oro, nanopartículas paramagnéticas y nanotubos de carbono.

F. Administración génica hidrodinámica

25 Puede administrarse ADN de plásmido desnudo mediante el conducto pancreático empleando administración génica hidrodinámica. Puede ponerse un catéter con globo en el conducto pancreático. El catéter con globo colocado en el conducto pancreático se infla para infusión asistida por oclusión.

G. Electroporación

30 En ciertos aspectos, pueden ponerse un par de electrodos sobre o en tejidos pancreáticos u otros tejidos, y se depositan ácidos nucleicos de la invención sobre los electrodos de manera que el material genético se transfiere a los tejidos.

H. Transferencia génica facilitada por ultrasonidos

35 Pueden incorporarse los ácidos nucleicos de la invención en microburbujas que se inyectan por vía intravenosa. Cuando las microburbujas llegan al páncreas u otro tejido son dirigidas con ultrasonidos. A medida que las microburbujas se expanden y explotan, liberan los ácidos nucleicos en el páncreas. Las ondas de choque locales hacen que los ácidos nucleicos atraviesen las membranas celulares próximas.

I. Transferencia génica por aguja

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos de la invención se inyectan directamente en el páncreas u otro tejido usando una aguja.

V. Composiciones farmacéuticas

40 En vista de la presente memoria descriptiva, la determinación de una pauta de tratamiento apropiada (por ejemplo, dosificación, frecuencia de administración, sistémica frente a local, etc.) está dentro de la experiencia de la materia. Para administración, los componentes descritos en el presente documento se formularán en una forma farmacéutica unitaria (disolución, suspensión, emulsión, etc.) en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son normalmente no tóxicos y no terapéuticos. Ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. También pueden usarse vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles y oleato de etilo. Un vehículo preferido es 5 % (p/p) de albúmina humana en solución salina. El vehículo puede contener cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes.

50 Las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento, además de sus equivalentes biológicos, pueden administrarse independientemente o en combinación por cualquier vía adecuada. Ejemplos de administración parenteral incluyen intravenosa, intrarterial, intramuscular, intraperitoneal, y similares. Las vías de administración descritas en el presente documento son simplemente un ejemplo y de ninguna forma limitantes.

La dosis de las composiciones terapéuticas administradas a un animal, particularmente en un ser humano, según realizaciones de la invención, debe ser suficiente para producir una respuesta deseada en el sujeto durante un periodo de tiempo razonable. Se sabe que la dosificación de composiciones terapéuticas depende de una variedad de factores, que incluyen la concentración de la composición terapéutica particular empleada, la edad, especie, afección o estado de enfermedad, y el peso corporal del animal.

Además, la dosis y pauta posológica dependerán principalmente del tipo de daño biológico al huésped, el tipo de sujeto, los antecedentes del sujeto y el tipo de composición terapéutica que se administra. El tamaño de la dosis será determinado por la vía, momento preciso y frecuencia de administración, además de la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar a la administración de una composición terapéutica particular y el efecto fisiológico deseado. También se sabe que diversas afecciones o estados de enfermedad, en particular, afecciones o estados de enfermedad crónicos, puede requerir tratamiento prolongado que implica múltiples administraciones.

Por tanto, la cantidad de la composición terapéutica debe ser eficaz para lograr un índice terapéutico potenciado. Si se emplean dosis múltiples, la frecuencia de administración dependerá, por ejemplo, del tipo de sujeto. Un experto en la materia puede determinar con experimentación rutinaria la vía y frecuencia de administración apropiadas en un sujeto dado que son las más eficaces en cualquier caso particular. Dosis y pautas posológicas adecuadas pueden ser determinadas por técnicas de búsqueda de intervalos convencionalmente conocidas. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas, que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. A partir de aquí, la dosificación se aumenta incrementos pequeños hasta que se obtiene el efecto óptimo en las circunstancias.

Las composiciones terapéuticas para su uso en las realizaciones de la invención generalmente incluyen vehículos. Estos vehículos pueden ser cualquiera de aquellos convencionalmente usados y solo están limitados por la vía de administración y consideraciones químicas y físicas, tales como solubilidad y reactividad con el agente terapéutico. Además, la composición terapéutica puede formularse como composiciones poliméricas, complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, liposomas, microesferas, microcápsulas, y similares, sin limitación.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, soportes o diluyentes, son muy conocidos y están fácilmente disponibles. Se prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que es químicamente inerte con respecto a la composición terapéutica y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

La elección de excipiente será determinada, en parte, por la composición terapéutica particular, además de por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica usadas en las realizaciones de la invención. Por ejemplo, las formulaciones no limitantes pueden ser formulaciones inyectables tales como, pero no se limitan a, aquellas para inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, y similares, y formulaciones orales tales como, pero no se limitan a, disoluciones líquidas, que incluyen suspensiones y emulsiones, cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas para chupar, y similares. Formulaciones no limitantes adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que incluyen principios no activos tales como antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solubilizantes, espesantes, estabilizadores, conservantes, tensioactivos, y similares. Las disoluciones pueden incluir aceites, ácidos grasos, que incluyen detergentes y similares, además de otros componentes muy conocidos y comunes en tales composiciones, sin limitación.

VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos, además de las figuras, están incluidos para demostrar ciertas realizaciones de la invención. Debe apreciarse por aquellos expertos en la materia que las técnicas desveladas en los ejemplos o figuras representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de los métodos descritos, y así puede considerarse que constituyen modos para su práctica.

EJEMPLO 1

FORMACIÓN DE CÉLULAS BETA EN PÁNCREAS ADULTO

A. Resultados

Para fines de ilustración, los restos terapéuticos incluyen Lentivirus-CMV-Glucocinasa (GK), Lentivirus-H1-PTP1B de ARNhp; y Lentivirus-CMV-PDX-1. La composición de control incluye mezcla de Lentivirus-CMV-GFP y Lentivirus-H1-ARNhp inyectada a la misma concentración que la composición terapéutica. Cuatro semanas después de la inyección se detectó la expresión en exceso *in vivo* de PDX-1 y GK, y la supresión de la expresión de PTP1B en el páncreas de ratón. Se detectó expresión en exceso de glucocinasa en los islotes y en tejidos exocrinos. La expresión de glucocinasa en los tejidos exocrinos confirma la expresión en exceso de la glucocinasa por la composición terapéutica, ya que los tejidos pancreáticos solo expresan glucocinasa en células endocrinas. Se detecta expresión en exceso de Pdx-1 usando una marca c-Myc incorporada en el ADNc de Pdx-1 para diferenciar

entre expresión exógena y endógena. También se detectó PTP1B de ARNhp que co-expresa GFP. Se confirmó la expresión de proteínas por transferencia Western.

Primer aspecto del enfoque de CNIP: Un objetivo del enfoque de CNIP es aumentar el metabolismo de la glucosa en el páncreas para inducir la formación de células beta pancreáticas. Para que la glucosa entre en la vía glucolítica, primero debe entrar en el espacio intracelular a través de un sistema de transporte de glucosa de la membrana. Los transportadores de glucosa, Glut 1 y Glut 3, están presentes en tejidos pancreáticos humanos exocrinos y endocrinos, y Glut 2 está presente en la célula beta pancreática (Coppieters et al., Diabetes Metab Res Rev 27: 746-754, 2011). Sin embargo, el transporte de glucosa no es la etapa limitante de la velocidad para la entrada de glucosa en la vía glucolítica (Wasserman et al., J. Exp. Biol. 214:254-262, 2011). La primera etapa limitante de la velocidad para el metabolismo de la glucosa en la vía glucolítica es al nivel de fosforilación de glucosa por hexocinasa. La fosforilación de glucosa por hexocinasa produce el metabolito glucosa 6-fosfato (G-6-P). Las células beta pancreáticas contienen una hexocinasa tipo IV, llamada glucocinasa (GK). La glucocinasa no es alostéricamente inhibida por la acumulación de G-6-P intracelular, a diferencia de otras hexocinasas. Por tanto, para glucocinasa, la cantidad y actividad de la enzima glucocinasa regula la velocidad de flujo de glucosa mediante la glicólisis. Para otros miembros de la familia de hexocinasa, la inhibición de producto por G-6-P es el regulador clave de la actividad enzimática y, por tanto, la entrada de glucosa en la vía glucolítica. Si la glucosa no es fosforilada por hexocinasa, no puede experimentar metabolismo adicional y no puede generar ninguna señal a la maquinaria transcripcional para inducir expresión génica (Doiron et al., J Biol Chem. 269: 10213-10216, 1994 y J Biol Chem. 271:5321-5324, 1996). Por tanto, en ciertos aspectos, la glucocinasa puede incluirse en una mezcla de CNIP para inducir la formación de células beta pancreáticas.

