

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 236**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2011 PCT/US2011/036360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11143511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2011 E 11781319 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2569430**

54 Título: **Procedimientos para producir células enteroendocrinas que producen y secretan insulina**

30 Prioridad:

12.05.2010 US 334171 P

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

22.03.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
412 Low Library, Mail Code 4308, 535 West 116th
Street
New York, NY 10027 , US**

72 Inventor/es:

**TALCHAI, CHUTIMA y
ACCILI, DOMENICO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 705 236 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

Procedimientos para producir células enteroendocrinas que producen y secretan insulina

5 DECLARACIÓN DE INTERESES GUBERNAMENTALES

La presente invención se realizó con soporte del gobierno con las subvenciones n.º DK057539 y DK58282, otorgadas por el National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

10 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

Procedimientos para tratar y prevenir la diabetes de tipo 1 y 2.

15

2. Descripción de la técnica relacionada

La diabetes mellitus es una familia de trastornos caracterizados por hiperglucemia crónica y el desarrollo de complicaciones a largo plazo. Esta familia de trastornos incluye diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, diabetes gestacional y otros tipos de diabetes. La diabetes mediada por el sistema inmunitario (de tipo 1) (o diabetes mellitus dependiente de insulina, DMDI) es una enfermedad de niños y adultos para la cual actualmente no hay medios adecuados para la cura o la prevención. La diabetes de tipo 1 representa aproximadamente el 10 % de toda la diabetes humana.

20

La diabetes de tipo 1 es distinta de la diabetes no dependiente de insulina (DMNDI) en que solo la forma de tipo 1 implica la destrucción específica de las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas; las células alfa (productoras de glucagón) o las células delta (productoras de somatostatina) en los islotes pancreáticos se salvan. La pérdida progresiva de células beta pancreáticas da como resultado una producción insuficiente de insulina y, por tanto, deterioro del metabolismo de la glucosa con las consiguientes complicaciones. La diabetes de tipo 1 se produce predominantemente en personas genéticamente predispuestas. Aunque hay un componente genético importante en la etiología de la diabetes de tipo 1, los factores genéticos ambientales o no de la línea germinal también parecen desempeñar un papel importante. La diabetes de tipo 1 afecta a 1 de cada 300 personas en Estados Unidos. Los casos de diabetes de tipo 1 están aumentando a un ritmo de aproximadamente 3 % a 5 % al año.

25

30

35

Desde 1922, la insulina ha sido la única terapia disponible para el tratamiento de la diabetes de tipo 1 y otras afecciones relacionadas con la falta o disminución de la producción de insulina, sin embargo, no previene las complicaciones a largo plazo de la enfermedad, incluido el daño a los vasos sanguíneos, nervios, ojos y riñones, que pueden afectar a la visión, la función renal, la función cardíaca y la presión arterial, y puede causar complicaciones del sistema circulatorio. Esto se debe a que el tratamiento con insulina no puede reemplazar completamente a la función pancreática perdida. A pesar de décadas de investigación y del advenimiento del trasplante de células de los islotes pancreáticos en 1974 y las nuevas afirmaciones de éxito resultantes del Protocolo de Edmonton para el trasplante de células de los islotes, el éxito de reemplazar las células productoras de insulina ha sido modesto. Las dificultades asociadas con el trasplante de islotes o de páncreas incluyen la obtención de cantidades suficientes de tejido y la tasa relativamente baja a la que los islotes trasplantados sobreviven y funcionan con éxito en el receptor aún no se ha superado. A los cuatro años del trasplante, menos del 10 % de los pacientes que han recibido trasplantes de células de los islotes siguen siendo independientes de la insulina. Además, a pesar de los nuevos protocolos de supresión inmunológica, existe una tasa del 18 % por paciente de efectos secundarios graves.

40

45

50

El documento WO 2004/031350 desvela procedimientos terapéuticos para tratar, por ejemplo, la diabetes, que comprende administrar inhibidores antisentido de FoxO1A.

[Ref: Y. BEHL ET AL: "Plays An Important Role In Enhanced Microvascular Cell Apoptosis and Microvascular Cell Loss in Type 1 and Type 2 Diabetic Rats", *DIABETES*, Vol. 58, no.4, 23 January 2009, páginas 917-925.] desvelan pruebas de inhibiciones de la expresión de FOXO1 con interferencia de ARN en ratas diabéticas inducidas con STZ y ratas gordas diabéticas Zucker.

55

[Ref: ADAMA KAMAGATE ET AL: "FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice", *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 118, no.6, 1 January 2008, páginas 2347-2364] desvelan que el silenciamiento mediado por ARNA de la FoxO1 hepática en ratones diabéticos (*db/db*) se asoció con una reducción de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP) y la producción de VLDL.

60

[Ref: GLAUSER D A ET AL: "FoxO proteins in pancreatic [beta]-cells as potential therapeutic targets in diabetics", *Expert Review of Endocrinology & Metabolism, Future Drugs Ltd, GB*, Vol.3 no.2, 1 March 2008, páginas 175-195] examinan el potencial de las proteínas FOXO como dianas terapéuticas en la diabetes.

65

[Ref: AL-MASRI M ET AL: "Effect of forkhead box O1 (FOXO1) on beta cell development in the human fetal pancreas", *Diabetologia; Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism, Springer, Berlín*; Vo.l. 53, no.4, 24 December 2009, páginas 699-711] desvelan que la atenuación de la expresión de FoxO1A con ARNip aumenta la expresión de insulina en las células de los islotes (que son células enteroendocrinas).

[Ref: HAN ET AL: enseña que las células enteroendocrinas modificadas por ingeniería genética secretan insulina en

respuesta a la glucosa e hiperglucemia inversa en ratones diabéticos

Por lo tanto, hay una necesidad de regímenes terapéuticos adicionales para el tratamiento, prevención y/o reducción en el riesgo de desarrollar diabetes u otros trastornos asociados con la función pancreática alterada.

5 Antes de describir las realizaciones de la presente invención, debe entenderse que la presente invención no ha de limitarse a los procesos concretos, composiciones o metodologías descritas, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la descripción tiene el fin de describir versiones o realizaciones particulares únicamente y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que estará limitada
10 únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por un experto habitual en la materia. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de las realizaciones de la presente invención cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos, dispositivos, y materiales preferidos.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La presente invención se ilustra a modo de ejemplo y no a modo de limitación, en las figuras de los dibujos adjuntos y en las que:

20 **FIG. 1 Células productoras de insulina en intestino de ratones *NKO*.** (A), Colocalización de Neurog3-Gfp (rojo) y Foxo1 (verde) en los intestinos de ratones de control y *NKO* cruzados con ratones indicadores Neurog3-Gfp. (B), Falta de colocalización de Neurog-Gfp con Foxo1 en ratones *NKO*. (C) Inmunohistoquímica de la insulina (rojo) en el páncreas (delimitado) e intestino. Aumento original: 200X. Las muestras se obtuvieron de ratones de 1 día de edad. (D) Fluorescencia directa en páncreas (parte superior) y vellosidades (parte inferior) de ratones de control y *NKO* cruzados con ratones con inserción génica *Ins2-Gfp*. (E) Doble inmunofluorescencia con insulina (rojo) y Gfp (verde) en ratones *NKO:Ins2-Gfp*. (F) Experimentos de rastreo de linaje en ratones *NKO:Rosa26eGfp* y hermanos de camada heterocigotos de control. La inmunohistoquímica se realizó con Gfp (verde) e insulina (rojo). Las células Gfp⁺/Ins⁺ (indicadas por flechas) son descendientes de células en las que se produjo recombinación mediada por cre. FIG. 11G (antigua figura 1L de la pro.) Resumen de la localización de las células Ins2⁺. Diagrama esquemático de los intestinos de ratones adultos que indican la localización de Neurogenina 3-Gfp⁺ (triángulos rojos) y células Ins2⁺, como se deduce de los ratones *NKO:Ins2-Gfp* y *NKO:Neurogenin3-GFP*. **INSERTE ESTO EN EL PPT DE LAS FIGURAS DESPUÉS DE 1F.**

35 **FIG. 2 Las células Gut Ins⁺ comparten características esenciales con las células beta pancreáticas.** Inmunofluorescencia con (A) Glucoquinasa (Gck), (B) Prohormona convertasa 2 (Pc2), (C), Receptor de sulfonilurea 1 (Sur1), (D), Transportador de glucosa 2 (Glut2) y (E) Sinaptofisina. El recuadro en C indica un ejemplo de una célula doble positiva. Aumento original: 100X (A, C, D, E) y 200X (B).

40 **FIG. 3 Secreción de insulina y bioactividad.** (A, B) Secreción de péptido C y de insulina dependiente de glucosa en intestinos *NKO* (barras azules) y de control (barras negras) incubadas en tampón HEPES-Krebs Ringer complementado con las concentraciones indicadas de glucosa y diazóxido 0,5 mM (Dzx) o glibenclamida 10 nM (Glib). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando intestinos adultos (n = 4). Se utilizaron islotes TS como controles. (C) Efectos de extractos de ácido-etanol de ratones *NKO* (barras azules) o de control (barras negras) sobre los niveles de glucosa en plasma después de la inyección intraperitoneal en ratones de 5 días de edad. Las muestras se preincubaron con un anticuerpo neutralizante anti-insulina (Ab Ins) o con IgG de control de isotipo equivalente (IgG). La insulina humana recombinante se sometió a precipitación en ácido-etanol antes de la inyección (ácido/EtOH) (n = 8 en a y b, n = 12 en c).

50 **FIG. 4 Regeneración de células Ins⁺ intestinales después de la ablación mediada por STZ.** (A) Niveles de glucosa alimentados en ratones *NKO* (cuadrados) y ratones control (rombos). Las flechas indican el momento de la administración de STZ (STZ) y la muerte (SAC). Se administró insulina (2-4U/cd) en controles TS desde el día 3 hasta el día 28 (n = 16). (B) Gráficos de supervivencia de ratones *NKO* y controles TS después de STZ (n = 16 y, respectivamente). (C) Pruebas de tolerancia oral a la glucosa en ratones *NKO* antes y después de la administración de STZ y en los controles TS después de STZ. (D) Inmunohistoquímica de las células Ins⁺ intestinales en el intestino *NKO* antes (D0) y después de la inyección de STZ (D3 y D28) con anti-insulina (D0 y D3) y anticuerpos anti-insulina y anti-Pc2 (D28). La inmunotinción con insulina de las secciones pancreáticas de control antes (D0) y después de la inyección de STZ (D28) se presenta en los paneles de la derecha. (E) Rastreo de linaje de células Ins⁺ intestinales post-STZ. Los ratones mutantes dobles *NKO:Ins2-Gfp* se trataron con STZ como se indica en los procedimientos, y las secciones intestinales se tiñeron con anticuerpos contra Gfp (verde) o Pc2 (rojo). En D y E, se estudiaron tres niveles de duodeno, yeyuno, íleon y colon de cada región (n = 4). Aumento original: 200X.

65 **FIG. 5 Localización intestinal de Neurog3.** Inmunohistoquímica con anti-Neurog3 (rojo) y anti-Gfp (verde) en el intestino neonatal de ratones transgénicos Neurog3-Gfp. La superposición completa entre los dos procedimientos de detección indica que Gfp es un marcador fiel de la localización de Neurog3 en el intestino. Aumento original:

100X.

FIG. 6 La ablación de Foxo1 en progenitores enteroendocrinos expande el conjunto de células Neurog3⁺.

(A) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Neurog3 (verde) en ratones TS y *NKO*. (B) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Gfp y anticuerpo anti-cromograninA (verde y rojo, respectivamente) en ratones *Neurog3-Gfp* y *NKO:Neurog3-Gfp*. Aumento original: 20X tanto en A como en B. (C) Niveles de ARNm de *Neurog3* en preparaciones de células epiteliales intestinales (n = 8). (D) Datos de citometría de flujo de preparaciones de células epiteliales del intestino aisladas de ratones *Neurog3-Gfp* y *NKO:Neurog3-Gfp*. (E) Cuantificación de los datos en D (n = 6). * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$.

FIG. 7 Células productoras de hormonas pancreáticas en intestino con ablación de Foxo1.

Inmunohistoquímica de fluorescencia que muestra células Gcg⁺ y Pp⁺ (verdes) en íleon distal y el colon de *NKO*, pero no de ratones de control. Aumento original: 200X.

FIG. 8 Inmunohistoquímica de fluorescencia con anticuerpo anti-insulina (rojo) que demuestra la presencia de células Ins⁺ en el colon de ratones *NKO* adultos a los 4 meses de edad. Aumento original: 100X.

FIG. 9 Análisis de qPCR de la expresión del ARNm de *Ins1* e *Ins2* en preparaciones de células epiteliales intestinales aisladas de fragmentos enriquecidos con DTZ en ratones *NKO* (azul) y de segmentos anatómicamente equivalentes en ratones de control (negro) (n = 8). * = $P < 0,05$.

FIG. 10 Generación y análisis de ratones PKO. (A) inmunohistoquímica de Foxo1 (verde) y Gfp (rojo) en ratones PKO y de control de un día de edad cruzados con ratones indicadores transgénicos *Neurog3-Gfp*. **(B)**, Inmunotinción de insulina (rojo) en el íleon distal en ratones PKO de 9 meses de edad. **(C)** Inmunotinción de insulina (rojo) y Gfp (verde) en el duodeno de ratones *PKO:Neurog3-Gfp* y de control *Neurog3-Gfp* de un día de edad. Aumento original: 200X.

FIG. 11 Análisis de qPCR de la expresión del ARNm de marcadores de la diferenciación de las células beta *Gck*, *Pc2*, *Kir6.2* y *Sur1* en preparaciones de células epiteliales intestinales aisladas de fragmentos enriquecidos con DTZ en ratones *NKO* (azul) y de segmentos anatómicamente equivalentes en ratones de control (negro) (n = 8). * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$.

FIG. 12 Análisis de qPCR de la expresión del ARNm de los factores de transcripción que regulan la diferenciación de las células beta pancreáticas *Nkx6.1*, *MafA*, *Pdx1*, *NeuroD1*, *Pax4*, *Nkx2.2* y *Arx* en preparaciones de células epiteliales intestinales aisladas de fragmentos enriquecidos con DTZ en ratones *NKO* (azul) y de segmentos anatómicamente equivalentes en ratones de control (negro) (n = 8). * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$.

FIG. 13 Análisis inmunohistoquímico de la expresión de factores de transcripción de células beta. (A) Expresión de *Pdx1* y (B) *Nkx6.1* (verde) en colon adulto e íleon distal adulto de ratones *NKO* y de control TS. La inmunorreactividad a la insulina está indicada en rojo en ambos conjuntos de paneles. La localización citoplásmica de los dos factores de transcripción es probable debido al procedimiento de fijación. Aumento original: 400X (arriba), y 200X (abajo).

FIG. 14 Expresión de Aes en ratones NKO. Análisis de qPCR de la expresión del ARNm de *Aes* en preparaciones de células epiteliales intestinales aisladas de fragmentos enriquecidos con DTZ en ratones *NKO* (azul) y de segmentos anatómicamente equivalentes en ratones de control (negro). ** = $P < 0,01$. (B) Inmunorreactividad con anti-insulina (verde) y *Aes* (rojo) en el colon de ratones adultos *NKO* y de control TS después de la administración de STZ. Aumento original: 200X. (C) Inmunohistoquímica con anticuerpos *Pc2* y *Aes* (rojo) en páncreas e intestino de ratones *NKO:Rosa26eGfp* y de control. Aumento original: 20X.

FIG. 15 Modelo de la función Foxo1. En el páncreas, N3 prog dan lugar a todos los tipos de células endocrinas (símbolos de color naranja). En el intestino, dan lugar a células endocrinas intestinales (símbolos de color naranja), algunas de los cuales se comparten en común con el páncreas y algunas de los cuales son específicas del intestino. En estos procesos, Foxo es permisiva, es decir, permite que estos acontecimientos ocurran. Los tipos celulares específicos del páncreas, incluidas las células beta productoras de insulina, las células alfa productoras de glucagón y las células productoras de polipéptidos pancreáticos, no se encuentran en el intestino normal. Los inventores han propuesto que Foxo normalmente ejerce un efecto represivo sobre la generación de estos tipos de células en el intestino y que la inhibición de Foxo conduce a su aparición en el intestino.

FIG. 16 Micrografía fluorescente en vivo a 100X. Se aislaron criptas del íleon distal y el colon de TS o *NKO* portadoras del indicador GFP en el locus *Ins2* y se cultivaron *in vitro*. Día 3: No se observa conversión de las células de la cripta en células Ins-GFP porque no hay células verdes en los ratones ni normales ni defectivos en *Neurog3-Foxo1*

FIG. 17 Día 6: Conversión de las células de las criptas en células Insulina⁺ GFP debido a la inactivación del ADN

de Foxo1 como lo demuestra el verde que indica células Insulina⁺ GFP. Se aislaron criptas del íleon distal y el colon de TS o NKO portadoras del indicador GFP en el locus Ins2 y se cultivaron *in vitro*. Las células intestinales aisladas se mantuvieron en medio 1 durante 3 días y se cambiaron a medio 2 durante 3 días. Micrografía fluorescente en vivo a 100X.

FIG. 18 Día 6: Aumento de la conversión de las células de la cripta en células Ins+GFP en criptas con ablación de Foxo1 (es decir, ratones NKO) Micrografía de fluorescencia en vivo a 200X. Se aislaron criptas del íleon distal y el colon de TS o NKO portadoras del indicador GFP en el locus Ins2 y se cultivaron *in vitro*. La eficiencia de la conversión se mejora según lo indicado por el aumento de células verdes que representan células Insulina⁺GFP cuando las células intestinales aisladas se mantuvieron en Medio 1 durante 1 día, Medio 2 durante 2 días y cambiado a Medio 4b durante 3 días.