Los inventores diseñaron una construcción de vector lentiviral que expresaba el gen de glucocinasa bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) (FIG. 2A). La construcción de vector lentiviral incluyó un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) en la región no traducida 3' de la secuencia codificante, que aumentó el nivel de expresión del transgén. WPRE funciona dentro del núcleo para estimular la expresión génica postranscripcionalmente aumentando los niveles de transcritos nucleares y aumentando enormemente la semivida de ARN (Zufferrey et al., J. Virol. 73:2886-289, 1999). Se subclonó el gen de glucocinasa (GCK) de ratón en el vector pEntCMV-WPRE y la inserción se verificó por secuenciación de ADN. Se trató pEnt-GCK con la enzima LR Clonase II (Invitrogen) y se unió a un vector pLenti. El producto de recombinación se transformó en células de *E. coli*. Después de la incubación durante la noche, se seleccionaron los clones positivos, y se purificó ADN de plásmido. Se transfectaron pEnt-GCK y pLenti-GCK en células 293. 48 horas después de la transfección, las células se lisaron en tampón SDS-PAGE y se sometieron a electroforesis en gel al 4-20 % de SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western. La transferencia Western se llevó a cabo usando el anticuerpo anti-GCK a una dilución 1:1000, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La membrana de transferencia Western se reveló usando reactivos de ECL.

Se usa pLenti-GCK para la producción de vector lentiviral puro de alto título. Se inyectarán Lenti-GCK directamente en el páncreas de ratones adultos como se ha descrito anteriormente. Se usarán los ratones adultos C57BL/6 (8 semanas de edad; de Charles River, Wilmington, MA) para el experimento *in vivo* que se dirige al páncreas con construcción de vector lentiviral.

Se ha mostrado que la elevada expresión de glucocinasa con un vector plasmídico aumenta el conjunto de glucosa-6-fosfato (G-6-P) (Doiron et al., J Biol Chem. 269: 10213-10216, 1994). La glucosa 6-fosfato es un producto intermedio clave que está situado en la unión de varias vías metabólicas (glucólisis, gluconeogénesis, vía de pentosa fosfato, glucogénesis y glucogenólisis). Doiron et al. (1996) demostraron que la señal de glucosa a la maquinaria transcripcional está mediada por xilulosa 5-fosfato, que es un metabolito producido por la vía de pentosa fosfato. Como se demuestra por Doiron, la xilulosa 5-fosfato es el principal metabolito responsable de mediar en la inducción de maquinaria transcripcional por metabolismo de la glucosa. La enzima clave que regula el flujo metabólico mediante la vía de pentosa fosfato es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). G-6-P entra en la vía de pentosa fosfato mediante la acción de la enzima G6PD. Por tanto, en el desarrollo del enfoque de CNIP de los presentes inventores, puede usarse la combinación de Lenti-CGK y Lenti-G6PD para canalizar la glucosa 6-fosfato en la vía de pentosa fosfato para potenciar la formación de xilulosa-5-fosfato que media en los efectos de metabolismo transcripcional de la glucosa. Otra enzima importante en la formación de xilulosa 5-fosfato es transcetolasa (TK), que está localizada más abajo en la vía de pentosa fosfato. Por tanto, un enfoque alternativo será combinar Lenti-TK con Lenti-CGK para aumentar el efecto de la expresión génica regulada por el metabolismo de la glucosa. Puede usarse la acción sinérgica de todas las moléculas (Lenti-CGK, Lenti-G6PD y Lenti-TK) para activar la maquinaria transcripcional bajo el control del metabolismo de la glucosa y aumentar la formación de células beta.

Segundo aspecto del enfoque de CNIP: El segundo aspecto del enfoque de CNIP incluye aumentar la actividad de tirosina cinasas de receptor de membrana y la actividad de receptor asociado a tirosina cinasa. El metabolismo de la glucosa es un mecanismo importante implicado en la formación de células beta en el páncreas adulto. Otro sistema implicado en la formación de células beta es la unión de ligando a receptor(es) de tirosina cinasa (Vasavada et al., Int J Biochem Cell Biol. 38:931-950, 2006). El aumento en la masa de células beta pancreáticas en respuesta a estrés fisiológico (es decir, embarazo) está mediado por la hormona de crecimiento, prolactina, y lactógeno placentario que funciona mediante el receptor de prolactina. El receptor de prolactina no tiene actividad intrínseca de tirosina cinasas, pero interactúa con miembros de la familia de la cinasa de Janus de tirosina cinasas. El receptor

de prolactina es parte de la familia de receptor(es) asociado(s) a tirosina cinasa. La familia de cinasa de Janus de tirosina cinasas es responsable del aumento en la masa de células beta en respuesta a cambios hormonales que se producen en el embarazo (Vasavada et al., Int J Biochem Cell Biol. 38:931-950, 2006). La acción de insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento epidérmico también aumenta la masa de células beta activando un receptor de tirosina cinasa unido a membrana (Vasavada et al., Int J Biochem Cell Biol. 38:931-950, 2006). Por tanto, los lactógenos (incluyendo hormona de crecimiento, prolactina y lactógeno placentario), insulina, factores de tipo insulina, factor de crecimiento de hepatocitos y receptor de factor de crecimiento epidérmico requieren la activación de tirosina cinasa(s) para aumentar la masa de células beta pancreáticas.

Se ha mostrado que la proteína-tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) inhibe la capacidad de la insulina, receptor de factores de crecimiento similares a la insulina, prolactina y factor de crecimiento de hepatocitos para activar tirosina cinasa(s) (Aoki y Matsuda, J. Biol. Chem. 275:39718-39726, 2000; Kakazu et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 49:2927-2935, 2008; Tonks, Nat Rev. Mol Cell Biol 7:833-46, 2006). Por consiguiente, una molécula que puede incluirse en una mezcla de CNIP es un inhibidor o ARN inhibidor (por ejemplo, ARNhp) que se dirige a PTP1B. La supresión de la producción de proteínas PTP1B por ARNhp aumentará la actividad de tirosina cinasas de receptor implicada en la formación de células beta en el páncreas adulto en respuesta a la unión de una concentración fisiológica de la hormona correspondiente. Se ha introducido PTP1B de ARNhp en una construcción de lentivirus usando el mismo método descrito anteriormente para lenti-CGK bajo el control del promotor de H1 polimerasa (Doiron et al., Diabetologia 55:719-728, 2012) (FIG. 2C). El promotor de polimerasa III H1 es ubicuamente activo en todas las células, debido a la función de mantenimiento de la polimerasa III. Se proporcionó lenti-ARNhp-PTP1B al páncreas como se ha descrito anteriormente.

PTP1B de ARNhp de lentivirus. Se construyó una iARN de horquilla pequeña en el vector pEQU6. Las secuencias diana tienen 20 nt en longitud (GCCAGGACATTCGACATGAA SEQ ID NO: 2). Las secuencias de iARNhp se verificaron por secuenciación de ADN.

Se realizaron experimentos de co-transfección usando el plásmido de expresión de gen diana pEnt-PTP1B y un vector pEQ-PTP1B-ARNhp. El cuadro a continuación describe el componente de cada reacción. 48 horas después de la transfección, se lisaron células en tampón SDS-PAGE y se sometieron a electroforesis en gel al 4-20 % de SDS-PAGE y análisis de transferencia Western. La transferencia Western se llevó a cabo usando el anticuerpo anti-PTP1B a una dilución 1:1000. La membrana se evaluó usando reactivos de ECL. Para cada 6 pocillos:

	células 293	PTP1B-ARNhp
ADNc de PTP1B de ratón		1,0
pEQ-ARNhp de PTP1B		2,0
pEQ-mezcla-ARNhp	3,0	
ADN total	3,0	3,0

Tercer aspecto del enfoque de CNIP: Un tercer aspecto que puede incluirse en los métodos descritos en el presente documento incluye aumentar la expresión génica mediante factor(es) de transcripción para integrar el efecto del metabolismo de la glucosa (Aspecto 1) y la estimulación de actividad de la familia de receptor de tirosina cinasa un (Aspecto 2) para inducir la formación de células beta en el páncreas.

Se han propuesto diferentes modelos para explicar la difusión facilitada de factor(es) de transcripción para unirse a su secuencia de ADN diana en el núcleo. Un modelo propone que el factor transcripcional (FT) se une al ADN por difusión facilitada. Primero, el FT interacciona con el ADN al azar en un sitio no específico. Después de la interacción de FT inicial con las moléculas de ADN, por difusión facilitada, el FT se mueve de su sitio no específico inicial a su secuencia diana por 'deslizamiento' a lo largo del ADN. Como el FT se enrolla a lo largo del ADN y encuentra su sitio de unión correspondiente, induce la activación o inhibición de la maquinaria transcripcional. Independientemente del modelo propuesto para explicar cómo el FT alcanza su sitio de unión de ADN, todos los modelos y experimentos propuestos incluyen la difusión facilitada con movimiento aleatorio del FT para encontrar su sitio de activación o inhibición en la maquinaria transcripcional. Una acción de señalización del metabolismo de la glucosa a la maquinaria transcripcional es aumentar la probabilidad de la unión de FT a la molécula de ADN (Doiron et al., J Biol Chem. 271:5321-5324, 1996). De hecho, la señalización del metabolismo de la glucosa a la maquinaria transcripcional induce la expresión de FT y la translocación de FT del citoplasma al núcleo enciende los genes inducidos por glucosa (Doiron et al., J Biol Chem. 271:5321-5324, 1996). Por consiguiente, el mecanismo biofísico por el que los FT aumentan la expresión génica inducida por glucosa depende del nivel de cantidad de FT presente en el núcleo. De hecho, cuando aumenta la cantidad de FT en el núcleo, aumentaron las probabilidades de interaccionar con las moléculas de ADN para encontrar aleatoriamente su sitio de unión específica (Mitancher et al., Endo Rev 18:520-540, 1997). El aumentar la expresión de genes implicada en la formación de células beta en el

páncreas adulto puede llevarse a cabo o potenciarse expresando en exceso FT clave que activan la vía de formación de células beta.

Uno de los principales factores de transcripción implicados en la formación de células beta después del nacimiento es Pdx-1 (Doiron y DeFronzo, *Int J Endocrinol Metab.* 9:356-357, 2011). Pdx-1 tiene distintos efectos antes y después del nacimiento en el páncreas (Doiron y DeFronzo, *Int J Endocrinol Metab.* 9:356-357, 2011). En la etapa embrionaria, Pdx-1 es esencial para el desarrollo pancreático y se expresa en tejidos endocrinos y exocrinos. Sin embargo, después del nacimiento, Pdx-1 se expresa solo en células beta pancreáticas y células de somatostatina. Por tanto, en el páncreas adulto, Pdx-1 no induce el desarrollo pancreático embrionario, pero induce la formación de células beta pancreáticas por su acción para inducir la expresión génica de insulina en respuesta de la señalización del metabolismo de la glucosa a la maquinaria transcripcional (Doiron y DeFronzo, *Int J Endocrinol Metab.* 9:356-357, 2011; Mitanhez et al., *Endo Rev* 18:520-540, 1997). Se ha demostrado que Pdx-1 después del desarrollo induce la formación de células beta en animales adultos (Bouwens y Rooman, *Physiol Rev* 85:1255-1270, 2005). Pdx-1 puede usarse en el enfoque de CNIP para su acción post-embrionaria para potenciar la formación de células beta.

El enfoque de CNIP se diseña para inducir el desarrollo post-embrionario de la formación de células beta en el páncreas adulto sin activación de la vía embrionaria del desarrollo pancreático. Otros han usado la vía embrionaria o células madre para volver a crear el desarrollo embriológico del páncreas. Una desventaja de la inducción de la vía embrionaria para aumentar la formación de células beta es que induce todos los tipos de células endocrinas, que incluye células alfa productoras de glucagón, que se ha mostrado que desempeñan una función patógena importante en la intolerancia a la glucosa de tanto la diabetes de tipo 1 como la diabetes de tipo 2 mellitus. El enfoque de CNIP evita la vía embrionaria y la vía de células madre para inducir la formación de células beta pancreáticas en el páncreas adulto.

Se inducen la expresión y translocación de Pdx-1 del citoplasma al núcleo por el metabolismo de la señalización de glucosa a la maquinaria transcripcional (Mitanhez et al., *Endo Rev* 18:520-540, 1997). Como se describe, el metabolismo de la glucosa es esencial para la formación de células beta. Para crear un tipo de célula, tiene que cambiarse el perfil de expresión genético de la célula. La inducción génica por el metabolismo de la glucosa es un ejemplo de un fenómeno epigenético en el que el perfil de expresión génica está controlado y regulado por el nivel de glucosa en la sangre (Doiron et al., *J Biol Chem.* 271:5321-5324, 1996; Mitanhez et al., *Endo Rev* 18:520-540, 1997). La expresión génica y translocación de Pdx-1 del citoplasma al núcleo se inducen por el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, el efecto de la señalización del metabolismo de la glucosa va a dirigirse a la maquinaria transcripcional implicada en la formación de células beta pancreáticas. La expresión en exceso de Pdx-1 potenciará la formación de células beta aumentando la cantidad de Pdx-1 que puede unirse aleatoriamente a moléculas de ADN y encontrar su sitio de unión de ADN específico. Así, la expresión en exceso de Pdx-1 desempeña una función central en converger todos los mecanismos de señalización en la mezcla de CNIP para estimular la formación de células beta. La expresión en exceso de Pdx-1 en el páncreas produce la convergencia de las moléculas en la mezcla de CNIP para producir células beta antes de activar otros efectos de la señalización del metabolismo de la glucosa sobre la maquinaria transcripcional que no están relacionados con la formación de células beta (Doiron et al., *J Biol Chem.* 271:5321-5324, 1996; Mitanhez et al., *Endo Rev* 18:520-540, 1997). Se ha introducido ADNc de Pdx-1 en una construcción de lentivirus usando el mismo método descrito anteriormente para lenti-CGK bajo el control del promotor del CMV. Se usaron los métodos *in vivo* de inyección para dirigir el páncreas de ratón adulto con lenti-CMV-Pdx-1.

Construcción de CMV-Pdx-1 de lentivirus (FIG. 2B): Se subclonaron los genes PDX-1 de ratón con el vector pEntCMV-WPRE y las inserciones se verificaron por secuenciación de ADN. Se trataron pENT-PDX-1 con la enzima LR Clonase II (Invitrogen) y se unieron a un vector pLenti. Los productos de recombinación se transformaron en células de *E. coli*. Después de la incubación durante la noche, se seleccionaron los clones positivos, y se purificó ADN de plásmido.

Se transfectaron pEnt-PDX1 y pLenti-PDX1 en células 293. 48 horas después de la transfección, las células se lisaron en tampón SDS-PAGE y se sometieron a electroforesis en gel al 4-20 % de SDS-PAGE y análisis de transferencia Western. La transferencia Western se llevó a cabo usando el anticuerpo anti-Myc (para la construcción de PDX1) a una dilución 1:1000, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La unión del anticuerpo se detectó usando reactivos de ECL.