FIG. 19 Día 6 Las células de insulina⁺GFP son células vivas. Las células verdes indican células insulina⁺GFP. Azul indica células muertas. Se aislaron criptas del íleon distal y el colon de TS o NKO portadoras del indicador GFP en el locus Ins2 y se cultivaron *in vitro*. Las células intestinales aisladas se mantuvieron en Medio 1 durante 1 día, Medio 2 durante 2 días y cambiado a Medio 4b durante 3 días.

FIG. 20 Día 6: La conversión de células de la cripta en Ins⁺GFP es células debido a la inhibición del ARN de Foxo1; las células verdes indican células insulina⁺GFP. Micrografía fluorescente en vivo a 200X. Se aislaron criptas del íleon distal y colon de TS portadoras del indicador GFP en el locus Ins2 y se cultivaron *in vitro*. Las células intestinales aisladas se mantuvieron en el Medio 1 durante 1 día, el Medio 2 durante 2 días, y las células intestinales de ratones normales se trataron con **50 nM de ARNip** de Foxo1 (derecha) o control negativo de contenido en GC equivalente (izquierda) en el Medio 4b durante 72 horas.

Sumario de la invención

Un agente que reduce la expresión o la actividad biológica de una o más proteínas Foxo o fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas seleccionados del grupo que consiste en un ARNhc aislado, ARNip, ARN antisentido, ADN antisentido, ADN/ARN antisentido quimérico, microARN y ribozimas que son suficientemente complementarios a un gen o un ARNm que codifica una o más de las proteínas Foxo, y anticuerpos o fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos que se unen específicamente a una o más proteínas Foxo, reduciendo así la actividad biológica de la una o más proteínas, para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero asociado con una función pancreática alterada, seleccionada del grupo formado por diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia; sensibilidad reducida a la insulina, aumento de la glucosa en ayunas, aumento de la glucosa posprandial y obesidad, en los que el agente se administra en el intestino y causa la generación de células enteroendocrinas en el intestino que producen y secretan insulina.

Otras realizaciones se refieren a una formulación farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un mamífero asociados a una función pancreática alterada, que comprende una cantidad eficaz de un agente que reduce la expresión o actividad biológica de una o más proteínas Foxo o fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos seleccionados del grupo que consiste en un ARNhc aislado, ARNip, ARN antisentido, ADN antisentido, ADN/ARN antisentido quimérico, microARN, y ribozimas que son suficientemente complementarios a un gen o un ARNm que codifica una o más de las proteínas Foxo, y anticuerpos o fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos que se unen específicamente a una o más proteínas Foxo reduciendo así la actividad biológica de la o la Más proteínas. En algunas realizaciones, la cantidad efectiva es una cantidad que produce un efecto seleccionado del grupo que consiste en un aumento de la tolerancia a la glucosa, un aumento de la insulina sérica, un aumento de la sensibilidad a la insulina, una disminución de la glucosa en ayunas, una disminución de la glucosa posprandial, una disminución del aumento de peso, una disminución de la masa grasa, un aumento de la pérdida de peso y la generación de células enteroendocrinas en el tracto gastrointestinal que producen y secretan insulina.

Otra realización re refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para producir células enteroendocrinas productoras de insulina de una población de células progenitoras enteroendocrinas no productoras de insulina obtenidas de un segmento del intestino o colon de un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento

a. poner en contacto a la población con un agente que reduce la expresión o actividad biológica de una o más proteínas FOXO, o fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos en una cantidad y en condiciones que permitan que una parte significativa de la población produzca insulina, y en la que se selecciona el agente del grupo que consiste en un ARNhc aislado, ARNip, ARN antisentido, ADN antisentido, ADN/ARN antisentido quimérico, microARN, y ribozimas que son suficientemente complementarios a un gen o un ARNm que codifica una o más de las proteínas Foxo, y anticuerpos o fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos que se unen específicamente a una o más proteínas Foxo reduciendo así la actividad biológica de la una o más proteínas, y

b. recoger las células enteroendocrinas productoras de insulina.

En una realización, las células enteroendocrinas productoras de insulina producen además una o más hormonas pancreáticas seleccionadas del grupo que consiste en glucagón, polipéptido pancreático, glucoquinasa y glut2 en respuesta a la administración del agente. En una realización, las células enteroendocrinas productoras de insulina también producen una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en prohormona-convertasa Pc2, Pdx1, MafA, Nkx6.1, Nkx2.2 y Pax4.

Otras realizaciones se refieren a un procedimiento para identificar un agente que es eficaz en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección asociada con una función pancreática alterada, que comprende:

- 10 (a) proporcionar un animal que tiene la enfermedad o afección;
- (b) determinar la cantidad de expresión de Foxo 1, Foxo3 o Foxo4 en una muestra biológica de pretratamiento tomada del animal;
- 15 (c) administrar el agente al animal; y
- (d) determinar la cantidad de expresión de Foxo 1, Foxo3 o Foxo4 en una muestra biológica posterior al tratamiento tomada del animal; en el que si la cantidad en la muestra biológica posterior al tratamiento es significativamente menor que la cantidad en la muestra de pretratamiento, el agente se identifica como un agente
- 20 que es eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o afección;

en el que la muestra biológica comprende células enteroendocrinas del tracto gastrointestinal; y

en el que la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia; sensibilidad reducida a la insulina, aumento de la glucosa en ayunas, aumento de la glucosa postprandial y obesidad.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, los términos "animal", "paciente", o "sujeto" incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, canguros, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales transgénicos no humanos. El animal, paciente o sujeto preferente es un ser humano.

"Una enfermedad o trastorno enumerado" significa una enfermedad o trastorno caracterizado por una función pancreática alterada que incluye niveles de insulina inadecuadamente bajos, diabetes de tipos 1 y 2, síndrome metabólico, obesidad, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia; sensibilidad reducida a la insulina, aumento de la glucosa en ayunas, aumento de la glucosa posprandial. Por niveles de insulina inadecuadamente bajos se entiende los niveles de insulina que son lo suficientemente bajos como para contribuir al menos a un síntoma de la enfermedad o trastorno. La función pancreática deteriorada es aquella en la que la patología se asocia con una capacidad disminuida en un sujeto para que el páncreas produzca y/o secrete insulina y/o una capacidad alterada (aumentada o disminuida) para secretar péptidos pancreáticos, tales como glucagón, polipéptido pancreático, somatostatina. Los trastornos asociados con la función pancreática alterada incluyen patologías a veces denominadas diabetes autoinmune latente de la edad adulta, pre-diabetes, niveles alterados de glucosa en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa, hiperglucemia en ayunas, síndrome de resistencia a la insulina y afecciones hiperglucémicas.

Los marcadores fluorescentes para su uso en las realizaciones incluyen GFP y derivados, diamidino amarillo, azul sólido, peroxidasa de rábano picante, toxina del cólera B, virus de la pseudorabia, hidroxiestilbamidina, rojo Texas e isotiocianato de fluoresceína, y cualquier otro conocido en la técnica. Se usó proteína fluorescente verde (GFP) en los experimentos descritos en el presente documento, sin embargo, ahora hay muchos mutantes diferentes de GFP [Shaner N, Steinbach P, Tsien R (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins" (PDF). *Nat Methods* 2 (12): 905-9.] Se puede encontrar una lista de varias proteínas fluorescentes en http://nic.ucsf.edu/dokuwiki/doku.php?id=fluorescent_proteins.

"Un agente activo" significa cualquier agente, polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña que hace que cualquier célula progenitora enteroendocrina Ins⁻ se diferencie en una célula Ins⁺. Los agentes activos preferidos son aquellos que reducen la expresión o actividad biológica de una proteína Foxo (incluso mediante la reducción de la transcripción o traducción del gen o el ARNm, respectivamente, o reduciendo la actividad biológica). Los agentes activos de ácido nucleico incluyen ARNip, ARNhc y ARN o ADN antisentido; los polipéptidos incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y enzimas como COP1.

"Células madre" significa células indiferenciadas que pueden autorenovarse para divisiones ilimitadas y diferenciarse en múltiples tipos de células. El experimento con ratones PKO (Fig. 4) fue eliminar la Foxo1 en todas las células intestinales, incluidas las células madre, y los resultados muestran fenotipos similares a los de NKO.

"Células progenitoras" en el intestino significa células descendientes de células madre multipotenciales, pero la propiedad de autorenovación es limitada.

- "Progenitores enteroendocrinos N3" y "N3 Prog" se refiere a un subconjunto de células progenitoras intestinales negativas para insulina que expresan neurogenina 3 que dan lugar a células Ins⁻ enteroendocrinas. Se ha descubierto que N3Prog en el intestino, en lo sucesivo "Gut N3 Prog", tienen el potencial de diferenciarse en células que producen y secretan insulina ("células Gut Ins⁺"), pero este destino está restringido por Foxo1 durante el desarrollo. Las N3 Prog pancreáticas se diferencian en células pancreáticas productoras de insulina durante el desarrollo fetal, pero sigue sin estar claro si existen células N3 Prog pancreáticas después del nacimiento o si las N3Prog pancreáticas pueden diferenciarse posnatalmente en células productoras de hormonas pancreáticas en condiciones normales o alteradas. Cabe señalar que las células N3prog enteroendocrinas (intestino) y de páncreas tienen características diferentes, a pesar de que se conocen habitualmente como células N3.
- "Células progenitoras intestinales no productoras de insulina" o "Ins⁻Gut Prog" en términos generales significa cualquier célula progenitora intestinal que sea capaz de diferenciarse en una célula intestinal productora de insulina (células Gut Ins⁺), incluyendo células madre y N3 Prog.
- "Células enteroendocrinas" significa células endocrinas especializadas del tracto gastrointestinal, la mayoría de las cuales son hijas de células N3 Prog que ya no producen neurogenina 3. Las células enteroendocrinas son células negativas para insulina (Gut Ins⁻); producen varias otras hormonas, tales como gastrina, ghrelina, neuropéptido Y, péptido YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆) serotonina, secretina, somatostatina, motilina, colecistoquinina, péptido inhibidor gástrico, neurotensina, péptido intestinal vasoactivo, polipéptido insulínico (GIP) dependiente de la glucosa y péptido-1 similar al glucagón.
- "Células Gut Ins⁺" y "células intestinales positivas a insulina" significa cualquier célula enteroendocrina que produce y secreta insulina descendiente de Ins⁻Gut. Las células Gut Ins⁺ tienen el fenotipo positivo a la insulina (Ins⁺), por lo que expresan marcadores de células beta maduras y secretan insulina y péptido C en respuesta a la glucosa y las sulfonilureas. Las células Gut Ins⁺ surgen principalmente de N3 Prog y también de las células madre del intestino. Estas células se descubrieron inesperadamente en ratones NKO (defectivos en Foxo1). A diferencia de las células beta pancreáticas, las células Gut Ins⁺ se regeneran después de la ablación por la toxina de las células beta, estreptozotocina, invirtiendo la hiperglucemia en ratones.
- "Ratones NKO" o "Ratones defectivos en Foxo1" hace referencia a ratones transgénicos que no expresan Foxo1 en N3 Prog. No todas las células enteroendocrinas en el intestino de los ratones defectivos para Foxo1 (en adelante, "ratones NKO") producen y secretan insulina; algunas no producen insulina (en adelante, "Ins⁻").
- Por significativamente menor en el contexto de la reducción de la expresión o la actividad biológica de una proteína Foxo significa disminuir el nivel de proteínas Foxo lo suficiente como para que la célula enteroendocrina u otra célula que no produce insulina adquiera un fenotipo Ins⁺, incluyendo la expresión de insulina.
- Significativamente más alto que el nivel en el control en un ensayo significa detectable por ensayos usados habitualmente (elisa o ría), mientras que en la población de control la insulina no puede detectarse mediante tales ensayos. Se entiende que la disminución significativa de los niveles de expresión de la proteína Foxo es una disminución que supera el 50 % de los valores de control (nota: se sabe que hasta un 50 % de disminución no pasa nada, por lo que la disminución debe ser superior al 50 %).
- En el contexto de determinar el nivel de expresión de insulina en la población de control y de prueba después del contacto con un agente que hace que la población de prueba se convierta en células productoras de insulina, significativamente más alto significa cualquier nivel de insulina detectable de manera fiable, ya que las células no tratadas no producen insulina. Una persona experta en la técnica de ensayos de cribado puede definir significativamente más alto o significativamente más bajo dependiendo del ensayo.
- "Prevenir una enfermedad" incluye, pero sin limitación, prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que pueda estar predispuesto a la enfermedad (o trastorno), pero aún no se ha diagnosticado que tiene la enfermedad; inhibir la enfermedad, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad; aliviar la enfermedad, por ejemplo, causando su regresión; aliviar la condición causada por la enfermedad, por ejemplo, reduciendo sus síntomas y/o retrasando el inicio de la enfermedad. Un ejemplo es la reducción de los niveles de glucosa en sangre en un sujeto hiperglucémico y/o el mantenimiento de un control aceptable de los niveles de glucosa en sangre en el sujeto. Tal tratamiento, prevención, síntomas y/o las condiciones los puede determinar un experto en la técnica y se describen en los libros de texto estándar.
- "Tratar" una enfermedad, trastorno o afección en un paciente se refiere a tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a aliviar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad; disminuir la extensión de la enfermedad; retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad; mejora y paliación o estabilización del estado patológico.
- Cuando la enfermedad es diabetes de tipo 1, los síntomas incluyen micción frecuente, sed excesiva, hambre extrema, pérdida de peso inusual, fatiga incrementada, irritabilidad, visión borrosa, picazón genital, dolores y

molestias extrañas, boca seca, piel seca o con picazón, impotencia, infecciones vaginales por levaduras, mala cicatrización de cortes y rasguños, infecciones excesivas o inusuales. Estos síntomas están asociados con hallazgos característicos de laboratorio clínico que incluyen hiperglucemia (concentraciones de azúcar en sangre excesivamente elevadas, es decir > 125 mg/dl), pérdida del control glucémico (es decir, cambios frecuentes y
 5 excesivos de los niveles de azúcar en sangre por encima y por debajo del rango fisiológico, mantenido generalmente entre 40-125 mg/dl), fluctuaciones en la glucemia posprandial, fluctuaciones en el glucagón en sangre, fluctuaciones en los triglicéridos en sangre e incluyen la reducción en la tasa o la disminución o mejores resultados de las afecciones que se aceleran y/o ocurren debido a o con mayor frecuencia con la diabetes, incluidas enfermedades microvasculares y microvasculares, pero sin limitaciones, a un deterioro cerebrovascular con o sin ictus, angina,
 10 cardiopatía coronaria, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, nefropatía, insuficiencia renal, aumento de la proteinuria, retinopatía, neovascularización de los vasos en la retina, neuropatía, incluyendo neuropatía central, autonómica y periférica que puede llevar a la pérdida de la sensación de extremidades y amputación y/o por neuropatía o flujo vascular disminuido, afecciones de la piel, que incluyen, entre otras, dermatopatía diabética, necrobiosis lipoidica diabética, enfermedad ampollosa diabética, esclerodermia diabética, granuloma anular,
 15 infecciones bacterianas de la piel, pero limitadas a estafilococos, lo que puede dar como resultado infecciones más profundas y gastroparesia (vaciamiento anormal del estómago). La diabetes de tipo 1 puede diagnosticarse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, habitualmente, los diabéticos tienen un resultado de glucosa en sangre en ayunas de más de 126 mg/dl de glucosa. La prediabetes se diagnostica habitualmente en pacientes con un nivel de glucosa en sangre entre 100 y 125 mg/dl de glucosa. También se
 20 pueden usar otros síntomas para diagnosticar la diabetes, enfermedades y afecciones relacionadas, y enfermedades y afecciones afectadas por una función pancreática disminuida.

"Reducción" de uno o más síntomas significa la disminución de la gravedad o la frecuencia de uno o más síntomas, o la eliminación del uno o más síntomas.

"Patología asociada a alteración de la función pancreática" o disfunción pancreática es aquella en la que la patología se asocia con una capacidad disminuida en un sujeto para que el páncreas produzca y/o secrete una o más hormonas pancreáticas, incluida insulina, y/o péptidos pancreáticos, tales como glucagón, polipéptido pancreático o somatostatina. Las patologías que se asocian con una función pancreática alterada incluyen la diabetes de tipo 1 y la
 30 diabetes de tipo 2. Otras patologías incluyen las que a veces se denominan diabetes autoinmune latente de la edad adulta, pre-diabetes, niveles alterados de glucosa en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa, hiperglucemia en ayunas, síndrome de resistencia a la insulina y afecciones hiperglucémicas.

"Administrar" o "administración de" un fármaco o una composición farmacéutica terapéutica a un sujeto, cualquier procedimiento conocido en la técnica incluye tanto la administración directa, incluyendo la autoadministración (incluida la administración oral o intravenosa, subcutánea, inyecciones intramusculares o intraperitoneales, administración rectal mediante supositorios), administración local directamente en o sobre un tejido diana (tal como una región del intestino que tiene Gut Ins⁻ Prog, tal como Gut N3 Prog) o la administración por cualquier vía o procedimiento que administre una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco o composición a las células o tejido
 40 diana.

Un "sujeto" o "paciente" es un mamífero, normalmente un ser humano, pero, opcionalmente, un animal mamífero de importancia veterinaria, incluyendo, pero sin limitaciones, caballos, ganado bovino, ovejas, perros y gatos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente activo o composición farmacéutica es una cantidad que logra el efecto terapéutico deseado, por ejemplo, alivio, mejoría, paliación o eliminación de una o más manifestaciones de la enfermedad o afección en el sujeto. El efecto terapéutico completo no tiene que producirse necesariamente tras la administración de una dosis, y se puede producir tras la administración de una serie de dosis. Por tanto, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad de un fármaco que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto profiláctico previsto, por ejemplo, prevenir o retrasar la aparición (o reincidencia) de la enfermedad o los síntomas, o reducir la probabilidad de la aparición (o reincidencia) de la enfermedad o los síntomas. El efecto profiláctico completo no tiene que producirse necesariamente tras la administración de una dosis, y se puede producir tras la administración de una serie de dosis. Por tanto, se puede administrar una cantidad profilácticamente eficaz en una o más administraciones. Para la diabetes, una cantidad terapéuticamente eficaz también puede ser una cantidad que aumenta la secreción de insulina, aumenta la sensibilidad a la insulina, aumenta la tolerancia a la glucosa o disminuye el aumento de peso, la pérdida de peso o la masa grasa.

Una "cantidad eficaz" de un agente es una cantidad que produce el efecto deseado.

Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el destinatario de la misma.

"Proteína Foxo" incluye Foxo1, Foxo2, Foxo3 y Foxo4 de ratón; FOXO 1, FOXO 2, 1FOXO3 y FOXO4 de ser humano, y las proteínas Foxo 1-4 de cualquier otro animal, incluyendo variantes, y ortólogos, y fragmentos

biológicamente activos de los mismos). Cabe señalar que FOXO2 se descubrió de forma independiente pero resultó ser el mismo gen que FOXO3. Hay dos números de NM, pero apuntan a la misma ubicación genómica.

"Gen Foxo" significa cualquier gen que codifica una proteína Foxo, incluyendo ortólogos, y fragmentos biológicamente activos de los mismos.

"ARNm de Foxo" significa cualquier ARNm que codifica una proteína Foxo, incluyendo ortólogos, y fragmentos biológicamente activos de los mismos.

La administración de un agente "en combinación con" incluye la administración paralela de dos agentes al paciente durante un período de tiempo, tal como la administración de un anticuerpo monoclonal Anti-FOXO1, 3 y/o 4 (o anti-Foxo1-4) o anticuerpo contra cualquier otro ortólogo) y un agente que reduce la expresión o actividad biológica de FOXO1, 3 y/o 4 durante un período de tiempo, administración conjunta (en la que los agentes se administran aproximadamente al mismo tiempo, por ejemplo, con de unos pocos minutos a unas pocas horas de diferencia entre sí), y la coformulación (en la que los agentes se combinan o mezclan en una única forma de dosificación adecuada para administración oral, subcutánea o parenteral).

Descripción detallada

Las realizaciones de la presente invención se basan en parte en el descubrimiento de que la ablación somática del gen que codifica la proteína Foxo1 en ratones defectivos para Neurog3-Foxo1 (NKO) hizo que un porcentaje significativo de células Gut N3 Prog se diferenciaron en células enteroendocrinas positivas para insulina (células Gut Ins⁺) que producen y secretan insulina y péptido C biológicamente activos, así como otras hormonas pancreáticas y factores de transcripción. Cabe destacar que las células Gut Ins⁺ secretaron insulina de forma dependiente de la dosis en respuesta a la glucosa y los extractos de ácido-etanol del intestino de ratones NKO mutantes tuvieron efectos de disminución de la glucosa *in vivo*. Además, Los estudios *in vivo* en ratones NKO mostraron que, a diferencia de las células beta pancreáticas que se no regeneran después del tratamiento con la toxina estreptozotocina, las células Gut Ins⁺ completamente funcionales volvieron a nacer en los ratones NKO dando como resultado una inversión espontánea de la hiperglucemia después de solo diez días, y manteniendo niveles de glucosa en sangre **significativamente más bajos** que los animales no tratados (de aproximadamente 250 mg/dl en *ad libitum* o aproximadamente 160 mg/dl después en ayunas) a lo largo del experimento durante 92 días. De manera importante, a diferencia de los animales no tratados, que invariablemente murieron en ausencia de terapia con insulina, el 75 % de los animales NKO sobrevivieron sin ningún tratamiento adicional, La capacidad de las células Gut Ins⁺ para secretar insulina en proporción directa a las concentraciones de glucosa en el ambiente es una característica clave de las células sanas productoras de insulina en el páncreas que, hasta el momento, ningún otro grupo ha podido replicar.

Los datos mostraron que Gut N3 Prog tienen el potencial de diferenciarse en células productoras y secretoras de insulina, pero esta capacidad es suprimida por la expresión del gen de Foxo1. Algunas células madre intestinales también pueden diferenciarse en células Ins⁺, por lo tanto, el término "Gut Ins⁻ Prog" se usa en el presente documento para incluir cualquier célula progenitora intestinal que sea capaz de convertirse en una célula Ins⁺.

Nadie ha descrito ni formulado la hipótesis de la existencia de células progenitoras en el intestino que conservan el potencial de diferenciarse en células productoras de insulina. Por lo tanto, un agente activo **incluye ampliamente** cualquier agente que cause la diferenciación de las células Gut Ins⁻ Prog en células Gut Ins⁺. Se prefieren los agentes que reducen la expresión o la actividad biológica de una proteína Foxo. Los ensayos de cribado se describen en el presente documento para identificar agentes activos. Si bien hay precedentes en la técnica de que el tratamiento con leptina, una hormona que regula la alimentación, puede dar lugar a la aparición de células Ins⁺ en el intestino, este proceso es diferente al proceso descrito en el presente documento en el sentido de que requiere la transformación parcial de otro tipo de célula intestinal, la célula "L", que es una célula endocrina intestinal. Por tanto, nadie ha informado de que las células N3 del intestino pueden dar lugar a células ins⁺ intestinales, ni nadie ha informado de que las células Ins⁺, después del tratamiento con leptina, sean funcionalmente capaces de producir insulina, y mucho menos producirla de una manera dependiente de la dosis de glucosa.

Hay una importante homología de la secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos, respectivamente, entre los genes que codifican las diversas proteínas Foxo (proteína Foxo1, 3 o 4) y entre las propias proteínas Foxo en animales, incluyendo seres humanos y ratones. aunque se prefiere la reducción de Foxo1 para generar células Gut Ins⁺, cabe esperar una reducción de la expresión de uno cualquiera o más de un gen Foxo o ARNm o una reducción de la bioactividad de una o más proteínas Foxo produzca un porcentaje significativo de Gut Ins⁻ Prog que se diferenciarán en células Gut Ins⁺.

Ciertos experimentos que utilizan segmentos de intestinos ricos en criptas y poblaciones cultivadas de células Gut Ins⁻ Prog aisladas de ratones normales han demostrado que el contacto de Gut Ins⁻ Prog con ARNi que es suficientemente complementario del ARNm de Foxo1 de ratón para reducir la expresión de Foxo1 generó células Gut Ins⁺. Esto muestra que la capacidad de las células progenitoras enteroendocrinas de intestino para convertirse en células productoras de insulina NO está limitada a la manipulación del gen Foxo1 (es decir, al ADN), sino que también se puede efectuar a través de la inhibición del ARNm de Foxo1.

Según al menos parte de estos descubrimientos, ciertas realizaciones de la invención se refieren a agentes para su uso en procedimientos para producir células Gut Ins⁺ de mamíferos poniendo en contacto Gut Ins⁻ Prog con el agente para hacer que las células se conviertan en células Gut Ins⁺. Los agentes preferidos incluyen aquellos que reducen la expresión de uno o más genes *Foxo* o ARNm que codifica una o más proteínas *Foxo* o reducen la actividad biológica de una o más proteínas *Foxo* a un nivel que permite que los Gut Ins⁻ Pro se diferencien en células con el fenotipo de células Gut Ins⁺. Las células de Gut Ins⁻Prog pueden ponerse en contacto con el agente *in situ* en el animal, o se pueden aislar las poblaciones enriquecidas de Gut Ins⁻ Prog del intestino, o se pueden usar explantes intestinales en el cultivo. Algunos de estos procedimientos se describen en el Ejemplo 10. Ciertas otras realizaciones se refieren a las propias células Gut Ins⁺ aisladas y a los explantes de tejido que incluyen células Gut Ins⁺, preferentemente tejido intestinal, pero también se incluyen tejidos artificiales. Los procedimientos adicionales incluyen la generación de células Ins⁺ a partir de células que se reprogramaron *in vitro* para convertirse en N3 pro intestinal. En otras palabras, las células N3 intestinales que se han obtenido indirectamente a través de la manipulación de otros tipos de células. Por ejemplo, otros fabricaron células productoras de insulina a partir de biopsias de piel "reprogramando" células. Posiblemente, estas células pasaron por una etapa de N3 pro para convertirse en productoras de insulina, aunque los autores no lo probaron específicamente. Estos procedimientos y otros conocidos en la técnica se pueden usar en las realizaciones de la invención. Maehr R. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 15;106(37):15768-73. Epub 31 de agosto de 2009, Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes.

La eficacia de los agentes para su uso en los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento puede controlarse determinando si los procedimientos mejoran alguno de los síntomas de la enfermedad que se está tratando. Como alternativa, se puede controlar el nivel de insulina o péptido C en suero (un subproducto de la secreción de insulina y un índice de células Ins⁺ funcionales), niveles que deberían aumentar en respuesta a la terapia. Como alternativa, la eficacia se puede medir mediante el control de la glucemia, tolerancia a la glucosa, masa grasa, aumento de peso, cuerpos cetónicos u otros indicios de la enfermedad o trastorno enumerados en el sujeto que se está tratando.

Además de reducir la secreción de insulina, la función pancreática alterada incluye una capacidad alterada para producir y/o secretar una o más hormonas pancreáticas, incluyendo uno o más péptidos pancreáticos, tal como glucagón, polipéptido pancreático, somatostatina o grelina. Las patologías conocidas que se asocian con una función pancreática alterada incluyen la diabetes de tipo 1 y la diabetes de tipo 2. Otras patologías incluyen las que a veces se denominan diabetes autoinmune latente de la edad adulta, pre-diabetes, niveles alterados de glucosa en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa, hiperglucemia en ayunas, síndrome de resistencia a la insulina y afecciones hiperglucémicas. Todo esto viene en el sentido de tratar y prevenir la diabetes.

Otras realizaciones se refieren a procedimientos para la selección, utilizando por ejemplo bibliotecas de agentes de prueba, para identificar aquellos que inducen a las células Gut Ins⁻ Prog a diferenciarse en células Gut Ins⁺. Algunos de estos procedimientos se describen a continuación en la sección titulada Ensayos de detección selectiva. La cribado puede ser ensayos *in vitro* de alto rendimiento. También se ha desarrollado un sistema *in vitro* para generar células Gut Ins⁺ en un tubo de ensayo a partir de células progenitoras intestinales que no producen insulina. Ejemplo 10. Otras determinadas realizaciones se refieren a células Gut Ins⁺ que están modificadas por ingeniería a partir de células progenitoras negativas para insulina derivadas de biopsias intestinales de un paciente diabético en particular o un paciente con riesgo de desarrollar diabetes, qué después se pueden trasplantar de nuevo al paciente para proporcionar una fuente de secreción de insulina regulada de células Gut Ins⁺ autólogas.

También se ha descubierto que la secreción de insulina por células Gut Ins⁺ se puede cerrar con el medicamento diazóxido, que es una medida de seguridad importante para controlar cualquier producción de insulina no deseada en un animal que ha sido inducido a producir células Gut Ins⁺ o que ha sido tratado mediante la administración de células Gut Ins⁺ como un procedimiento terapéutico para tratar una enfermedad asociada con una baja producción de insulina o una función pancreática alterada.

Los datos descritos en el presente documento proporcionan evidencia directa de que se puede inducir que las células Gut Ins⁻ Prog se diferencien en células Gut Ins⁺ que secretan insulina biológicamente activa en proporción directa a las concentraciones de glucosa en el ambiente, y que las células Gut Ins⁺ pueden controlarse con diazóxido.

Por lo tanto, ciertas realizaciones de la invención se refieren a agentes para su uso en procedimientos para tratar o prevenir la diabetes de tipo 1 o de tipo 2, u otra de las enfermedades o trastornos enumerados como se definen en el presente documento que se asocian con insulina inadecuadamente baja o función pancreática deteriorada en un animal administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que induce a las células Gut Ins⁻ Prog a diferenciarse en células Gut Ins⁺. Dichos agentes incluyen aquellos que reducen los genes *Foxo* o *FOXO* o la expresión del ARNm o reducen la actividad biológica de una o más proteínas *FOXO* a un nivel que permite que las células Ins⁻Gut Prog se conviertan en células Gut Ins⁺. En algunas otras realizaciones, estos trastornos se tratan o se previenen administrando a un animal que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de células Gut Ins⁺, preferentemente, células autólogas o autólogas parciales.

Visión general

Un objetivo a largo plazo de la medicina regenerativa es la identificación de genes, vías celulares y bioquímicas que rigen la generación de células β productoras de insulina, con el objetivo de reclutarlos en el reemplazo celular continuo en pacientes con diabetes de tipo 1. El proceso por el cual los precursores endodérmicos primitivos adoptan un destino endocrino se ha examinado con detalle³. Las neurogeninas son una familia de factores de transcripción de bHLH generalmente involucrados en la especificación de la diferenciación neuronal; La neurogenina-3 (Neurog3 o N3) estimula el desarrollo endocrino pancreático. Las células endocrinas pancreáticas y entéricas surgen de los progenitores caracterizados por la expresión transitoria del factor de transcripción Neurog3 (1-3). Un paso clave parece ser la formación de células que expresan neurogenina 3 que se diferencian en todos los tipos de células de islotes pancreáticos conocidos (1, 22-23). Curiosamente, los progenitores endocrinos de Neurogenina 3⁺ (N3 Prog en el presente documento) no están restringidos al páncreas, sino que se encuentran en el estómago y el intestino, donde dan lugar a la mayoría de las células en el sistema enteroendocrino, el órgano endocrino más grande del cuerpo (2-3). A pesar de su origen endodérmico común, sin embargo, las células progenitoras N3 pancreáticas y del intestino comparten pocas o ninguna de las propiedades: dan lugar a tipos de células que producen distintas hormonas peptídicas, y tienen destinos de desarrollo y vida útil notablemente diferentes (8). Los progenitores endocrinos pancreáticos se forman durante el desarrollo embrionario y no vuelven a surgir en el órgano adulto (7), excepto en circunstancias especiales (24), mientras que Gut N3 Prog se renuevan continuamente de las células madre del intestino y contribuyen a repoblar las células enteroendocrinas de recambio rápido (3).

Las características distintivas de estas dos poblaciones celulares encajan con la teoría clásica de la especificación posicional, por lo que las células progenitoras parcialmente comprometidas adquieren propiedades dependientes de la posición que dictan destinos específicos (25). La diferenciación de células de mamífero se ve como un proceso de avance jerárquico, en el que los progenitores multipotenciales están restringidos por el destino por señales posicionales. Por consiguiente, los progenitores endocrinos positivos a neurogenina 3 (N3 Prog) se pronostican según las teorías actuales de la especificación posicional para diferenciarse en células productoras de insulina en el páncreas, pero no en el intestino. Hasta ahora prácticamente no se sabía nada sobre el desarrollo, localización y propiedades funcionales de las células que expresan FOXO1, 3 y/o 4 en el intestino.

El factor de transcripción Foxo1 regula múltiples aspectos de la función de las células beta pancreáticas (4) y se expresa ampliamente en los progenitores endocrinos pancreáticos Neurog3⁺ (5). En el epitelio pancreático fetal humano aislado, la disminución de FOXO1 aumenta el número de NEUROG3⁺ (39). Similar al páncreas, Foxo1 se expresa en la mayoría de los progenitores enteroendocrinos Neurog3⁺, tal como se ha identificado mediante doble inmunohistoquímica (FIG. 1a y 5).

Se investigó el papel de Foxo1 en células Gut Ins⁻ de ratón para determinar si desempeñaba un papel en la determinación del tipo de célula en el que se diferencia Gut Prog N3. Los detalles de los experimentos que describen el papel de Foxo1 en la diferenciación de Gut Ins⁻ Prog en células Gut Ins⁺ y el descubrimiento de que Foxo1 restringe las células progenitoras enteroendocrinas intestinales a un fenotipo no productor de insulina se exponen en los Ejemplos, junto con descripciones de experimentos que definen las propiedades de las células Gut Ins⁻ y su uso terapéutico. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, los datos muestran que la función fisiológica de Foxo1 en Gut N3 Prog es restringirlos al linaje enteroendocrino, suprimiendo así el linaje endocrino pancreático. Aunque FOXO1 se coexpresa con Neurogenina 3 en el páncreas, la ablación de FOXO1 no afecta a la generación de diferentes tipos de células endocrinas pancreáticas (28-29).

Las similitudes entre los ratones PKO y NKO muestran que la reducción de la expresión de Foxo1 en etapas más tempranas en la diferenciación de células madre epiteliales también alivia la supresión dependiente de Foxo1 del linaje endocrino pancreático. Es importante destacar que las células Gut N3 Prog generan células Gut Ins⁻ a lo largo de la vida del ratón. Lo mismo se espera que sea el caso en seres humanos. Estas vías están altamente conservadas y existen mutaciones humanas en el gen que codifica la Neurogenina3 en las que se describen anomalías de la función intestinal. Por tanto, los agentes que reducen la expresión de la proteína FOXO o la actividad biológica en Gut N3 Prog pueden administrarse en cualquier momento para iniciar el fenotipo de diferenciación pancreática endocrina. Esto también se muestra en la Figura 20, lo que demuestra que la inhibición de Foxo1 por el ARNi puede inducir a las células intestinales en un ratón normal a convertirse en Ins⁺. Porque las células intestinales se renuevan rápidamente, la terapia puede requerir la readministración periódica de estos agentes como se describe a continuación. Los resultados que muestran que los ratones NKO tratados con estreptozotocina son capaces de regenerar células productoras de insulina en el intestino muestran que el fenotipo persiste durante más de una generación de células.