Se usó el número de una o dos células positivas para insulina en los tejidos exocrinos como una indicación de la formación de células beta comparando el grupo terapéutico con el grupo de control (FIG. 4). Se detectó un aumento de una o dos células positivas para insulina en los tejidos exocrinos para el grupo terapéutico.

Se correlacionó el aumento en una o dos células positivas para insulina en el grupo terapéutico en comparación con el control con el aumento en la proliferación de células beta, se cuantificó por el marcador BrdU (FIG. 5). El marcador de BrdU demostró proliferación en islotes y tejidos exocrinos.

La co-localización del marcador BrdU de proliferación con célula positiva para insulina demuestra la formación de nuevas células beta pancreáticas en el grupo inyectado con la composición terapéutica. Solo se observó

proliferación de células beta pancreáticas (insulina). No se detectó proliferación de células alfa (glucagón) o delta (somatostatina). Por cuantificación histológica, la composición terapéutica indujo la formación de células beta pancreáticas. De hecho, como se ha explicado anteriormente, la composición terapéutica se diseñó para inducir la formación post-embionaria de células beta pancreáticas sin causar la formación de células de glucagón o somatostatina.

Se cuantificó la masa de células beta en los grupos terapéuticos y de control (FIG. 6). La masa de células beta pancreáticas aumentó significativamente en ratones adultos inyectados con la composición terapéutica en comparación con el grupo de ratones adultos de control inyectados con el placebo de control.

Se cuantificó la densidad de agrupaciones de células beta en el grupo terapéutico y grupo de control. La composición terapéutica causó un aumento significativo en la densidad de agrupaciones de células beta en comparación con el control (FIG. 7).

Se correlacionó el aumento en la proliferación de células beta pancreáticas, masa de células beta y densidad de agrupaciones de células beta con un aumento en la producción de insulina después del ayuno durante la noche en ratones adultos inyectados con la composición terapéutica en comparación con el grupo de placebo de control (FIG. 8).

B. Métodos

Método in vivo para dirigir la administración génica al páncreas adulto: Para estudiar la formación de células beta en el animal adulto, se dirigió el páncreas adulto *in vivo* usando un vector viral. La metodología ha sido validada (Doiron et al., *Diabetologia* 55:719-728, 2012) y empleada en el enfoque de CNIP para generar células beta pancreáticas *in vivo*.

Una ventaja de los vectores lentivirales es que no activan células dendríticas a un grado significativo. Además, los vectores lentivirales pueden (i) infectar e integrarse en tanto células en división como no en división, (ii) proporcionar la eficiencia de alta transducción y sostener la expresión génica *in vivo*, (iii) no inducir una respuesta inmunitaria del hospedador significativa, y (iv) pueden ser satisfactoriamente readministrados. Y, lo que es más importante, el método de inyección de vector viral *in vivo* en el páncreas de ratón adulto permite evaluar nuevos tratamientos y/o posibles curas para una enfermedad crónica que se desarrolla en la adultez y evitar el desarrollo de mecanismos compensatorios que se producen cuando un gen es deletado durante el desarrollo embrionario. Este enfoque obvia algunos de los hallazgos paradójicos que se han informado con modelos inactivados, es decir, sensibilidad a la insulina en músculo normal / casi normal en ratones en los que el receptor de insulina está inactivado (véase Kitamura et al., *Annu. Rev. Physiol.*, 65:313-32, 2003) y el mutante nulo homocigótico para GLUT4 (GLUT4 ^{-/-}) (véase Minokoshi et al., *Journal of Biol. Chem.*, 278(36): 33609-12, 2003), que no manifestó un fenotipo diabético. Por tanto, en ciertas realizaciones, se usa un vector lentiviral para dirigirse al páncreas directamente.

En resumen, puede introducirse una construcción lentiviral en el páncreas de ratón mediante la vía intraductal, del siguiente modo: se inserta un catéter de 32 de calibre (Braintree Scientific, Inc, Braintree, MA) en el conducto cístico a través de una pequeña abertura en la vesícula biliar. El catéter avanza entonces al conducto biliar común y se asegura allí con un nudo corredizo de sutura 0/0 alrededor del conducto biliar y el catéter para prevenir el reflujo de vector en el hígado. Con un micropinza dispuesta alrededor del esfínter de Oddi para evitar la fuga de vector en el duodeno, se inyectan lentamente 100 µl de vector lentiviral que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) a 10⁸ TU/ml en el conducto pancreático a través del catéter. Dos semanas después de la infección, se extrae todo el páncreas para examen histológico. Después de 48 horas, se dirigió específicamente la inyección de lentivirus que codifica GFP bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) a los tejidos pancreáticos (Doiron et al., 2012). El análisis morfológico cuantitativo de la transducción pancreática por el vector de lentivirus, basado en la expresión de GFP, mostró que el 60 % del tejido expresó GFP. La expresión se detectó en el páncreas incluso después de cuatro semanas (FIG. 3). El vector de lentivirus que expresó la proteína verde fluorescente no se encontró en ningún otro tejido en el cuerpo, que incluye corazón, pulmón, hígado, cerebro, músculo de la pierna y riñón por histología y PCR (datos no mostrados). Se tiñó tejido pancreático con H&E para buscar evidencia de inflamación (pancreatitis) en el día 2 y día 14 después de la inyección. No se observó evidencia de inflamación. Tras la inyección de vector lentiviral que contenía ARNhp Grb10 o mezcla de ARNhp, la actividad, consumo diario de alimentos durante los 14 días después de la inyección; (ratones de mezcla de ARNhp, 5,4 ± 0,3 gramos/día [n=5] frente a ratones con Grb10 de ARNhp, 5,9 ± 0,5 gramos/día [n=6]) y aumento de peso fueron similares en los grupos de Grb10 de ARNhp y mezcla de ARNhp. No se observó diarrea en ninguno de los grupos de control o experimentales después de la inyección de lentivirus, y no se elevaron las enzimas pancreáticas (lipasas) y hepáticas (AST, ALT) (Doiron et al., *Diabetologia* 55:719-728, 2012). Estos resultados demuestran que la técnica de inyección de lentivirus no produce efectos gastrointestinales, pancreáticos o hepáticos adversos.

Los inventores también construyeron y produjeron un lentivirus que expresaba glucocinasa (GK), factor transcripcional Pdx-1 y ARNhp que se dirige a PTP1B. Se usaron ratones C57BL/6 macho (Charles River, Wilmington, MA, EE.UU.) de 8 semanas de edad y se mantuvieron en una dieta a voluntad de agua y pienso normal para todos los experimentos. En el día 1 después de la inyección con vector lentiviral, los ratones se inyectaron i.p. diariamente con BrdU (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en PBS a una dosis de 50 µg/g de peso corporal durante

12 días para cuantificar la proliferación de células beta. 4 semanas después de la inyección lentiviral, se extrajo el páncreas completo para examen histológico.

5 Puede usarse administración directa al páncreas adulto *in vivo* para producir en exceso una proteína(s) o para suprimir la producción de una proteína(s). En resumen, los inventores han desarrollado un protocolo metodológico para dirigirse al páncreas adulto *in vivo*. La técnica se empleará en estudios de validación del enfoque de CNIP para promover la formación de células beta. El método de inyección de lentivirus descrito anteriormente proporciona prueba de concepto de que el páncreas adulto puede ser directamente elegido como diana. Los datos obtenidos usando el enfoque de lentivirus para dirigirse a/generar células beta pancreáticas puede modificarse usando moléculas pequeñas y terapéuticos no virales.