Proteínas FOXO

Los factores de transcripción FOXO integran señales hormonales y de nutrientes con la respuesta transcripcional de la célula para regular diversos procesos celulares, incluida la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN y la sensibilidad a la insulina (revisado en Tran et al., 2003). Además de sus funciones metabólicas, las proteínas FOXO inhiben la diferenciación terminal en múltiples tipos de células (31-32). En el

páncreas, FOXO1 desempeña una función importante para regular negativamente la masa de células endocrinas (26-28) y promover la respuesta de las células beta al estrés (29-30). la ablación de FOXO1 no afecta a la generación de diferentes tipos de células endocrinas pancreáticas (28-29).

5 Nakae et al (2002) demostraron que la Foxo1 murina se expresa en diferentes tejidos y es un regulador negativo de la sensibilidad a la insulina en el hígado, células beta pancreáticas y adipocitos. La señalización alterada de insulina a FOXO1 proporciona un mecanismo unificador para las anomalías metabólicas de la diabetes de tipo 2. Los estudios en seres humanos muestran que FOXO1 está regulada negativamente por PKB/Akt humana, una serina/treonina quinasa que se encuentra aguas abajo de la PI3 quinasa en la cascada de señalización de la insulina; esta regulación incluye una fosforilación rápida y jerárquica de FOXO1 en tres sitios de consenso de fosforilación de PKB/Akt (Tran et al., 2003).

10 La característica definitoria de las proteínas Foxo es la caja o motivo forkhead, un dominio de unión al ADN con aproximadamente 80 a 100 aminoácidos que está formado por tres hélices y dos bucles grandes característicos, o "alas". Siguiendo una nomenclatura estandarizada para estas proteínas (Kaestner et al., 2000), todas las letras en mayúsculas se usan para seres humanos (por ejemplo, FOXO1), y para ratones solo la primera letra está en mayúsculas (por ejemplo, Foxo1). El gen FOXO1 identificado en Genbank NM_002015.3) (anteriormente también FOXO1; FKH1; FKHR; y FOXO1A) es la isoforma FOXO más abundante en tejidos sensibles a la insulina, tales como células hepáticas, adiposas y pancreáticas. FOXO4 (también conocida como AFX; AFX1; MLLT7; MGC120490; FOXO4) se establece en Genbank NM_005938.3); FOXO3 (también conocida como FOXO2; AF6q21; FKHL1; FOXO3A; FKHL1P2; MGC12739; MGC31925; DKFZp781A0677); se establece en Genbank NM_001455.3. Todas se incorporan en el presente documento por referencia. Los expertos en la materia podrán construir nucleótidos antisentido y ARNip apropiados utilizando procedimientos conocidos en la técnica basados en esta secuencia.

25 La homología significativa entre los genes que codifican las diversas proteínas FOXO y las proteínas mismas en animales, incluyendo seres humanos y ratones, significa que el ARNhc, ARNip y ARN o ADN antisentido dirigidos al ARNm de FOXO1 o al gen también pueden ser suficientemente complementarios a FOXO3 y FOXO4, para reducir su expresión. De manera similar, el ARNip y antisentido diseñados para dirigir a FOXO4 o FOXO3 pueden ser suficientemente complementarios a FOXO1 para reducir su expresión. Debido a que los experimentos se realizaron en ratones, se usó la nomenclatura en minúsculas, sin embargo, como se usa en el presente documento, "Foxo" significa cualquier proteína Foxo, gen o ARNm de cualquier especie. Para los fines de los procedimientos y composiciones de la invención, Las "proteínas Foxo" incluyen ortólogos (análogos en diferentes especies) como Foxo1 y sus fragmentos biológicamente activos. En ciertas realizaciones, el fenotipo Gut Ins⁺ deseado se produce reduciendo la expresión o actividad de una o más proteínas Foxo, preferentemente incluyendo Foxo1. De este modo, reduciendo otras proteínas forkhead incluyendo FOXO2, FOXO4 y FOXO3 también se espera cambiar las células no productoras de insulina a células productoras de insulina, solas o junto con la reducción de FOXO1.

40 Debido a la secuencia de homología, el ARN antisentido o ARNip producidos contra Foxo1 podrían usarse en otros animales, incluyendo seres humanos, y viceversa. Todas las ID de los genes y números de registro y los correspondientes nucleótidos que codifican proteínas Foxo, genes, ARNm y ADNc se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

TABLA 1 NÚMEROS DE ID DE LOS GENES PARA LOS GENES DE FOXO Y ARNm

Símbolo del gen	Símbolo del gen:	Símbolo del gen:	Símbolo del gen:	Símbolo del gen:
FOXO1	FOXO1	Foxo1	Foxo3	FOXO3
Símbolos alternativos: Afxh, FKHR, Fkhr1, Foxo1a	Símbolos alternativos: FKH1, FKHR, FOXO1A	Símbolos alternativos: Fkhr, Foxo1a	Símbolos alternativos: 1110048B16Rik, 2010203A17Rik, C76856, FKHL1, Fkhr2, Foxo3a	Símbolos alternativos: AF6q21, DKFZp781A0677, FKHL1, FKHL1P2, FOXO2, FOXO3A, MGC12739, MGC31925
Organismo: <u>Ratón</u>	Organismo: Ser humano	Organismo: Rata	Organismo: Ratón	Organismo: Ser humano
Id del gen: <u>56458</u>	Id del gen: <u>2308</u>	Id del gen: <u>84482</u>	Id del gen: <u>56484</u>	Id del gen: <u>2309</u>
Nombre del gen: Caja Forkhead O1	Nombre del gen: Caja Forkhead O1	Nombre del gen: Caja Forkhead O1	Nombre del gen: Caja Forkhead O3	Nombre del gen: Caja Forkhead O3
Números de registro: <u>NM_019739</u>	Números de registro: <u>NM_002015</u>	Números de registro: <u>XM_001056726;</u> <u>XM_342244</u>	Números de registro: <u>NM_019740</u>	Números de

				registro: <u>NM_001455:</u> <u>NM_201559</u>
Símbolo del gen: FOXO4 Símbolos alternativos: AFX, AFX1, MGC120 490, MLLT7 Organismo: Ser humano Id del gen: <u>4303</u> Nombre del gen: Caja Forkhead O4 Números de registro: <u>NM_05938</u>	Símbolo del gen: Foxo4 Símbolos alternativos: afx, Afxh, Foxo4, Afxh, MGC117660, Mllt7 Organismo: de ratón Id del gen: 54601 Nombre del gen: Caja Forkhead O4 Número de registro <u>NM_019739.3</u>	Símbolo del gen: Foxo4 Símbolos alternativos: LOC302415, RGD1561201 Organismo: Rata Id del gen: 302415 Nombre del gen: Caja Forkhead O4 Número de registro <u>NM_001106943.1</u>	Símbolo del gen: Foxo3 Símbolos alternativos: Fkhr1, Foxo3a Organismo: Rata Id del gen: <u>294515</u> Nombre del gen: Caja Forkhead O3 Números de registro: <u>NM_001106395</u>	

ARNm de la caja forkhead O1 (FOXO1) de Homo sapiens

Secuencia de referencia en NCBI: NM_002015.3

5

Caja O1 Forkhead de Mus Musculus (Foxo1), ARNm

Secuencia de referencia en NCBI: NM_019739.3

10

Caja O1 Forkhead de Rattus norvegicus (Foxo1), ARNm

Secuencia de referencia en NCBI: NM_001191846.1

15

Caja O3 forkhead (FOXO3) de Homo sapiens, variante 1 del transcrito, ARNm

Secuencia de referencia en NCBI: NM_001455.3

Caja O3 forkhead (FOXO3) de Homo sapiens, variante 2 del transcrito, ARNm

20

Secuencia de referencia en NCBI: NM_201559.2

Caja O3 Forkhead de Mus Musculus (Foxo3), ARNm

Secuencia de referencia en NCBI: NM_019740.2

25

Caja O3 Forkhead de Rattus norvegicus (Foxo3), ARNm

Secuencia de referencia en NCBI: NM_001106395.1

30

Caja O4 forkhead (FOXO4) de Homo sapiens, variante 2 del transcrito, ARNm

Secuencia de referencia en NCBI: NM_001170931.1

Caja O4 forkhead (FOXO4) de Homo sapiens, variante 1 del transcrito, ARNm

35

Secuencia de referencia en NCBI: NM_005938.3

Caja O4 Forkhead de Rattus norvegicus (Foxo4), ARNm

40

Secuencia de referencia en NCBI: NM_001106943.

Caja O4 Forkhead de Mus Musculus (Foxo4), ARNm

- Secuencia de referencia en NCBI: NM_018789.2
- 5 Genomic RefSeqGene, FOXO1 humana, NG_023244.1.
- Cepa C57BL/6J Foxo1 de *Mus musculus*, cromosoma 3, MGSCv37 C57BL/6J, NC_000069.5.
- Foxo1 de rata, NC_005101.2, NW_047625.2.
- 10 FOXO3 humana, NC_000006.11.
- Foxo3 de ratón, NC_000076.5.
Foxo3 de rata, NC_005119.2.
- 15 FOXO4 humana, NC_000023.10.
- Foxo4 de ratón, NC_000086.6.
- Foxo4 de rata, NC_005120.2.
- 20 **Caja O1 forkhead [*Mus musculus*]**
- GenBank: EDL35224.1
- 25 Proteína FKHR1 de forkhead [Ratón]
- Swiss-Prot: Q9WVH5
- Proteína de caja O1 forkhead [*Homo sapiens*]**
- 30 **Secuencia de referencia en NCBI: NP_002006.2**
- Proteína de caja O1 forkhead [*Rattus norvegicus*]
- 35 Secuencia de referencia en NCBI: NP_001178775.1
- Proteína de caja O3 forkhead [*Homo sapiens*]**
- Secuencia de referencia en NCBI: NP_963853.1**
- 40 Proteína de caja O3 forkhead [*Homo sapiens*]
- Secuencia de referencia en NCBI: NP_001446.1
- 45 **Proteína de caja O3 forkhead [*Rattus norvegicus*]**
- Secuencia de referencia en NCBI: NP_001099865.1**
- 50 Proteína O3 de caja forkhead [*Mus musculus*]
- Secuencia de referencia en NCBI: NP_062714.1
- Proteína de caja O4 forkhead [*Rattus norvegicus*]**
- 55 **Secuencia de referencia en NCBI: NP_001100413.1**
- Isoforma 2 de proteína de caja O4 forkhead [*Homo sapiens*]
- Secuencia de referencia en NCBI: NP_001164402.1
- 60 **Isoforma 1 de proteína de caja O4 forkhead [*Homo sapiens*]**
- Secuencia de referencia en NCBI: NP_005929.2**
- 65 Proteína O4 de caja forkhead [*Mus musculus*]

Secuencia de referencia en NCBI: NP_061259.1

Se pueden producir ARNA pequeños interferentes y antisentido para su uso en la reducción de la expresión de proteínas Foxo que hibridan específicamente con el gen y/o ARNm que codifica una proteína Foxo y que son lo suficientemente complementarios para bloquear la expresión de proteínas mediante el bloqueo de la transcripción o traducción, respectivamente. La reducción de la expresión de Foxo1 hará que las células Gut Ins⁺ se diferencien en células Gut Ins⁻, lo que dará como resultado niveles elevados de insulina en comparación con los niveles de pretratamiento.

Los ratones NKO en los que los genes Foxo se desactivaron en células endocrinas del intestino y el páncreas, sin embargo, parecían saludables y no tenían enfermedades aparentes, incluido cáncer. Asimismo, los ratones que carecían de todos los genes Foxo (1, 3 y 4) en el hígado estaban sanos y eran extremadamente sensibles a la insulina, y no desarrollaron ninguna anomalía en las pruebas de función hepática ni en las patologías hepáticas, lo que indica que la inhibición de Foxo es segura y sin efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, reduciendo la expresión de FOXO1, 3 y/o 4 o su actividad biológica en un sujeto humano, especialmente de manera transitoria, con el fin de células enteroendocrinas intestinales secretoras de "hormona pancreática" para tratar o prevenir la diabetes y otros trastornos asociados con el mal funcionamiento del páncreas, probablemente tendrá pocos efectos adversos. Esto sería cierto incluso si la expresión o actividad biológica de todas las proteínas FOXO se reduce dramáticamente.

En el trabajo anterior de los autores, Matsumoto et al The Journal of Clinical Investigation, Volumen 116 Número 9 de septiembre de 2006, se usó ARNhc para reducir la expresión de Foxo1 dirigiéndose a la secuencia GCACCGACTTTATGAGCAACC **SEQ ID NO: 1** de Foxo1 usando ARN de horquilla corta (de BD Biosciences) como secuencia diana de ARNip de control. Debido a la secuencia de homología, esta secuencia o una secuencia sustancialmente homóloga en FOXO1 humano puede ser un buen objetivo. Liu et al., Cancer Gene Therapy 14, 945-952, diciembre de 2007, también describen el uso de inhibidores de ARN en ratones para reducir la expresión de Foxo1 en el músculo esquelético. El ARNhc utilizado en los experimentos descritos en el presente documento se identifica en el Ejemplo 10. Labied, S, et al. Molecular Endocrinology 20(1):35- 44, proporcionan una descripción de moléculas antisentido que inactivan varias proteínas FOXO humanas, incluyendo: FOXO1-antisentido (TTG GGT CAG GCG GTT CA **SEQ ID NO: 2**); FOXO3a-sentido (CCC AGC CTA ACC AGG GAA GT **SEQ ID NO: 3**) y FOXO3a-antisentido (AGC GCC CTG GGT TTG G **SEQ ID NO: 4**); FOXO4-sentido (CCT GCA CAG CAA GTT CAT CAA **SEQ ID NO: 5**) y FOXO4-antisentido (TTC AGC ATC CAC CAA GAG CTT **SEQ ID NO: 6**). S. Stephen, et al., Cancer Research 70, 367, viernes, 1 de enero de 2010, describe el uso de algoritmos de predicción de objetivos de microARN (miR), para identificar varios miR que se unen a la región 3' no traducida (UTR) de los transcritos de FOXO1 en líneas celulares de cáncer de endometrio humano que inhiben la expresión de FOXO1.

Nucleótidos antisentido y ARNip

Otras realizaciones de la presente invención se refieren al uso de ácidos nucleicos antisentido o ARN (ARNip) pequeño interferente o ARNhc para reducir o inhibir la expresión y, por lo tanto, la actividad biológica de las proteínas Foxo dirigidas. Sobre la base de estas secuencias conocidas de las proteínas Foxo y los genes que las codifican, el ADN o ARN antisentido que son lo suficientemente complementarios al gen o ARNm respectivo para desactivar o reducir la expresión se pueden diseñar y modificar por ingeniería fácilmente utilizando procedimientos conocidos en la técnica. En una realización específica de la invención, las moléculas antisentido o de ARNip para usar en la presente invención son aquellas que se unen en condiciones rigurosas al ARNm dirigido o al gen dirigido que codifica una o más proteínas Foxo identificadas por los números de Genbank, o a variantes o fragmentos que son sustancialmente homólogos al ARNm o gen que codifica una o más proteínas Foxo. Los compuestos antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico.

Los procedimientos para fabricar ácidos nucleicos antisentido son bien conocidos en la técnica. Además, se proporcionan procedimientos para reducir la expresión de uno o más genes de Foxo y ARNm en células progenitoras intestinales que no producen insulina poniendo en contacto las células *in situ* o contactando poblaciones enriquecidas aisladas de células o explantes de tejidos en cultivo que comprenden las células con uno o más compuestos antisentido o composiciones de la invención. Como se usa en el presente documento, los términos "ácido nucleico diana" abarcan el ADN que codifica una o más proteínas Foxo y el ARN (incluido el preARNm y el ARNm) transcritos a partir de dicho ADN. La hibridación específica de un compuesto oligomérico de ácido nucleico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con él se denomina, generalmente, "antisentido". Las funciones del ADN a interferir incluyen la replicación y la transcripción. Las funciones del ARN que se va a interferir incluyen todas las funciones vitales, tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, traducción de la proteína desde el ARN y la actividad catalítica en la que puede participar o facilitar el ARN. El efecto global de dicha interferencia con la función del ácido nucleico diana es modular o reducir la expresión de la proteína codificada por el ADN o ARN. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa reducir o inhibir en la expresión del gen o ARNm para una o más proteínas Foxo.

El proceso de direccionamiento incluye la determinación de uno o más o sitios dentro del ADN o ARN diana que

codifica la proteína Foxo para que se produzca la interacción antisentido de manera que se logre el efecto inhibitorio deseado. Dentro del contexto de la presente invención, un sitio intragénico preferido es la región que abarca el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del ARNm para las proteínas diana. Dado que, tal como se conoce en la materia, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en las moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se conoce como "codón AUG", "codón de iniciación" o "codón de iniciación AUG". Una minoría de los genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG se ha demostrado que funcionan *in vivo*. Por tanto, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de inicio" pueden abarcar muchas secuencias de codones, aunque el aminoácido iniciador en cada caso normalmente es metionina en eucariotas. También se sabe en la técnica que los genes eucariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede utilizarse de forma preferente para el inicio de la traducción en un tipo celular o tejido en concreto o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de inicio" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita de un gen. La experimentación de rutina determinará la secuencia óptima del antisentido o ARNip

También se conoce en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o "codón de parada") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Las expresiones "región del codón de inicio" y "región del codón de iniciación de la traducción" hacen referencia a una parte de dicho ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. De manera similar, las expresiones "región del codón de parada" y "región del codón de terminación de la traducción" hacen referencia a una parte de dicho ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región de codificación" que en la técnica se conoce que hace referencia a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que se puede usar como diana de forma eficaz. Otras regiones objetivo incluyen la región no traducida en 5' (5'UTR), que en la técnica se conoce que hace referencia a la porción de un ARNm en la dirección 5' del codón de iniciación de la traducción, y por lo tanto incluye nucleótidos entre el sitio de la tapa 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o los nucleótidos correspondientes en el gen, y la región no traducida en 3' (3'UTR), que en la técnica se conoce que hace referencia a la porción de un ARNm en la dirección 3' del codón de terminación de la traducción y, por lo tanto, incluye los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o los nucleótidos correspondientes en el gen

También se sabe en la técnica que pueden producirse variantes mediante el uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción y que los pre-ARNm y los ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o un codón de parada. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de inicio alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Los transcritos que usan un codón de parada alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante poliA", en la que los múltiples transcritos producidos son el resultado de la selección alternativa de una de las "señales de parada poliA" por la maquinaria de transcripción, que de este modo produce transcritos que terminan en sitios poliA únicos.

Una vez identificados uno o más sitios de destino, se eligen los ácidos nucleicos que son suficientemente complementarios de la diana; lo que significa que los ácidos nucleicos hibridarán suficientemente bien y con la suficiente especificidad, para dar el efecto deseado de inhibir la expresión de los genes y la transcripción o la traducción del ARNm.

En el contexto de la presente invención, "hibridación" significa puentes de hidrógeno, que puede ser puentes de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen inversos, entre bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias. Por ejemplo, la adenina y la timina son bases nitrogenadas complementarias que se emparejan mediante la formación de puentes de hidrógeno. "Complementario", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición en un ácido nucleico es capaz de formar un puente de hidrógeno con un nucleótido de hidrógeno en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, el ácido nucleico y el ADN o ARN se consideran complementarios entre sí en esa posición. El ácido nucleico y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula está ocupado por bases nucleotídicas que pueden unirse entre sí por puentes de hidrógeno. Por tanto, "hibridable de manera específica" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado de complementariedad o de emparejamiento preciso suficiente de tal forma que se produce una unión estable y específica entre el ácido nucleico inhibidor y el ADN o ARN diana. En la técnica se entiende que la secuencia de un compuesto antisentido no necesita ser el 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para que sea específicamente hibridable. Un compuesto antisentido se puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de función, y existe un grado suficiente de complementariedad para

evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayo *in vivo* o de tratamiento terapéutico y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

5 Aunque los ácidos nucleicos antisentido son una forma preferida de compuesto antisentido, La presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos, incluyendo, pero sin limitaciones, los miméticos de oligonucleótidos. Los compuestos antisentido de acuerdo con la presente invención comprenden, preferentemente, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 bases nitrogenadas (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleósidos unidos). Los compuestos antisentido particularmente preferidos son ácidos nucleicos antisentido que comprenden de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 bases nitrogenadas. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, ácidos nucleicos de la secuencia guía externa (EGS) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos o ácidos nucleicos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los ácidos nucleicos en el contexto de la presente invención incluyen "oligonucleótidos", que hacen referencia a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por bases nitrogenadas de origen natural, azúcares y enlaces internucleósidos covalentes (esqueleto), así como oligonucleótidos que tienen porciones de origen no natural que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son a menudo preferidos sobre las formas nativas debido a las propiedades deseables, tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por el ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

20 Los ácidos nucleicos antisentido se han empleado como restos terapéuticos en el tratamiento de estados de enfermedad en animales y seres humanos. Los fármacos de ácido nucleico antisentido, incluyendo ribozimas, se han administrado de forma segura y eficaz a seres humanos y actualmente se están realizando numerosos ensayos clínicos. Por tanto, se establece que los ácidos nucleicos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes terapéuticos para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos, por ejemplo, para regular por disminución la expresión de una o más proteínas Foxo.

25 Los compuestos de ARN antisentido y ARNip de la presente invención pueden utilizarse para diagnósticos, terapéutica y profilaxis, y como reactivos y kits de investigación. Para terapéuticos, se trata a un animal, preferentemente, un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno, tal como diabetes, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa y/o obesidad, donde hay un nivel de insulina inadecuadamente bajo, que puede tratarse reduciendo la expresión de una o más proteínas Foxo, administrando compuestos antisentido de acuerdo con la presente invención. Los compuestos de la presente invención se pueden usar en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto antisentido a un diluyente o vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. Los compuestos antisentido y los procedimientos de la invención son útiles profilácticamente, por ejemplo, para prevenir o retrasar la aparición de diabetes, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico u obesidad. Los compuestos antisentido y los procedimientos de la invención también son útiles para retrasar la progresión del síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, diabetes, aterosclerosis u obesidad.

40 La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido descritos en el presente documento.

ARNip

45 La solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0023390 (cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia como se expone completamente en el presente documento) enseña que el ARN bicatenario (ARNdc) puede inducir, en muchos organismos, silenciamiento génico postranscripcional específico de la secuencia mediante un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). Sin embargo, en células de mamífero, el ARNdc que tiene 30 pares de bases o más puede inducir respuestas no específicas de secuencia que desencadenan un apagado de la síntesis de proteínas e incluso la muerte celular a través de la apoptosis. En trabajos recientes se muestra que los fragmentos de ARN son los mediadores específicos de secuencia de la iARN (Elbashir et al., 2001). En la actualidad, la interferencia de la expresión génica por estos ARN interferentes pequeños (ARNip) se reconoce como una estrategia natural para silenciar genes en *C. elegans*, *Drosophila*, plantas, y en células madre embrionarias de ratón, oocitos y embriones tempranos (Cogoni et al., 1994; Baulcombe, 1996; Kennerdell, 1998; Timmons, 1998; Waterhouse et al., 1998; Wianny y Zernicka-Goetz, 2000; Yang et al., 2001; Svoboda et al., 2000).

60 En el cultivo de células de mamíferos, se ha logrado una reducción mediada por ARNip de la expresión génica mediante la transfección de células con ácidos nucleicos ARN sintéticos (Caplan et al., 2001; Elbashir et al., 2001). La solicitud 2004/0023390, cuyo contenido total se incorpora en el presente documento por referencia como si estuviera detallado completamente en el presente documento, proporciona procedimientos de ejemplo que utilizan un vector viral que contiene un casete de expresión que contiene un promotor de pol II unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) dirigida contra un gen de interés.

65 Como se usa en el presente documento, la iARN es el proceso de interferencia por ARN. Un ARNm típico produce

aproximadamente 5.000 copias de una proteína. La iARN es un proceso que interfiere o reduce significativamente el número de copias de proteínas producidas por un ARNm. Por ejemplo, una molécula de ARN de interferencia corto bicatenario (ARNip) está diseñada para complementar y emparejar la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína del ARNm diana a interferir. Tras la liberación intracelular, la molécula de ARNip se asocia con un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El RISC asociado al ARNip se une a la diana a través de una interacción de emparejamiento de bases y lo degrada. El RISC sigue siendo capaz de degradar copias adicionales del ARNm diana. Se pueden usar otras formas de ARN, tal como el ARN de horquilla corta y las moléculas de ARN más largas. Las moléculas más largas causan la muerte celular, por ejemplo instigando la apoptosis e induciendo una respuesta de interferón. La muerte celular fue el principal obstáculo para lograr iARN en mamíferos, porque los ARNdc de mayor longitud que 30 nucleótidos activaron los mecanismos de defensa que dieron como resultado una degradación no específica de los transcritos de ARN y un apagado general de la célula huésped. El uso de ARNip de aproximadamente 20 a aproximadamente 29 nucleótidos para participar en la supresión específica de gen en células de mamíferos ha superado aparentemente este obstáculo. Estos ARNip son lo suficientemente largos como para producir supresión de genes.

Ciertas realizaciones de la invención están dirigidas al uso de ARNhc, antisentido o ARNip para bloquear la expresión de FOXO1, 3 y/o 4 u ortólogos, análogos y variantes de los mismos en un animal. Los nucleótidos antisentido pueden diseñarse utilizando capacidades de rutina en la técnica para usar como dianas ADN o ARNm humano que codifica una proteína FOXO, como se describe con más detalle a continuación. Los compuestos antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico, o construcciones de vectores genéticos diseñados para dirigir la síntesis *in vivo* de moléculas antisentido.

Existen varias realizaciones para administrar el ARNip a células intestinales que suficientemente complementario a una o más proteínas Foxo para reducir la expresión. Se han probado procedimientos de administración para lograr la transfección *in vivo*, tal como recubrir el ARNip con liposomas o nanopartículas. También hay una tecnología novedosa dirigida específicamente a la administración de ARNip en el epitelio intestinal, denominada "Interferencia por ARN Transkingdom". Los inventores de esta técnica han modificado genéticamente bacterias *E. Coli* no patógenas que son capaces de producir ARN de horquilla corta (ARNhc) dirigido a un gen de mamífero (Xiang, S., et al., 2009. *In vitro* and *in vivo* gene silencing by TransKingdom RNAi (tkRNAi). *Methods Mol Biol* 487:147-160.). Se utilizaron dos factores para facilitar la transferencia de ARNhc: los genes de invasina (Inv) y de listeriolisina O (HlyA). Han demostrado que la *E. coli* recombinante puede administrarse por vía oral para liberar un ARNhc contra catenina b1 (Ctnnb1) que inhibe la expresión de este gen en las células epiteliales intestinales sin producir complicaciones sistémicas demostrables por la filtración de bacterias al torrente sanguíneo. Ciertas realizaciones de la invención están dirigidas a usar el procedimiento de interferencia por ARN Transkingdom adaptado a ARNip que silencia una o más proteínas Foxo.

Otros han usado esta técnica para disminuir Abcb1 (Kruhn, A., et al., 2009. Delivery of short hairpin RNAs by transkingdom RNA interference modulates the classical ABCB1-mediated multidrug-resistant phenotype of cancer cells. *Cell Cycle* 8).

Las bacterias que codifican el ARNhc de Foxo1 pueden adquirirse en Cequent Technologies y pueden administrarse, entre otras cosas, mediante sonda oral a las concentraciones recomendadas. Las dosis se pueden determinar mediante análisis de la disminución de Foxo1 en células intestinales en biopsias, por ejemplo, o en animales de ensayo.

En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por bases nitrogenadas de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), así como oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son a menudo preferidos sobre las formas nativas debido a las propiedades deseables, tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por el ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos también pueden citarse como híbridos o gapmeros. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, aunque no de forma limitativa, las patentes de EE.UU. n.º 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención normalmente se administran a un sujeto o se generan *in situ* de modo que hibriden lo suficiente o se unan al ARNm celular y/o al ADN genómico que codifica la proteína de interés, para reducir así la expresión de la proteína, por ejemplo, reduciendo la transcripción y/o la traducción. La hibridación puede ser mediante un nucleótido convencional complementario para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a los dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una vía de administración de

moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención incluye la inyección directa en un sitio de tejido. Como alternativa, las moléculas antisentido pueden modificarse para ser dirigidas a células seleccionadas y, a continuación, administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de manera que se unan específicamente a receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, uniendo las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores o antígenos de la superficie celular. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden liberarse en las células usando los vectores descritos en el presente documento. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren las construcciones de vectores en las que la molécula de ácido nucleico antisentido está bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

Una molécula de ácido nucleico antisentido de la invención puede ser una molécula de ácido nucleico alfa-anomérica. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos específicos de doble cadena con ARN complementario en los que, al contrario que las unidades beta habituales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330). Todos los procedimientos descritos en los artículos anteriores con respecto a la tecnología antisentido se incorporan en el presente documento por referencia.

La invención también abarca ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el que tienen una región complementaria. Por tanto, las ribozimas (por ejemplo, las ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) se pueden usar para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm diana, inhibiendo así la traducción. Una ribozima que tiene especificidad por un ácido nucleico que codifica la diana puede diseñarse según la secuencia de nucleótidos de su ADNc. Por ejemplo, se puede construir un derivado de un ARN L-19 IVS de *Tetrahymena* en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que se escindirán en el ARNm diana. Véase, por ejemplo, Cech et al. patente de Estados Unidos n.º 4.987.071; y Cech et al. patente de Estados Unidos n.º 5.116.742. Como alternativa, se puede usar un ARNm de FOXO dirigido para seleccionar un ARN catalítico con una actividad ribonucleasa específica de un conjunto de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel y Szostak (1993) *Science* 261: 1411-1418, incorporada por referencia en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" hace referencia tanto a ARN como a ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico y ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente). El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario (es decir, una cadena sentido o antisentido). Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que está separado de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en un genoma de mamífero, incluyendo ácidos nucleicos que normalmente flanquean uno o ambos lados del ácido nucleico en un genoma de mamífero (por ejemplo, ácidos nucleicos que flanquean un gen *ARPKD*). El término "aislado", como se usa en el presente documento, con respecto a los ácidos nucleicos también incluye cualquier secuencia de ácido nucleico de origen no natural, ya que tales secuencias de origen no natural no se encuentran en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma de origen natural.

Un ácido nucleico aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN, siempre que se elimine o esté ausente una de las secuencias de ácido nucleico que se encuentran normalmente junto a la molécula de ADN en un genoma natural. Por tanto, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, una molécula de ADN que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ácido nucleico sintetizado químicamente o un ADNc o fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias, así como el ADN que se incorpora a un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus del herpes), o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado genéticamente, tal como una molécula de ADN que forma parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión. Un ácido nucleico que existe entre cientos y millones de otros ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas, o cortes de gel que contienen una fracción digerida por restricción de ADN genómico, no debe considerarse un ácido nucleico aislado.

55 **ARN de interferencia pequeño**

La interferencia por ARN (en adelante, "iARN") es un procedimiento de regulación génica postranscripcional que se conserva a través de muchos organismos eucarióticos. La iARN es inducida por moléculas de ARNi bicatenario ("ARNdc") cortas (es decir, <30 nucleótidos) que están presentes en la célula (Fire A et al. (1998), *Nature* 391: 806-811). Esas moléculas de ARNdc cortas, llamado "ARN de interferencia corto" o "ARNip" provocan la destrucción de los ARN mensajeros ("ARNm") que comparten homología de secuencia con el ARNi en una resolución de un nucleótido (Elbashir S M et al. (2001), *Genes Dev.* 15:188-200). Se cree que el ARNip y el ARNm dirigido se unen a un "complejo silenciador inducido por ARN" o "RISC", que escinde el ARNm diana. Aparentemente, el ARNip se recicla de una forma muy parecida a una enzima de recambio múltiple, con 1 molécula de ARNip capaz de inducir la escisión de aproximadamente 1.000 moléculas de ARNm. La degradación del ARNi de un ARNm mediada por ARNip es, por tanto, más eficaz que las tecnologías disponibles en la actualidad en lo que respecta a la inhibición de

la expresión de un gen diana.

Un experto en la técnica puede producir cualquier número de ARNip diferentes según la secuencia del gen de ADNc de la proteína diana. La solicitud de patente 20040023390 (cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia como se expone completamente en el presente documento) enseña que el ARN bicatenario (ARNdc) puede inducir silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en muchos organismos mediante un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). Sin embargo, en células de mamífero, el ARNdc que tiene 30 pares de bases o más puede inducir respuestas no específicas de secuencia que desencadenan un apagado de la síntesis de proteínas e incluso la muerte celular a través de la apoptosis. En trabajos recientes se muestra que los fragmentos de ARN son los mediadores específicos de secuencia de la iARN (Elbashir et al., 2001). En la actualidad, la interferencia de la expresión génica por estos ARN interferentes pequeños (ARNip) se reconoce como una estrategia natural para silenciar genes en *C. elegans*, *Drosophila*, plantas, y en células madre embrionarias de ratón, oocitos y embriones tempranos (Cogoni et al., 1994; Baulcombe, 1996; Kennerdell, 1998; Timmons, 1998; Waterhouse et al., 1998; Wianny y Zernicka-Goetz, 2000; Yang et al., 2001; Svoboda et al., 2000).

En el cultivo de células de mamíferos, se ha logrado una reducción mediada por ARNip de la expresión génica mediante la transfección de células con ácidos nucleicos ARN sintéticos (Caplan et al., 2001; Elbashir et al., 2001). La solicitud 20040023390, cuyo contenido total se incorpora en el presente documento por referencia como si estuviera detallado completamente en el presente documento, proporciona procedimientos que utilizan un vector viral que contiene un casete de expresión que contiene un promotor de pol II unido de manera operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un molécula de ARN de interferencia pequeño (ARNip) dirigida contra un gen de interés.