10 *Estudios en animales:* Se usaron ratones C57BL/6 macho (Charles River, Wilmington, MA, EE.UU.) de 8 semanas de edad y se mantuvieron en una dieta de agua y pienso normal a voluntad para todos los experimentos. 1 día después de la inyección con vector lentiviral, los ratones se inyectaron i.p. diariamente con BrdU (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) en PBS a una dosis de 50 µg/g de peso corporal durante 12 días. 4 semanas después de la inyección lentiviral, se extrajo el páncreas entero para examen histológico (véase a continuación).

15 *Análisis inmunofluorescente e inmunohistoquímico:* Se fijaron tejidos pancreáticos de ratón adulto por inmersión en tampón fosfato 4 % de paraformaldehído – 1 % de glutaraldehído durante la noche a 4 °C y posteriormente se incorporaron con compuesto Tissues-Tek OCT para el seccionamiento en criostato. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-somatostatina (G-10), anti-Ki-67 (M-19), anti-glucagón (K79bB10) y anti-insulina A (C-12), anticuerpos e IgG de conejo de control (Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.). Para estudios de proliferación, se tiñeron tejidos pancreáticos con o bien anticuerpo Ki67 (M-19) (Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.) o con anticuerpo contra BrdU monoclonal de rata (Abcam Inc., Cambridge, MA, EE.UU.). Se realizó la recuperación de antígeno para anticuerpos contra Ki67 y BrdU hirviendo secciones durante 10 min en tampón citrato 10 mM seguido de enfriamiento durante 30 min hasta temperatura ambiente. Se contratiñeron los núcleos con DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.). Los anticuerpos secundarios fluorescentes usados incluyeron fluoresceína anti-cabra de burro, fluoresceína anti-ratón de cabra, Texas red anti-conejo de cabra y Texas red anti-cabra de burro (Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.). El área de células beta representa el área superficial de células positivamente teñidas para inmunotinción de insulina dividida entre la superficie pancreática total barrida con el microscopio confocal de barrido láser Olympus FV-1000. Se cuantificaron las áreas positiva para insulina y pancreática total con Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Se calculó la masa de células beta como área de células beta multiplicada por peso húmedo pancreático. Al menos tres ratones se analizaron por condición. Se tiñó el tejido pancreático con H & E para buscar evidencia de inflamación (pancreatitis) en el día 2 y día 14 después de la inyección del lentivirus.

35 *Transferencia Western:* Para transferencias Western, se separaron cantidades iguales de proteína total en 10 y 15 % de SDS/PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon entonces con 5 % de leche no grasa en 0,1 % de TBS Tween-20 y se sondaron con anticuerpos específicos contra Pdx-1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.), PTP1B (Abcam Inc., Cambridge, MA, EE.UU.), glucocinasa (Santa Cruz Inc, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y GAPDH (G9545, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.). Entonces se incubaron membranas con anticuerpo secundario conjugado con HRP (NA934) y se revelaron con un reactivo quimioluminiscente (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EE.UU.).

40 *Análisis estadístico:* Los resultados se presentan como media ± EEM. Se realizaron comparaciones estadísticas con la prueba de la t de Student para datos independientes o ANOVA unilateral, cuando corresponda. Se consideró que los resultados eran estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Board of Regents of the University of Texas System
 45 Doiron, Bruno
 DeFronze, Ralph A.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA INDUCCIÓN *IN VIVO* DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS

50 <130> STTM0009WO / 2012.021.HSCS

<150> US 61/678.077

ES 2 679 394 T3

<151> 31-07-2012

<160> 8

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 703

<212> ADN

10 <213> mus musculus

<400> 1

```
tggcttatcg aaattaatac gactcactat agggagaccc aagcttagat ctgtttaaac      60
ctcgagaatt catggctgtg gatactacaa ggaggggagc ccagtcgttg actctggtag      120
agcagatcct ggcagagttc cagctgcagg aggaagacct gaagaagggtg atgagccgga      180
tgcagaagga gatggaccgt ggcctgaagc tggagaccca tcaggaggcc agtgtaaaga      240
tgttgcccac ctacgtgctg tccaccccag aaggctcaga agttggagac tttctctcct      300
tagacctggg aggaaccaac ttcaggggtga tgcctggtgaa agtgggggag ggggaggcag      360
gacagtggag cgtgaagacg aaacaccaga tgtattccat ccccgaggac gccatgacgg      420
gcactgcgga gatgctcttt gactacatct ctgagtgcac ctctgacttc ctggacaagc      480
atcagatgaa acacaagaaa ctaccctcgg gcttcacctt ctcttccct gtaaggcacg      540
aagacataga caagggcatc ctgctcaact ggaccaaggg cttcaaggcc tccggagcag      600
aagggaacaa catcgtggga cttctccgag atgctatcaa gaggagaggg gactttgaga      660
tggatgtggt ggcaatggtg aatgacacgg tggccacaat gat                          703
```

15

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 2

25 gccaggacat tcgacatgaa 20

ES 2 679 394 T3

<210> 3

<211> 254

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

```
ccatgaacag tgaggagcag tactacgagg ccacacagct ctacaaggac ccgtgcgcat      60
tccagagggg cccggtgcca gagttcagcg ctaaccccc tgcgtgcctg tacatggggc      120
gccagcccc acctccgccg ccaccccagt ttacaagctc gctgggatca ctggagcagg      180
gaagtctcc ggacatctcc ccatacaaag tgccccgct cgcctccgac gacccggctg      240
gcgctcacct ccac                                     254
```

10

<210> 4

<211> 1398

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 4

ES 2 679 394 T3

atgctggacg acagagccag gatggagcc gccaaagaag agaaggtaga gcagatcctg 60
 gcagagttcc agctgcagga ggaggacctg aagaaggtga tgagacggat gcagaaggag 120
 atggaccgcg gcctgaggct ggagacccat gaagaggcca gtgtgaagat gctgcccacc 180
 tacgtgcgct ccaccccaga aggctcagaa gtcggggact tcctctccct ggacctgggt 240
 ggcaactaact tcagggatgat gctggtgaag gtgggagaag gtgaggaggg gcagtggagc 300
 gtgaagacca aacaccagat gtactccatc cccgaggacg ccatgaccgg cactgctgag 360
 atgctcttcg actacatctc tgagtcatc tccgacttcc tggacaagca tcagatgaaa 420
 cacaagaagc tgcccctggg cttcaccttc tcctttcctg tgaggcacga agacatcgat 480
 aaggcatcc ttctcaactg gaccaagggc ttcaaggcct caggagcaga agggaacaat 540
 gtcgtggggc ttctgcgaga cgctatcaaa cggagagggg actttgaaat ggatgtggtg 600
 gcaatggtga atgacacggt ggccacgatg atctcctgct actacgaaga ccatcagtgc 660
 gaggtcggca tgatcgtggg cacgggctgc aatgcctgct acatggagga gatgcagaat 720
 gtggagctgg tggaggggga cgaggccgc atgtgcgtca ataccgagtg gggcgccttc 780
 ggggactccg gcgagctgga cgagttcctg ctggagtatg accgcctggg ggacgagagc 840
 tctgcaaacc ccggtcagca gctgtatgag aagctcatag gtggcaagta catgggagag 900
 ctggtgcggc ttgtgctgct caggctcgtg gacgaaaacc tgctcttcca cggggaggcc 960
 tccgagcagc tgcgcacacg cggagccttc gagacgcgct tcgtgtcgca ggtggagagc 1020
 gacacgggcg accgcaagca gatctacaac atcctgagca cgctggggct gcgaccctcg 1080
 accaccgact gcgacatcgt gcgccgcgcc tgcgagagcg tgtctacgcg cgctgcgcac 1140
 atgtgctcgg cggggctggc gggcgtcatc aaccgcatgc gcgagagccg cagcgaggac 1200
 gtaatgcgca tcaactgtggg cgtggtggc tccgtgtaca agctgcaccc cagcttcaag 1260
 gagcggttcc atgccagcgt gcgcaggctg acgccagct gcgagatcac cttcatcgag 1320
 tcggaggagg gcagtggccg gggcgcgcc ctggtctcgg cgggtggcctg taagaaggcc 1380
 tgtatgctgg gccagtga 1398