Como se usa en el presente documento, la iARN es el proceso de interferencia por ARN. Un ARNm típico produce aproximadamente 5.000 copias de una proteína. La iARN es un proceso que interfiere o reduce significativamente el número de copias de proteínas producidas por un ARNm. Por ejemplo, una molécula de ARN bicatenario de interferencia corto (ARNip) está modificada genéticamente para que sea complementaria y coincida con la proteína que codifica la secuencia de nucleótidos del ARNm diana a interferir. Tras la liberación intracelular, la molécula de ARNip se asocia con un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El RISC asociado a ARNip se une al ARNm diana (tal como el ARNm que codifica una proteína FOXO diana) a través de una interacción de emparejamiento de bases y lo degrada. El RISC sigue siendo capaz de degradar copias adicionales del ARNm diana. Se pueden usar otras formas de ARN, tal como el ARN de horquilla corta y las moléculas de ARN más largas. Las moléculas más largas causan la muerte celular, por ejemplo instigando la apoptosis e induciendo una respuesta de interferón. La muerte celular fue el principal obstáculo para lograr iARN en mamíferos, porque los ARNdc de mayor longitud que 30 nucleótidos activaron los mecanismos de defensa que dieron como resultado una degradación no específica de los transcritos de ARN y una apagado general de la célula huésped. El uso de ARNip de aproximadamente 20 a aproximadamente 29 nucleótidos para participar en la supresión específica de gen en células de mamíferos ha superado aparentemente este obstáculo. Estos ARNip son lo suficientemente largos como para que produzcan supresión de genes, pero no tienen una longitud que induzca una respuesta de interferón.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" del ARNip es una cantidad suficiente para causar la degradación mediada por ARNi del ARNm diana, o una cantidad suficiente para inhibir la progresión de una enfermedad enumerada en un sujeto o para cambiar el fenotipo de una célula enteroendocrina Insulina⁻ N3 Prog o Ins⁻ a una célula Ins⁺.

Como se usa en el presente documento, "aislado" significa alterado o extraído del estado natural por intervención humana. Por ejemplo, un ARNip presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero un ARNip sintético o un ARNip parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ARNip aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo, tal como, por ejemplo, una célula en la que se ha liberado el ARNip. A menos que se indique otra cosa, todas las secuencias de ácido nucleico en el presente documento se dan en la dirección 5' a 3'. Asimismo, todos los desoxirribonucleótidos en una secuencia de ácido nucleico están representados por letras mayúsculas (por ejemplo, desoxitimidina es "T"), y los ribonucleótidos en una secuencia de ácido nucleico están representados por letras minúsculas (por ejemplo, uridina es "u").

Anticuerpos

Los agentes que reducen la actividad biológica de una proteína Foxo incluyen anticuerpos (incluidas porciones o fragmentos o variantes de fragmentos de anticuerpos o variantes de anticuerpos) que tienen afinidad de unión específica por la proteína Foxo deseada, se esta forma interfieren con su actividad biológica. Estos anticuerpos reconocen un epítipo en una proteína diana o un fragmento biológicamente activo de la misma, es decir, Foxo 1,2, 3 o 4. En ciertas realizaciones, los anticuerpos reducen la capacidad de Foxo para aumentar la síntesis de N3.

Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una porción de unión a antígeno (fragmento) de la misma que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, y se entiende que incluye fragmentos de

anticuerpos bioactivos. Los anticuerpos terapéuticamente útiles para tratar o prevenir una enfermedad enumerada o cambiar un fenotipo como se describe incluyen cualquier anticuerpo contra cualquier proteína FOXO o análogo, ortólogo o variante de la misma, preferentemente FOXO1, 2, 3 o 4, que reduce la actividad biológica de la proteína Foxo respectiva en una célula Gut Ins- Prog, tal como una célula Gut N3 Prog.

Una vez producidos, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden analizarse para determinar el reconocimiento del polipéptido diana mediante procedimientos de inmunoensayo estándar, que incluyen, por ejemplo, ensayo inmunoenzimático (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA). Véase, Short Protocols in Molecular Biology eds. Ausubel et al., Green Publishing Associates and John Wiley & Sons (1992).

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítipos generalmente consisten en agrupaciones en superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos generalmente tienen al menos cinco aminoácidos contiguos. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos que son específicas para un antígeno particular, mientras que los anticuerpos monoclonales son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un epítipo en particular contenido dentro de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son particularmente útiles en la presente invención.

Los fragmentos de anticuerpos que tienen afinidad de unión específica para el polipéptido de interés pueden generarse mediante técnicas conocidas. Tales fragmentos de anticuerpos incluyen, aunque no de forma limitativa, fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab. Véase, por ejemplo, Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281. Los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena simple se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos (por ejemplo, de 15 a 18 aminoácidos), dando como resultado un polipéptido monocatenario. Los fragmentos de anticuerpos Fv de cadena sencilla pueden producirse mediante técnicas estándar, tales como los divulgados en la patente de Estados Unidos N.º 4.946.778.

Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que (1) no está asociado con componentes asociados de forma natural, incluyendo otros anticuerpos asociados naturalmente, que lo acompaña en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (21) es expresado por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza.

La expresión "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, todos los dominios variables y constantes pueden derivar de secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo completamente humano). Estos anticuerpos pueden prepararse de una variedad de formas, como se describe más adelante.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que deriva de una especie no humana, en el que ciertos aminoácidos en el marco y los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas se han mutado para evitar o anular una respuesta inmunitaria en seres humanos. Como alternativa, se puede producir un anticuerpo humanizado mediante condensación de los dominios constantes de un anticuerpo humano con los dominios variables de una especie no humana. Los ejemplos de cómo fabricar anticuerpos humanizados se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos n.º 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo, y una o más regiones de uno o más anticuerpos diferentes.

Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos, porciones o análogos de anticuerpos siguiendo las indicaciones de la presente memoria descriptiva. Los extremos amino y carboxi preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferentemente, se usan procedimientos de comparación computarizados para identificar los motivos de la secuencia o los dominios de la conformación prevista de la proteína que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen procedimientos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie et al. Science 253:164 (1991).

Ya se conocen varios anticuerpos anti- proteína Foxo. Es una cuestión de experimentación rutinaria identificar aquellos que bloquean las proteínas Foxo, utilizando los ensayos de cribado *in vitro* descritos en el presente documento.

Procedimientos de cribado

Ciertas realizaciones comprenden el uso de cultivos *ex vivo* de células epiteliales intestinales para ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar miméticos químicos de la ablación con Foxo1. Se proporciona un procedimiento para un ensayo de cribado de alto rendimiento que analiza la efectividad de un agente para inducir células enteroendocrinas intestinales (Gut Ins⁺Prog) de mamífero para que expresen insulina, que comprende aislar las células Gut Ins⁻ como se ha descrito e incubarlas en condiciones adecuadas para la producción y secreción de insulina, proporcionar una población de control y de prueba de células Gut Ins⁻ aisladas en contacto con la población de prueba de células Gut Ins⁻ con un agente de prueba; determinar el nivel de expresión de insulina en la población de control y de prueba (u opcionalmente la presencia de insulina secretada en el medio) ya sea directamente o por medio de un marcador indicador; y seleccionar el agente de prueba si el nivel de insulina en la población de prueba es más alto que el nivel en la de control. Los agentes activos identificados de este modo pueden usarse en las realizaciones de la invención como se ha descrito. Este ensayo se puede hacer de otras formas estudiando las células Gut Ins⁻ en solitario, por ejemplo, para determinar el efecto del agente sobre el nivel de expresión de insulina. Por tanto, se proporciona un procedimiento basado en células para el cribado o ensayo, para un agente activo que aumenta el nivel de expresión de insulina. En una realización específica de la invención, el nivel de expresión de insulina se mide en una población de células (por ejemplo, células Gut Ins⁻) que comprende (a) la eliminación de una población de células Gut Ins⁻ Prog que no producen insulina, incluidas las células progenitoras positivas para Neurogenina 3 y/o las células madre del tracto gastrointestinal de un mamífero, (b) poner en contacto la población de células con un agente que reduce la expresión o actividad biológica de la proteína FOXO (FOXO1, FOXO4 y/o FOXO3), o la de un fragmento biológicamente activo, ortólogo, o variante de la misma en las células (c) determinar el nivel de expresión de insulina y (d) identificar un agente si el nivel de expresión de insulina es mayor en la población de prueba que en el control. Un experto en la técnica sabe cómo variar este procedimiento. Algunos agentes activos que están dentro del alcance de varias realizaciones de la invención incluyen aquellos que aumentan la fosforilación de la proteína FOXO, su degradación o translocación fuera de los núcleos.

En una forma de realización, la población de células de prueba comprende criptas intestinales que están enriquecidas en las células Gut Ins⁻ N3 Prog y células madre y progenitoras intestinales amplificadoras del tránsito, pero que también contienen otros tipos de células, incluidas otras células secretoras (por ejemplo, células de Paneth), enteroendocrinas, madre y progenitoras amplificadoras del tránsito.

Cribado de moléculas pequeñas que convierten las células epiteliales intestinales en células productoras de insulina funcionales. Los defectivos en Foxo1 producen células funcionales productoras de insulina en el intestino y células productoras de insulina en el duodeno de ratones Pdx1-Foxo1^{lox/lox}, en los que Foxo1 se había eliminado en todos los tipos de células intestinales, incluyendo las células madre y las células amplificadoras del tránsito. Estos resultados muestran que se pueden inducir múltiples tipos de células epiteliales intestinales para que se conviertan en células productoras de insulina con un perfil de expresión pancreática, por lo tanto, la generación de células productoras de insulina en el intestino no está restringida a un número limitado de células Neurog3 + Prog intestinales. Es más, desde el punto de vista del desarrollo de ensayos de cribado robustos, se pueden usar células epiteliales intestinales aisladas de criptas, ya que son relativamente abundantes y fáciles de obtener.

El alelo de inserción Insulina-GFP es una lectura sensible y específica para la generación de células positivas para insulina. Varias realizaciones del ensayo de cribado implican el aislamiento de células epiteliales intestinales de ratones portadores del alelo de inserción Insulina-GFP, estableciendo cultivos primarios que serán sometidos a paneles de cribado alto rendimiento utilizando, por ejemplo, una biblioteca de moléculas pequeñas.

La lectura estará representada por la aparición de celdas verdes y el sistema de detección se elegirá en consecuencia. Una realización utiliza dos lecturas positivas. La primera lectura utilizará células cultivadas de ratones defectivos en Foxo1 NKO que son espontáneamente fluorescentes. Esto tendrá la doble finalidad de proporcionar un control positivo y calibrar la sensibilidad del ensayo, porque las células fluorescentes pueden detectarse en medio de un fondo de células negativas. Como segundo control positivo, se utilizarán células transducidas con ARNip de Foxo1 para optimizar las condiciones que recapitulan la generación de células productoras de insulina intestinal *in vitro*. Las células se volverán verdes cuando se inhiba Foxo1. Otra realización utiliza células aisladas del intestino embrionario tardío, o células transducidas con una mezcla de ARNip a las tres isoformas de Foxo (1, 3 y 4).

Son posibles diversas variaciones de esta cribado inicial. Para establecer condiciones propicias para la aparición de células Ins⁺ que sean células similares a [2] las células epiteliales primarias del intestino de ratones portadores del alelo de inserción *Ins2-Gfp* se tratarán con ARNip de Foxo1 y se cultivarán en medios de diferenciación de páncreas para optimizar el número de células Ins-Gfp⁺. A continuación, estas condiciones verificadas pueden usarse para la cribado de moléculas pequeñas que dan lugar a células Ins-Gfp⁺. Otra realización incluye además un ensayo para determinar la capacidad de las moléculas pequeñas que hacen que las células se vuelvan verdes, para estimular la secreción de insulina. Esto se puede lograr mediante el establecimiento de cultivos de células intestinales primarias en niveles elevados de glucosa o, como alternativa, en glucosa y sulfonilureas. En un tercer conjunto de ensayos, las coincidencias positivas serán evaluadas por su capacidad para revertir la diabetes inducida por STZ en ratones.

En otra realización, los ratones con inserción Neurog3-Gfp se usan para la cribado en bibliotecas químicas para

determinar la capacidad de aumentar el número de células progenitoras enteroendocrinas. Los ensayos se modelarán de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente.

5 Otras realizaciones están dirigidas a procedimientos para determinar la capacidad de un agente candidato para tratar o prevenir en un animal cualquiera de las enfermedades o trastornos enumerados asociados con la función pancreática alterada, que comprenden: (a) proporcionar un animal de prueba que sea diabético debido a una disfunción pancreática, por ejemplo, ratones KO o ratones tratados con estreptozotocina o ratones *db/db* o *ob/ob* (dos modelos animales de diabetes de tipo 2 y obesidad) o una rata ZDF (una rata con una mutación similar al ratón *db/db*) o ratones NZO (un modelo de diabetes magra tipo 2) o ratas *fa/fa* (un modelo de obesidad y diabetes) o ratas GK (un modelo de diabetes en rata) y un animal de control, (b) administrar el agente candidato al animal de prueba, (c) comparar el nivel de expresión de insulina en el animal de prueba con el nivel de expresión de insulina en el animal de control, y (d) seleccionar el agente candidato si el nivel de expresión de insulina es mayor en el animal de prueba que en el animal de control. El nivel de expresión de insulina se puede medir de diferentes maneras, por ejemplo, midiendo los niveles de insulina en suero, un aumento en la tolerancia a la glucosa, o sensibilidad a la insulina, o la visualización o detección de células Gut Ins⁺.

20 El término "agente" o "compuesto exógeno" como se usa en el presente documento incluye cualquier molécula, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, lípido, etc., o mezclas de las mismas, con la capacidad de inducir directa o indirectamente Gut Ins-Prog para que se diferencien en células Gut Ins⁺. Generalmente, se puede realizar una pluralidad de mezclas de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones del agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Normalmente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

25 Los agentes de prueba para su uso en la cribado abarcan numerosas clases de sustancias químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 daltons, preferentemente menos de aproximadamente 500 daltons. Algunos agentes de prueba comprenden grupos funcionales que les permiten interaccionar estructuralmente con proteínas, particularmente puentes de hidrógeno, y, normalmente, incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferentemente, al menos dos de los grupos químicos funcionales. Dichos agentes a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes de prueba también se encuentran entre las biomoléculas, incluidos péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Bibliotecas de ligandos y péptidos orgánicos pequeños de alta pureza que tienen actividades farmacológicas bien documentadas están disponibles en numerosas fuentes. Un ejemplo es un conjunto de diversidad del NCI que contiene 1.866 compuestos similares a fármacos (pequeña hidrofobicidad intermedia). Otro es un conjunto de bioactivos conocidos del Instituto de Química y Biología Celular (ICCB; mantenido por la Escuela de Medicina de Harvard) (467 compuestos) que incluye muchos compuestos flexibles extendidos. Algunos otros ejemplos de las bibliotecas del ICCB son: Chem Bridge DiverSet E (16.320 compuestos); Bionet 1 (4.800 compuestos); CEREP (4.800 compuestos); Maybridge 1 (8.800 compuestos); Maybridge 2 (704 compuestos); Maybridge HitFinder (14.379 compuestos); Peakdale 1 (2.816 compuestos); Peakdale 2 (352 compuestos); ChemDiv CombiLab e International (28.864 compuestos); Mixed Commercial Plate 1 (352 compuestos); Mixed Commercial Plate 2 (320 compuestos); Mixed Commercial Plate 3 (251 compuestos); Mixed Commercial Plate 4 (331 compuestos); ChemBridge Microformat (50.000 compuestos); Commercial Diversity Set1 (5.056 compuestos). Otras colecciones del NCI son: Structural Diversity Set, versión 2 (1.900 compuestos); Mechanistic Diversity Set (879 compuestos); Open Collection 1 (90.000 compuestos); Open Collection 2 (10.240 compuestos); Colecciones de bioactivos conocidos: NINDS Custom Collection (1.040 compuestos); ICCB Bioactives 1 (489 compuestos); SpecPlus Collection (960 compuestos); colecciones discretas del ICCB. Los siguientes compuestos del ICCB se obtuvieron individualmente de químicos del ICCB, Harvard, y otras instituciones colaboradoras: ICCB1 (190 compuestos); ICCB2 (352 compuestos); ICCB3 (352 compuestos); ICCB4 (352 compuestos). Extractos de productos naturales: extractos Marinos del NCI (352 pocillos); fracciones orgánicas: extractos de plantas y hongos del NCI (1.408 pocillos); extractos de plantas de Filipinas 1 (200 pocillos); ICCB-ICG Diversity Oriented Synthesis (DOS) Collections; DDS1 (DOS Diversity Set) (9600 pocillos). Las bibliotecas de compuestos también están disponibles de proveedores comerciales, tales como ActiMol, Albany Molecular, Bachem, 55 Sigma-Aldrich, TimTec y otros.

60 Durante la cribado, diseño o modificación de compuestos, otros factores que se deben de considerar incluyen la regla del cinco de Lipinski (no más de 5 donantes de puentes hidrógeno (grupos OH y NH); no más de 10 aceptores de puentes de hidrógeno (notablemente N y O); peso molecular inferior a 500 g/mol; log P del coeficiente de reparto inferior a 5) y los criterios de Veber, que están reconocidos en la técnica farmacéutica y se refieren a propiedades y características estructurales que hacen que las moléculas sean más o menos similares a los fármacos.

65 La biblioteca puede ser completamente aleatoria, sin preferencias de secuencia o constantes en ninguna posición. La biblioteca puede estar sesgada. Es decir, algunas posiciones dentro de la secuencia se mantienen constantes o se seleccionan de un número limitado de posibilidades. Por ejemplo, los nucleótidos o restos de aminoácidos están aleatorizados dentro de una clase definida, por ejemplo, de aminoácidos hidrofóbicos, restos hidrofílicos, restos

sesgados estéricamente (pequeños o grandes), hacia la creación de cisteínas, para la reticulación, prolinas para los dominios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas o histidinas para los sitios de fosforilación, etc., o a purinas, etc.

En algunas realizaciones preferentes, el agente activo es ácido nucleico aislado, preferentemente antisentido, ARNip o ADNc que se une al gen que codifica la proteína de interés, o su ARNm con suficiente complementariedad (como se describe en el presente documento) para bloquear la expresión de genes o la traducción de ARNm, respectivamente. Por "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Tales ácidos nucleicos generalmente contendrán enlaces fosfodiéster, aunque, en algunos casos, como se describe a continuación, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternativos, que comprende, por ejemplo, fosforamida (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49:10):1925 (1993) y las referencias en el mismo; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai et al., *Chem. Lett.* 805 (1984), Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); y Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:141 (1986)), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); y la patente de Estados Unidos n.º 5.644.048), fosforditioato (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989), Enlaces O-metilforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y esqueletos y enlaces peptídicos de ácidos nucleicos (véase Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365:566 (1993); Carlsson et al., *Nature* 380:207 (1996), todos los cuales están incorporados por referencia).

Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con esqueletos positivos (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995); esqueletos no iónicos (patentes de Estados Unidos n.º 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowshi et al., *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30:423 (1991); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleoside* 13:1597 (1994); Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jeffs et al., *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y esqueletos distintos de ribosa, incluyendo los que se describen en las patentes de Estados Unidos con números 5.235.033 y 5.034.506, y en los Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Can Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp 169-176). En Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 página 35 se describen varios análogos de ácido nucleico. Todas estas referencias se incorporan expresamente en el presente documento como referencia. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato se pueden realizar para facilitar la adición de restos adicionales, tales como marcadores, o para aumentar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en ambientes fisiológicos. Además, se pueden realizar mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y sus análogos. Como alternativa, se pueden preparar mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, como se especifica, o contienen porciones de secuencia de doble cadena o de cadena simple. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, en el que el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc.

Los agentes se pueden obtener a partir de bibliotecas químicas combinatorias, una amplia variedad de las cuales están disponibles en la literatura. Por "biblioteca química combinatoria" en el presente documento se entiende una colección de diversos compuestos químicos generados de una manera definida o aleatoria, generalmente por síntesis química. Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos mediante mezcla combinatoria.

Los agentes farmacológicos conocidos y novedosos identificados en cribados pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación para producir análogos estructurales. El agente puede ser una proteína. Por "proteína" en este contexto se entiende al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, péptidos, oligopéptidos y péptidos. La proteína puede estar formada por aminoácidos de origen natural y péptidos unidos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas. Por lo tanto, "aminoácido", o "resto peptídico", como se usa en el presente documento significa aminoácidos tanto de origen natural como sintéticos. Por ejemplo, la homofenilalanina, la citrulina y la noreleucina se consideran aminoácidos para los fines de la invención. "Aminoácidos" también incluye restos de iminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. Las cadenas laterales pueden estar en la configuración (R) o (S). En la realización preferida, los aminoácidos están en la configuración (S) o L. Si se utilizan cadenas laterales no naturales, se pueden usar sustituyentes no aminoacídicos, por ejemplo, para prevenir o retrasar las degradaciones *in vivo*.

El agente puede ser una proteína de origen natural o un fragmento o variante de una proteína de origen natural. Por tanto, por ejemplo, se pueden usar extractos celulares que contienen proteínas, o fracciones de digestiones aleatorias o dirigidas de extractos celulares proteínaceos. De esta manera, se pueden fabricar bibliotecas de proteínas procariontas y eucariotas para detectar su capacidad para inducir la diferenciación de las células Gut Ins-Prog en células Ins⁺. Se pueden usar bibliotecas de proteínas bacterianas, fúngicas, víricas y de mamíferos, prefiriéndose esta última, y siendo especialmente preferidas las de proteínas humanas. Los agentes pueden ser péptidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 aminoácidos, prefiriéndose de aproximadamente 5 a

aproximadamente 20 aminoácidos, y prefiriéndose particularmente de aproximadamente 7 a aproximadamente 15. Los péptidos pueden ser fracciones de la digestión de proteínas de origen natural, como se ha descrito anteriormente, péptidos aleatorios, o péptidos aleatorios "sesgados". Por "aleatorizado" o equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende que cada ácido nucleico y péptido consiste en nucleótidos y aminoácidos esencialmente aleatorios, respectivamente. Como generalmente estos péptidos aleatorios (o ácidos nucleicos, que se analizan a continuación) se sintetizan químicamente, pueden incorporar cualquier nucleótido o aminoácido en cualquier posición. El proceso de síntesis puede diseñarse para generar proteínas o ácidos nucleicos aleatorios, para permitir la formación de todas o la mayoría de las combinaciones posibles a lo largo de la secuencia, formando así una biblioteca de agentes proteínicos bioactivos de agentes aleatorios. Otras variaciones y detalles se exponen en la solicitud de Karsenty US 20100190697.

Fragmentos o variantes biológicamente activos de un agente

Los fragmentos o variantes biológicamente activos de los agentes terapéuticos también están dentro del alcance de la presente invención. Tal como se describe en el presente documento, "biólogicamente activo" significa aumentar al menos un efecto seleccionado del grupo que comprende inducir a células enteroendocrinas del intestino de mamíferos (células Gut Ins-) para que expresen insulina, aumentar la sensibilidad a la insulina, aumentar de la tolerancia a la glucosa, disminuir el aumento de peso, disminuir la masa grasa, aumentar la pérdida de peso en animales con función pancreática alterada, es decir, que no producen ni secretan niveles normales de insulina. Los fragmentos y variantes se describen a continuación. Los fragmentos pueden ser pequeños (no fusionados con otros aminoácidos o péptidos) o pueden estar dentro de un péptido más grande. Además, varios fragmentos pueden estar comprendidos dentro de un único péptido más grande.

Otras variantes de péptidos incluyen aquellas que proporcionan características útiles y novedosas para el agente. Por ejemplo, la variante de un agente peptídico puede tener una inmunogenicidad reducida, una mayor semivida en suero, mayor biodisponibilidad y/o mayor potencia. "Variantes de agentes peptídicos" se refiere a péptidos que contienen modificaciones en sus secuencias de aminoácidos, tal como una o más sustituciones de aminoácidos, adiciones, eliminaciones y/o inserciones, pero que todavía son biológicamente activos. En algunos casos, las propiedades antigénicas y/o inmunogénicas de las variantes no se alteran sustancialmente, en relación con el péptido correspondiente del que se derivó la variante. Tales modificaciones pueden introducirse fácilmente usando técnicas de mutagénesis estándar, tal como la mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótidos como se indica, por ejemplo, en Adelman et al. (DNA, 2:183, 1983) o mediante síntesis química. Las variantes y los fragmentos no son términos mutuamente excluyentes. Los fragmentos también incluyen péptidos que pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos, de forma que los fragmentos aún son biológicamente activos. Las variantes completamente funcionales normalmente contienen solo variaciones conservadoras o variaciones en residuos no críticos o en regiones no críticas. Las variantes funcionales también pueden contener sustituciones de aminoácidos similares, lo que da como resultado ningún cambio, o un cambio insignificante, en la función. Como alternativa, tales sustituciones pueden afectar de forma positiva o negativa a la función en algún grado. La actividad de tales variantes de agentes funcionales se puede determinar utilizando ensayos como los descritos en el presente documento.

Algunas variantes también son derivados de los agentes. La derivación es una técnica utilizada en química que transforma un compuesto químico en un producto de estructura química similar, llamado derivado. En general, un grupo funcional específico del compuesto participa en la reacción de derivatización y transforma el educto en un derivado de la reactividad de desviación, solubilidad, punto de ebullición, punto de fusión, estado agregado, actividad funcional o composición química. Las nuevas propiedades químicas resultantes se pueden usar para la cuantificación o separación del educto o se pueden usar para optimizar el compuesto como agente terapéutico. Las técnicas bien conocidas para la derivatización pueden aplicarse a los agentes. Por tanto, los derivados de los agentes peptídicos descritos anteriormente contendrán aminoácidos que se han modificado químicamente de alguna manera para que se diferencien de los aminoácidos naturales.

También se proporcionan agentes miméticos. "Mimético" se refiere a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales que un péptido de origen natural o no natural, e incluye, por ejemplo, polímeros de tipo péptido y de tipo polinucleótido que tienen esqueletos, cadenas laterales, y/o bases modificados. Los miméticos peptídicos se usan habitualmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. En general, los miméticos son estructuralmente similares (es decir, tienen la misma forma) a un péptido paradigma que tiene una actividad biológica o farmacológica, pero con uno o más enlaces peptídicos reemplazados. El mimético puede estar compuesto completamente de análogos sintéticos no naturales de aminoácidos o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales, siempre que tales sustituciones no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético.

Una breve descripción de varias modificaciones de proteínas que se pueden realizar en los agentes activos que están dentro del alcance de la presente invención se describen en Karsenty, solicitud de Estados Unidos 20100190697.

Preparaciones farmacéuticas

5 Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen uno o más agentes activos como se definen en el presente documento, Incluyendo, pero sin limitaciones, moléculas pequeñas, polipéptidos, los anticuerpos, ácidos nucleicos (incluidos ARN antisentido, ARNip, microARN, Cop1 (proteína 16 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa) y ribozimas que reducen la expresión y/o la actividad biológica de una o más proteínas FOXO en las células Gut Ins- Prog, especialmente N3 Prog, provocando así que se diferencien en células Gut Ins⁺ que producen y secretan insulina. Las composiciones farmacéuticas
10 tendrán uno o más de los siguientes efectos de aumentar la secreción de insulina y la insulina sérica, aumentar la sensibilidad a la insulina, aumentar de la tolerancia a la glucosa, disminuir el aumento de peso, disminuir la masa grasa y producir pérdida de peso.

15 Los agentes terapéuticos generalmente se administran en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la diabetes de tipo 1 y 2, el síndrome metabólico y la obesidad en un sujeto; o para reducir la masa grasa. Las composiciones farmacéuticas de la invención proporcionan una cantidad del agente activo eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno enumerado.

20 Los fragmentos o variantes biológicamente activos de los agentes terapéuticos también están dentro del alcance de la presente invención. Por "biológicamente activo" se entiende capaz de reducir la expresión o la actividad biológica de la proteína Foxo. El agente candidato puede modificarse químicamente para facilitar su captación por las células Gut Ins-. Por ejemplo, podría fusionarse con un ácido biliar o ácido graso para facilitar la captación por las células intestinales; o puede empaquetarse en liposomas u otro sistema de emulsión a base de lípidos para facilitar su absorción; puede estar codificado por bacterias que expresan un antígeno modificado de la superficie celular que
25 promueve su unión a las células epiteliales intestinales, incluyendo péptidos permeables a las células N3 Prog usados para mejorar la captación celular. (Gratton et al., Nature Medicine 9, 357-362 (2003)).

30 El término "administrar" se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier procedimiento de introducción de las composiciones de la presente invención en un sujeto.

35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una serie de modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. Las regiones intestinales que tienen la mayor densidad de células Gut Ins⁺ en ratones NKO se encuentran en el íleon distal y el colon y el duodeno en ratones NKO tratados con STZ. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran por vía oral o local en el colon o en formulaciones dirigidas al mismo para su absorción en el duodeno o se pueden administrar mediante la implantación de una bomba osmótica, preferentemente en un sitio o subcutáneo que es proximal al duodeno, íleon distal o colon. La administración también puede ser intravenosa, parenteral/intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o inyección o infusión intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. También se pueden utilizar supositorios. En algunas
40 realizaciones, se formula una preparación de liberación lenta que comprende los agentes activos. La expresión "liberación lenta" se refiere a la liberación de un fármaco de un sistema de administración de fármacos poliméricos durante un período de tiempo de más de un día, en el que el agente activo se formula en un sistema de administración de fármacos poliméricos que libera concentraciones efectivas del fármaco.

45 Ciertos medicamentos, por ejemplo, resinas que evitan la absorción de ácidos biliares o inhibidores de la descomposición del azúcar, se utilizan en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 y no se absorben nada en el plasma. Tales formulaciones son útiles para las formulaciones farmacéuticas de la presente invención.

50 En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden aproximadamente de 0,1 mg a 5 g, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1 g, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg de agente terapéutico.

55 Además de la administración continua utilizando bombas osmóticas, los agentes activos pueden administrarse como un tratamiento único o, preferentemente, pueden incluir una serie de tratamientos, que continúen a una frecuencia y durante un período de tiempo que haga que uno o más síntomas de la enfermedad enumerada se reduzcan o mejoren, o que logren el efecto deseado, incluidos los efectos del aumento de la secreción de insulina y la insulina sérica, aumentar la sensibilidad a la insulina, aumentar de la tolerancia a la glucosa, disminuir el aumento de peso, disminuir la masa grasa y producir pérdida de peso.

60 Se entiende que la dosis adecuada de un agente activo depende de una serie de factores dentro del conocimiento del médico, veterinario o investigador experto. La o las dosis varían, por ejemplo, dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto o muestra que se esté tratando, además, dependiendo de la vía por la cual se va a administrar la composición y el efecto que el médico desea que tenga un agente activo. Además, se entiende que las dosis apropiadas de un agente activo dependen de la potencia con respecto a la expresión o actividad que se va a modular. Dichas dosis apropiadas pueden determinarse usando los ensayos descritos en el presente documento.
65

- 5 Cuando uno o más de estos agentes activos deben administrarse a un animal (por ejemplo, un ser humano) para modular la expresión o actividad de una proteína Foxo, se puede prescribir primero una dosis relativamente baja, aumentando la dosis después hasta obtener una respuesta apropiada. Además, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular dependerá de una serie de factores, incluidos la actividad del compuesto específico empleado, la edad, del peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad a modular.
- 10 La diabetes de tipo 1 generalmente se diagnostica en niños y adultos jóvenes, pero puede aparecer a cualquier edad y anteriormente se conocía como diabetes juvenil. En la diabetes de tipo 1, el cuerpo no produce insulina. La insulina es una hormona que se necesita para convertir el azúcar (glucosa), almidones y otros alimentos en energía necesaria para la vida diaria. Las afecciones asociadas con la diabetes de tipo 1 incluyen hiperglucemia, hipoglucemia, cetoacidosis y enfermedad celiaca.
- 15 La diabetes de tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes. En la diabetes de tipo 2, o bien el cuerpo no produce suficiente insulina o las células ignoran la insulina. Las afecciones asociadas con la diabetes de tipo 2 incluyen hiperglucemia e hipoglucemia.
- 20 Los trastornos asociados con el metabolismo energético incluyen diabetes, intolerancia a la glucosa, sensibilidad reducida a la insulina, disminución de la proliferación de células beta pancreáticas, disminución de la secreción de insulina, aumento de peso, aumento de la masa grasa y disminución de la adiponectina sérica.
- 25 El agente terapéutico puede formularse con un vehículo aceptable utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. La cantidad real de agente terapéutico necesariamente variará de acuerdo con la formulación particular, la vía de administración y la dosificación de la composición farmacéutica, la naturaleza específica de la afección que se va a tratar y, posiblemente, el sujeto individual. La dosis para las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede variar ampliamente dependiendo de los efectos deseados, la indicación terapéutica y la vía de administración, el régimen, y la pureza y la actividad de la composición.
- 30 Un sujeto adecuado puede ser un individuo o animal que se sospecha que tiene, se ha diagnosticado que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad enumerada, y afecciones similares que pueden ser determinadas por un experto en la técnica.
- 35 Las técnicas para la formulación y administración se pueden encontrar en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20ª edición, Gennaro (ed.) and Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000), incorporado en el presente documento como referencia. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar al sujeto mediante un dispositivo médico, tales como, aunque no de forma limitativa, catéteres, balones, dispositivos implantables, implantes biodegradables, prótesis, injertos, suturas, parches, derivaciones o endoprótesis vasculares. Una descripción detallada de las formulaciones farmacéuticas de oligonucleótidos se expone en la Patente de Estados Unidos N.º 7.563.884.
- 40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una serie de modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluso oftálmica y en las membranas mucosas, incluida la administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico y transdérmico), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular, administración. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración oral.
- 45 50 Los agentes activos pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra manera con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas al receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de tales formulaciones de ayuda de la captación, distribución y/o absorción incluyen, aunque no de forma limitativa, las patentes de EE.UU. n.º 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.
- 55 60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, soluciones, emulsiones, y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, aunque no de forma limitativa, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.
- 65 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que puede presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria

farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el(los) transportador(es) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme y estrecha los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

5 Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.

15 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde los agentes terapéuticos sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero salino fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor EL.RTM. BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición ha de ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

25 El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el agente activo a la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el agente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

45 Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un transportador comestible. Pueden atraparse en cápsulas de gelatina o compactarse formando comprimidos. Dependiendo de las afecciones específicas que se van a tratar, las composiciones farmacéuticas de la presente invención para el tratamiento de la aterosclerosis o los otros elementos del síndrome metabólico pueden formularse y administrarse por vía sistémica o local. Las técnicas para la formulación y administración se pueden encontrar en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20ª edición, Gennaro (ed.) and Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000). Para administración oral, el agente puede estar contenido en formas entéricas para sobrevivir al estómago o adicionalmente recubierto o mezclado para su liberación en una región particular del tracto GI por procedimientos conocidos. Con el objetivo de administración terapéutica oral, el agente activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un transportador fluido para su uso como enjuague bucal, en donde el compuesto en el transportador líquido se aplica por vía oral se usa como enjuague y se expectora o ingiere. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido alginico, PRIMOGEL.RTM., o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o STEROTES.RTM.; un emoliente, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

65 Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador a presión, que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes adecuados para la barrera que va a permearse. Dichos agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los agentes activos se formulan en pomadas, salvas, geles o cremas, tal como se conoce de manera general en la técnica.