<210> 5

5 <211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

10

ES 2 679 394 T3

Met Leu Asp Asp Arg Ala Arg Met Glu Ala Ala Lys Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15

Glu Gln Ile Leu Ala Glu Phe Gln Leu Gln Glu Glu Asp Leu Lys Lys
 20 25 30

Val Met Arg Arg Met Gln Lys Glu Met Asp Arg Gly Leu Arg Leu Glu
 35 40 45

Thr His Glu Glu Ala Ser Val Lys Met Leu Pro Thr Tyr Val Arg Ser
 50 55 60

Thr Pro Glu Gly Ser Glu Val Gly Asp Phe Leu Ser Leu Asp Leu Gly
 65 70 75 80

Gly Thr Asn Phe Arg Val Met Leu Val Lys Val Gly Glu Gly Glu Glu
 85 90 95

Gly Gln Trp Ser Val Lys Thr Lys His Gln Met Tyr Ser Ile Pro Glu
 100 105 110

Asp Ala Met Thr Gly Thr Ala Glu Met Leu Phe Asp Tyr Ile Ser Glu
 115 120 125

Cys Ile Ser Asp Phe Leu Asp Lys His Gln Met Lys His Lys Lys Leu
 130 135 140

Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Val Arg His Glu Asp Ile Asp
 145 150 155 160

Lys Gly Ile Leu Leu Asn Trp Thr Lys Gly Phe Lys Ala Ser Gly Ala
 165 170 175

Glu Gly Asn Asn Val Val Gly Leu Leu Arg Asp Ala Ile Lys Arg Arg
 180 185 190

Gly Asp Phe Glu Met Asp Val Val Ala Met Val Asn Asp Thr Val Ala

ES 2 679 394 T3

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 6

```

Met Asn Gly Glu Glu Gln Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Asp
 1                               5 10 15

Pro Cys Ala Phe Gln Arg Gly Pro Ala Pro Glu Phe Ser Ala Ser Pro
 20 25 30

Pro Ala Cys Leu Tyr Met Gly Arg Gln Pro Pro Pro Pro Pro His
 35 40 45

Pro Phe Pro Gly Ala Leu Gly Ala Leu Glu Gln Gly Ser Pro Pro Asp
 50 55 60

Ile Ser Pro Tyr Glu Val Pro Pro Leu Ala Asp Asp Pro Ala Val Ala
 65 70 75 80

His Leu His His His Leu Pro Ala Gln Leu Ala Leu Pro His Pro Pro
 85 90 95

Ala Gly Pro Phe Pro Glu Gly Ala Glu Pro Gly Val Leu Glu Glu Pro
 100 105 110

Asn Arg Val Gln Leu Pro Phe Pro Trp Met Lys Ser Thr Lys Ala His
 115 120 125

Ala Trp Lys Gly Gln Trp Ala Gly Gly Ala Tyr Ala Ala Glu Pro Glu
 130 135 140

Glu Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Ile Ser Arg Pro Arg Arg
 165 170 175

Val Glu Leu Ala Val Met Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys Ile
 180 185 190

```

ES 2 679 394 T3

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu Asp Lys Lys
 195 200 205

Arg Gly Gly Gly Thr Ala Val Gly Gly Gly Gly Val Ala Glu Pro Glu
 210 215 220

Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Leu Pro Pro
 225 230 235 240

Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Ala Ala Pro Val Ala Ala
 245 250 255

Arg Glu Gly Arg Leu Pro Pro Gly Leu Ser Ala Ser Pro Gln Pro Ser
 260 265 270

Ser Val Ala Pro Arg Arg Pro Gln Glu Pro Arg
 275 280

<210> 7

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

15 <210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 8

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación para inducir la formación de células beta de una célula de mamífero para su uso como un medicamento, comprendiendo la combinación: (i) un primer agente que es un ácido nucleico que codifica glucocinasa, o un activador de molécula pequeña de glucocinasa seleccionado de R00281675, R04389620 (piragliatina), LY2121260, PSN-GKI o GKA-50, (ii) un segundo agente que es un inhibidor de ARNhp de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) o un ADN antisentido de PTP1B, y (iii) un tercer agente que es un ácido nucleico que codifica Pdx-1 que está adaptado para aumentar la transcripción mediada por Pdx-1.
2. La combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que la célula de mamífero es una célula pancreática, una célula de hígado, una célula K intestinal, una neurona o una célula madre adulta.
- 10 3. La combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico que codifica la glucocinasa está además comprendido en un vector viral, preferentemente un vector de lentivirus.
4. La combinación para su uso según la reivindicación 3, en la que el vector viral comprende además un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) 3' de la secuencia codificante.
- 15 5. La combinación para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el primer, segundo y tercer agentes se proporcionan en una única composición.
6. La combinación para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el primer, segundo y tercer agentes están dispuestos para suministro por inyección del páncreas a través del conducto pancreático.
- 20 7. La combinación para su uso según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de diabetes de tipo 1 o tipo 2, comprendiendo la combinación: (i) casete de expresión de glucocinasa configurado para expresar una proteína glucocinasa funcional en una célula pancreática, (ii) un inhibidor de tirosina fosfatasa 1B que es un inhibidor de ARNhp de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) o un ADN antisentido de PTP1B o (iii) un casete de expresión de Pdx-1 configurado para expresar una proteína Pdx-1 funcional en una célula pancreática, estando la combinación adaptada para inducir células beta pancreáticas en el páncreas.
- 25 8. Un método de inducción de la formación de células beta de células *in vitro* que comprende: proporcionar una célula de mamífero con una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la célula de mamífero es una célula pancreática, una célula de hígado, una célula K intestinal, una neurona o una célula madre adulta.
- 30 10. El método de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que la célula de mamífero se aísla de un sujeto que va a tratarse con las células beta o en el que la célula de mamífero es heteróloga para un sujeto que va a tratarse con las células beta.

Inducción de la formación de células beta en el páncreas adulto

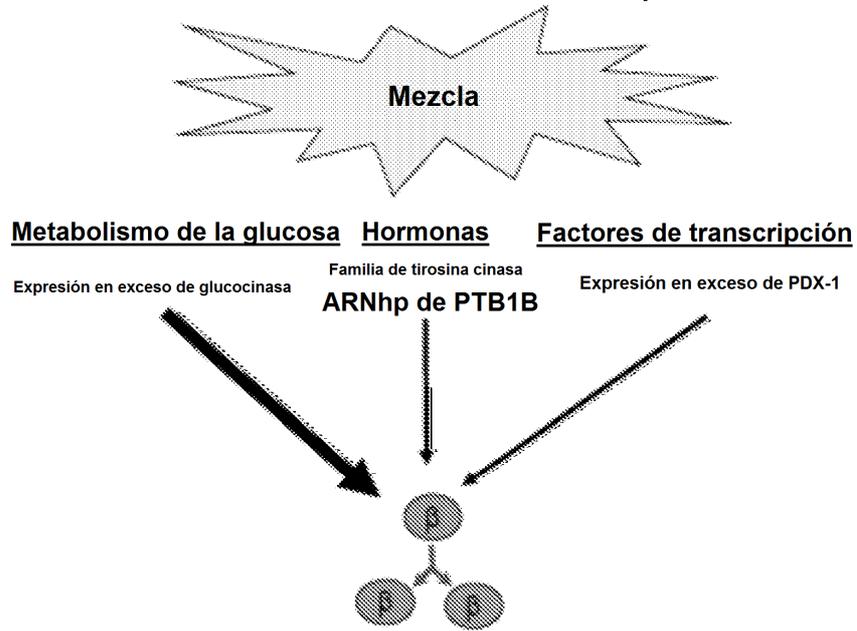


FIG. 1

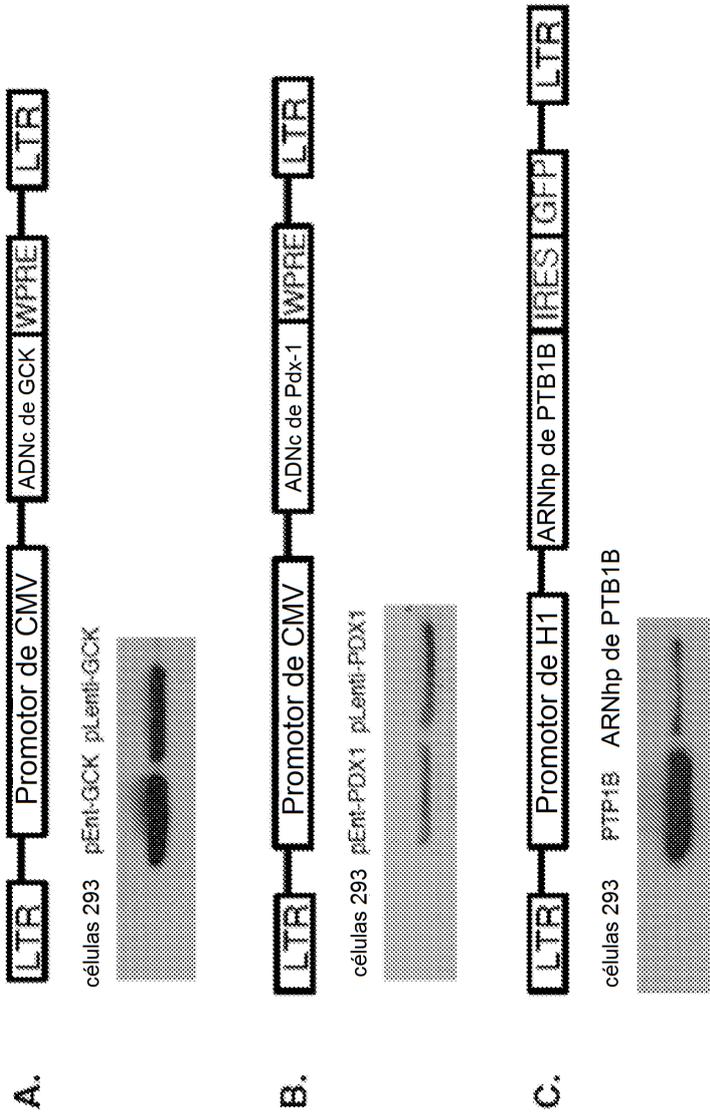


FIG. 2A-2C

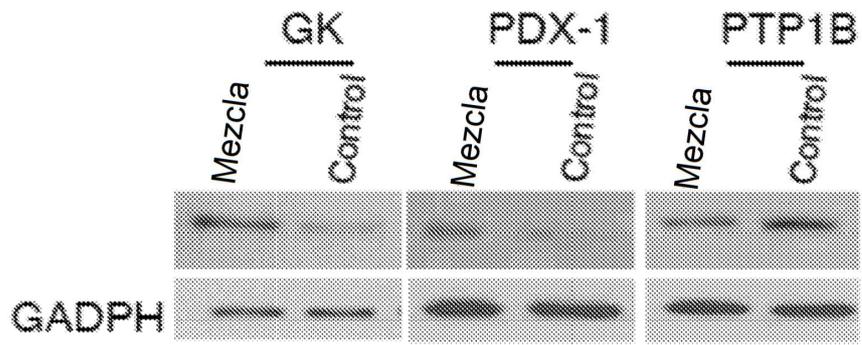


FIG. 3

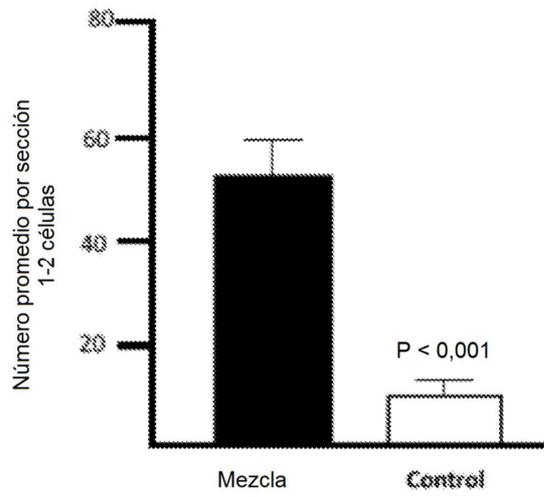


FIG. 4

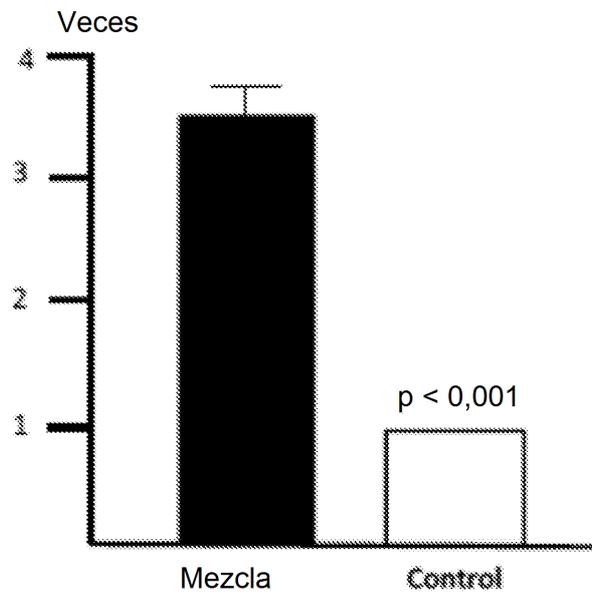


FIG. 5

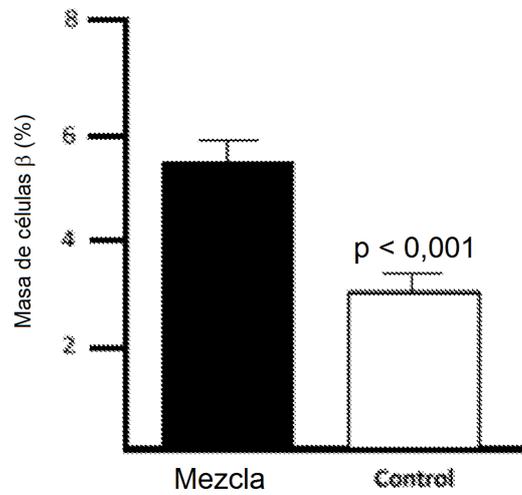


FIG. 6

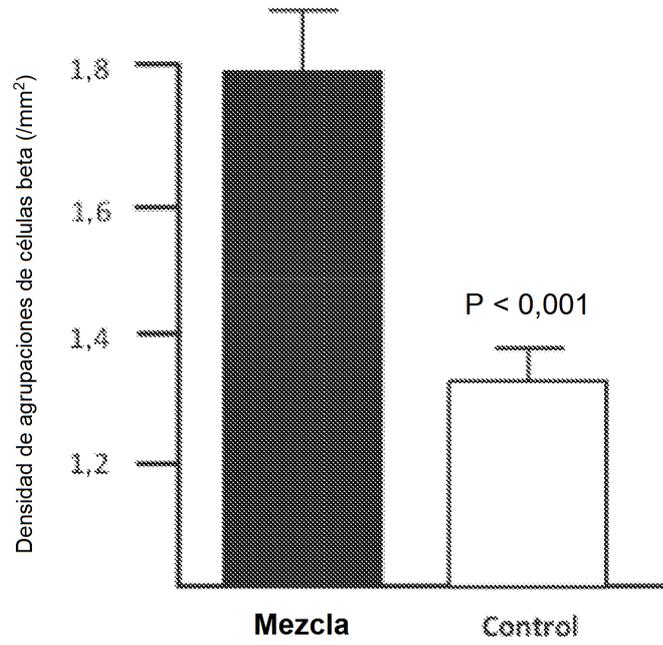


FIG. 7

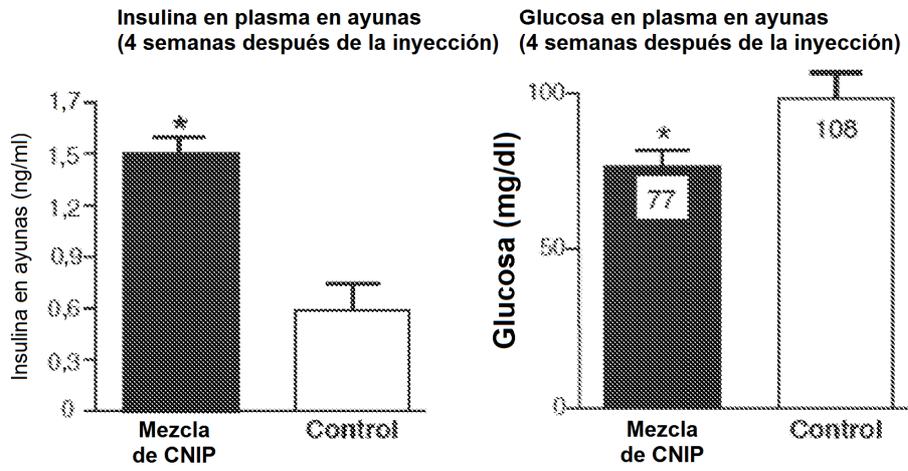


FIG. 8

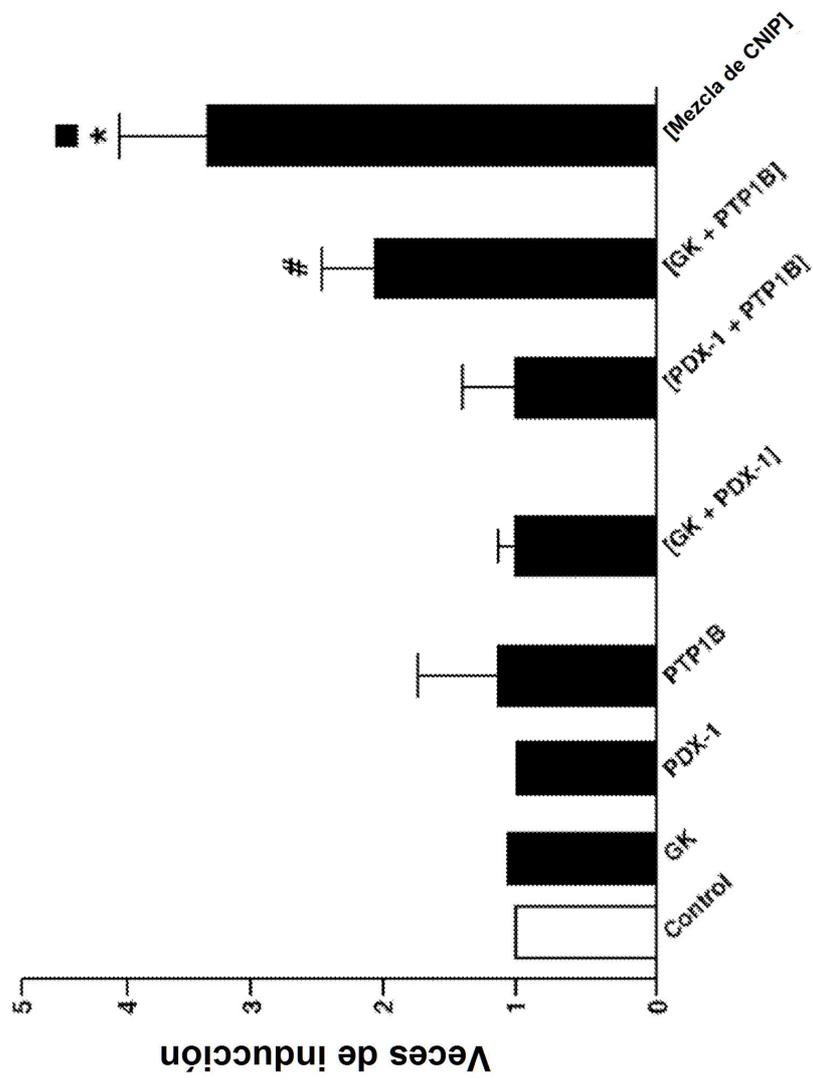


FIG. 9

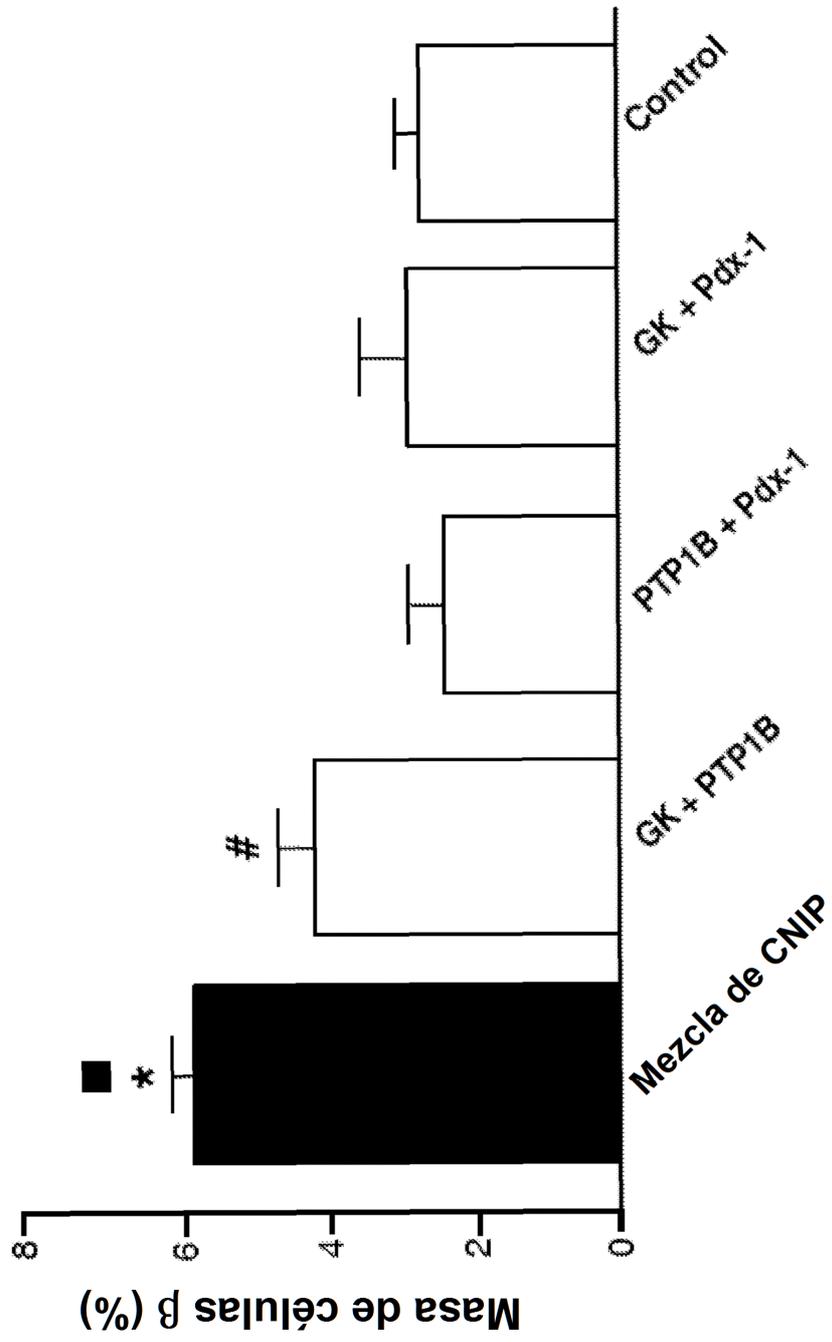


FIG. 10