Si es adecuado, los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases para supositorios convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los agentes activos se preparan con vehículos que protegerán al compuesto contra su rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles degradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para preparar dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células particulares con, por ejemplo, anticuerpos monoclonales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.522.811

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. "Forma de dosificación unitaria" usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de agente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención está dictada por, y depende de, las características únicas del agente activo y del efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede administrarse de forma continua mediante bomba o frecuentemente durante el día durante largos períodos de tiempo. En determinadas realizaciones, el agente puede administrarse a una velocidad de aproximadamente 0,3-100 ng/hora, preferentemente de aproximadamente 1-75 ng/hora, más preferentemente de aproximadamente 5-50 ng/hora, e incluso más preferentemente de aproximadamente 10-30 ng/hora. El agente puede administrarse a una velocidad de aproximadamente 0,1-100 pg/h, preferentemente de aproximadamente 1-75 microgramos/h, más preferentemente, de aproximadamente 5-50 microgramos/hora, e incluso más preferentemente de aproximadamente 10-30 microgramos/hora. También se apreciará que la dosis efectiva de anticuerpo, proteína o polipéptido utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento en particular. Los cambios en la dosis pueden resultar y ser evidentes a partir de la monitorización del nivel de insulina y/o monitorización del control de la glucemia en una muestra biológica, preferentemente sangre o suero.

En una realización de la invención, el agente puede administrarse mediante administración subcutánea, automática de medicamentos mediante una bomba osmótica para infundir una dosis deseada del agente durante un tiempo deseado. Las bombas de insulina están ampliamente disponibles y las utilizan los diabéticos para administrar la insulina de forma automática durante largos períodos de tiempo. Dichas bombas de insulina pueden adaptarse para administrar el agente. La velocidad de administración del agente para controlar la intolerancia a la glucosa, los tipos de diabetes 1 o 2, pueden ajustarse fácilmente a través de un amplio rango para adaptarse a los requisitos cambiantes de insulina de un individuo (por ejemplo, velocidades basales y dosis en bolo). Las nuevas bombas permiten una forma de dosificación periódica, es decir, el líquido se administra a dosis discretas periódicas de un pequeño volumen fijo en lugar de en una forma de flujo continuo. La velocidad global de administración de líquido para el dispositivo se controla y ajusta mediante el control y el ajuste del período de dosificación. La bomba se puede acoplar con un dispositivo de monitorización continua de la glucosa en sangre y una unidad remota, tal como un sistema descrito en la patente de Estados Unidos N.º 6.560.471, titulada "Dispositivo de control de analitos y procedimientos de uso". En tal disposición, la unidad remota manual que controla el dispositivo de monitorización continua de la glucosa en sangre podría comunicarse de manera inalámbrica y controlar tanto la unidad de monitorización de la glucosa en sangre como el dispositivo de administración de fluido que administra los agentes terapéuticos de la presente invención.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, aunque no de forma limitativa, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden además contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o

dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

Ejemplos

5 Ejemplo 1.

Procedimientos

10 *Anticuerpos e inmunohistoquímica*

La fijación y el procesamiento de tejidos para la inmunohistoquímica se realizó como se ha descrito (26). Anticuerpos primarios de conejo frente a Foxo1 y Glucoquinasa (Santa Cruz), Pdx1 (obsequio de C. Wright), glucagón (Sigma, Phoenix Peptide), GFP (Invitrogen), CromograninaA, Glut2 (todos de Chemicon), PC2 (US Biologicals); anticuerpos primarios de cobaya frente a la insulina (Dako), péptido pancreático (Linco), GFP (Rockland), anticuerpo primario de ratón contra la sinaptofisina (Millipore) y anticuerpos primarios de cabra contra TLE5/Aes, Neurog3 (Santa Cruz) y Pdx1 (de C. Wright). Los inventores usaron anticuerpos secundarios de burro conjugados con FITC, Cy3 y Alexa (Jackson Immunoresearch Laboratories y Molecular Probes Inc), o tinción con peroxidasa como se ha descrito (26). Los inventores tiñeron los núcleos con DAPI. La adquisición y análisis de imágenes se realizó como se ha descrito (26).

20 *Animales*

Se han descrito Pdx1-Cre (9), Neurog3-Cre (3), Rosa26-eGfp, y Neurog3-Gfp (7). Estos animales se entrecruzaron con ratones macho (33) *Foxo1^{fllox/+}* para generar *Neurog3-cre:Foxo1^{lox/lox}* (NKO) and *Pdx1-cre:Foxo1^{lox/lox}* (PKO). Para generar ratones con inserción de *Ins2-Gfp*, se modificó el clon BAC RP22-342 de BAC (CHORI, Oakland, CA) mediante recombinación para sustituir la secuencia de codificación de *Ins2* por Gfp. Los inventores transfectaron clones recombinantes en células ES y seleccionaron los recombinantes homólogos mediante transferencia de Southern. Los inventores generaron quimeras de la línea germinal como se ha descrito anteriormente (34).

30 Estudios fisiológicos. La diabetes se indujo mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (250 mg/kg) en ratones de 10-12 meses de edad. Los ratones de control se trataron con inyecciones diarias de NPH-insulina (Eli Lilly) 2-4U. Las pruebas de tolerancia a la glucosa se realizaron mediante sonda oral en ratones macho de 3-4 meses de edad mantenidos en ayunas durante la noche, (usando una aguja con una punta alargada que permite la administración directa de la glucosa al estómago) o inyección intraperitoneal de solución de glucosa (2 mg/g de peso corporal).

35 *Bioensayo* de insulina. Los extractos de ácido-etanol se prepararon a partir de intestino, hígado y páncreas de neonato (P3) (35). El extracto de tejido o la insulina humana recombinante (Humulin R, Eli Lilly) (10 U/ml en ácido-etanol) se mezclaron con un anticuerpo neutralizante de insulina (Thermo Scientific) o IgG1 de ratón de isotipo equivalente (Ebiosciences) para inyecciones subcutáneas en un volumen de 50 microlitros. La glucosa se midió inmediatamente antes y 5 minutos después de las inyecciones.

40 Secreción de *insulina*. El intestino adulto se tiñó en un medio que contenía ditizona 0,12 mM (DTZ) (10) y se seleccionaron fragmentos DTZ + de 5 pulgadas de longitud de ratones NKO o ratones de control equivalentes anatómicamente. Los intestinos se abrieron y se incubaron en DMEM sin glucosa suplementado con FBS al 10 % y glucosa 20 mM durante 30 minutos. Al final de la incubación, el contenido de insulina y péptido C 2 se midió en el medio mediante ELISA (Millipore). Los islotes pancreáticos purificados con colagenasa de ratones TS de 14 semanas de edad sirvieron como controles (5).

50 *Aislamiento de células epiteliales intestinales*

Los intestinos se diseccionaron, se lavaron con PBS helado (Mg^{2+}/Ca^{2+}) y se cortaron en trozos de 5 a 10 mm de largo. Los fragmentos intestinales se incubaron en EDTA 20 mM a 37 grados, seguido de una resuspensión enérgica en PBS frío con una pipeta de 10 ml. Luego, se recolectaron las células epiteliales liberadas para los ensayos de secreción y de ARN.

El aislamiento de células individuales del epitelio intestinal para el análisis FACS se llevó a cabo como se ha descrito, excepto que se incluyeron fracciones de vellosidades en las muestras (36).

60 **Protocolo de cultivo de duodeno (perro) de Golaz et al., Célula *in vitro*. Dev. Biol. 2007**

Medio 1:

65 FCM: OptiMEM GlutaMax
Anti-anti
mEGF (20 ng/ml) (Sigma)

insulina de páncreas bovino (10 ug/ml) (Sigma)
 hidrocortisona 21 sal sódica de hemisuccinato sal (150 nM) (Sigma)
 Suplemento de N2 (0,5X) (R&D system)
 B27 (0,5X) (R&D system)
 5 FCS al 10 % (Hyclone; Thermo Scientific)
 Primocina (InVivoGen)

Medio 2 (protegido de la luz) =

10 Medio 1 más
 + m-Wnt3a (50ng/ml) (R&D system)
 + Chir99021 3uM (Stemgent)
 + LDN-193189 25uM (Stemgent)

15 Medio 3

+ m-Wnt3a (100 ng/ml) (R&D system)
 + Chir99021 6uM (Stemgent)
 + LDN-193189 25uM (Stemgent)
 20 + FGF4 50 ng/ml
 + 2 % FCS

Medio 3b

25 + m-Wnt3a (100 ng/ml) (R&D system)
 + Chir99021 6uM (Stemgent)
 + LDN-193189 25uM (Stemgent)
 + FGF4 50 ng/ml
 + 2 % FCS

30

Medio 4

= Medio 3b+ FCS al 0 %

Procedimiento para aislar criptas de intestino y colon

35

1. Extraer del ratón 6 pulgadas de íleon distal y 4 pulgadas de colon e introducir en DPBS helado/FBS al 10 %.

2. Abrir los segmentos, lavar cinco veces con medio de cultivo fortificado con hielo (FCM)

40

3. Extender cada pieza de duodeno en una placa de Petri estéril y raspar suavemente la superficie luminal con una hoja de bisturí estéril para eliminar el moco y la mayoría de las vellosidades, (descartar raspado)

4. Introducir la serosa restante en un tubo de 50 ml (FCM)

45

5. Lavar el sedimento con sedimentación y aspirar el sobrenadante.

6. Realizar quelación en PBS en EDTA 2 mM durante 30 minutos

50

7. Después de la incubación con EDTA, permitir que las piezas pequeñas precipiten y eliminar el sobrenadante.

8. Añadir 10 ml de PBSO FBS al 10 % y pipetear arriba y abajo unas cuantas veces (3-5), a continuación, recoger el sobrenadante pasándolo a través de un filtro de 70 µM, repetir esto 3 veces más usando nuevos filtros (estas son las diferentes fracciones de elución de la cripta)

55

9. Centrifugar las fracciones de la cripta a 800 rpm durante 5 minutos para formar un sedimento.

10. Los sedimentos se resuspenden con 10 ml de FCM frío y el tubo se centrifuga a una velocidad menor (600 rpm, 2 minutos) para eliminar las células individuales (en su mayoría linfocitos).

60

11. Usando un microscopio, comprobar el tamaño de las criptas después de pasar por el filtro de cada fracción, estimar el número de criptas por fracción y centrifugarlas a 600 rpm durante 5 minutos a 4 °C.

65

12. Centrifugar la cantidad deseada de criptas nuevamente a 600 rpm durante 5 minutos para eliminar la mayor parte del sobrenadante y colocar el sedimento en hielo. (Para 1 pocillo en una placa de 24 pocillos se necesita diluir 100-1000 criptas en 50 µl de gota de Matrigel)

13. Para 20 pocillos, añadir 1 ml de Matrigel descongelado a un sedimento con 1000 - 10.000 criptas y pipetear suavemente hacia arriba y hacia abajo con una punta fría de 1.000 µl (Matrigel debe permanecer en hielo como los sedimentos de las criptas y las puntas).

5 14. Cultivar a 37 °C durante 3 días en Medio 1 (DESCRITO ANTERIOR), a continuación, cambiar a Medio 2 y se mantiene en Medio 2 con cambios de medio cada dos días durante 3 días.

15. Días 4-6, las células se mantuvieron en Media 3 o Media 4. El medio 4 se utiliza para el estudio del ARNip.

10 *Procedimientos de ARN.* Se utilizaron técnicas estándar para el aislamiento de ARNm y PCR cuantitativa. La RT-PCR se llevó a cabo durante 35 ciclos. Se han descrito las secuencias de los cebadores para Pc2, Gck, Kir6.1, Sur1 Neurogenina 3, Pdx1, MafA, Nkx6.1, NeuroD1, Nkx2.2, Arx, Pax4, Tubulina 2 (37), Insulina 1, Insulina 2 (38), Glp132, Math1 y Hes138Hes1 (38).

15 *Análisis estadístico.* Los datos se analizaron utilizando la prueba t de Student. Un asterisco: $P < 0,05$; dos asteriscos: $P < 0,01$. Los inventores presentaron los datos como la media \pm SEM.

Ejemplo 2

20 **La ablación de Foxo1 dio como resultado un aumento diez veces mayor en el número de células Neurog3⁺ en el intestino**

El factor de transcripción Foxo1 regula múltiples aspectos de la función de las células beta pancreáticas (4t) y se expresa ampliamente en los progenitores endocrinos pancreáticos de Neurog3⁺ (5). En el epitelio pancreático fetal humano aislado, la disminución FOXO1 aumenta el número de células NEUROG3⁺ (6t). Similar al páncreas, Foxo1 también se expresa en la mayoría de los progenitores enteroendocrinos Neurog3⁺ (EEP), tal como se identificó mediante inmunohistoquímica doble (7t) (figuras 1a y 5). La expresión de Foxo1 (un ortólogo estructural y funcional de FOXO1, 3 y/o 4 humano) en ratón adulto se localiza en un subconjunto de células que, según la morfología y la localización, incluyen células secretoras, endocrinas y células madre a lo largo del intestino. Las células enteroendocrinas son una subpoblación de células secretoras. Hay 3 tipos de células secretoras: calciformes, de Paneth y células enteroendocrinas. Las células calciformes y de Paneth normalmente no producen hormonas. Las progenitoras enteroendocrinas Neurogenina 3⁺ productoras de FOXO1 (N3 Prog) en condiciones normales se diferencian en células hija positivas PARA hormonas entéricas que no producen N3 ni insulina (son Ins⁻).

35 Para investigar el papel de Foxo1 en LAS células enteroendocrinas, se generaron ATONES con una delección somática de Foxo1 en los progenitores enteroendocrinos Neurog3⁺ (21) (NKO o defectivos en Foxo 1 dirigida por Neurog3-). Para evaluar la recombinación mediada por Cre en células Neurog3⁺, se cruzaron ratones transgénicos NKO y Neurog3-Gfp. La inmunohistoquímica mostró que Foxo1 ya no era detectable en las células marcadas con Gfp, lo que indica que la delección se había producido de manera eficiente (FIG. 1b).

40 La ablación de Foxo1 dio como resultado un aumento diez veces mayor en el número de células Neurog3⁺ (FIG. 6), demostrado por:

(i) inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Neurog3

45 (ii) mediciones de ARNm de Neurog3 en células Gfp⁺ clasificadas por flujo (FIG. 6).

(iii) análisis de citometría de flujo de células Gfp⁺ derivadas de ratones doble transgénicos NKO:Neurog3-Gfp (//suplementario en la figura 2 en papel en marzo de 2011) estudios de rastreo de linaje con transgénicos Neurog3-Gfp (7).

50 En animales normales, en las células Gut N3 Prog producen únicamente células enteroendocrinas que no producen insulina. Se descubrió que la eliminación de Foxo1 en los intestinos de los ratones daba lugar a la expansión de las células N3 intestinales en aproximadamente 10 veces. Es difícil estimar el % de células de la agrupación Gut N3 Prog Foxo1 (-/-) que se convierten en células productoras de insulina porque parecen ser específicas de la región, es decir, las células Ins⁺ se encuentran más frecuentemente en el íleon distal y el colon de los ratones NKO, pero los experimentos posteriores a STZ mostraron que las células Gut Ins⁺ se habían regenerado y se encontraron en todo el intestino. Esto sugiere que las células Gut N3 Prog Foxo1(-/-) en otras partes del intestino también tienen el potencial de producir células Ins⁺ en respuesta a señales adicionales, tales como señales inflamatorias.

60 El aumento de las células Neurog3⁺ se asoció con un aumento similar de las células que expresan cromagranina A, un marcador de diferenciación de células enteroendocrinas que se expresa después de la activación de Neurog3, lo que indica que la ablación de Foxo1 expande los progenitores Neurog3⁺ intestinales y sus células hija (8) (FIG. 6).

Ejemplo 3

65 **La ablación de Foxo1 indujo a las células enteroendocrinas intestinales a diferenciarse en células Gut Ins⁺ que producen insulina y presentan un perfil de expresión de células pancreáticas**

Se compararon ratones normales (*Foxo1^{fl/fl}*) con ratones defectivos para *Foxo1* con delección somática del gen *Foxo1* (denominado NKO, o defectivos en *Foxo1* dirigido por neurogenina 3). Los estudios histológicos mostraron, entre otras cosas, que *Foxo1* se localizaba tanto en las células progenitoras N3 del intestino (Figura 1b) como en su progenie N3⁻, negativa para insulina (células Gut Ins⁻) en ratones normales.

Por el contrario, cuando se estudiaron los intestinos de ratones NKO (1) recién nacidos mediante inmunohistoquímica con anticuerpos contra hormonas entéricas y de los islotes pancreáticos, se descubrió que, al contrario que los ratones normales, los ratones NKO neonatos tenían numerosas células Gut Ins⁺ positivas para insulina (inmunorreactivas a la insulina) (Figura 1c).

También se observaron células inmunorreactivas con hormonas específicas del páncreas glucagón (Gcg⁺) o polipéptido pancreático (Pp⁺) (FIG. 7), aunque a frecuencias más bajas en ratones recién nacidos y adultos. Había células Ins⁺ presentes en el intestino, incluyendo el colon (FIG. 8). Además, El análisis por RT-PCR confirmó la presencia de transcritos *Ins1* e *Ins2* en ARN extraído de células en el intestino de ratones NKO, pero no en los intestinos control (FIG. 9).

Por tanto, la ablación de *Foxo1* en animales NKO activó un amplio programa de expresión endocrina pancreática en algunas células enteroendocrinas intestinales que cambiaron su fenotipo de no productoras de insulina (Gut Ins⁻) a productoras de insulina (células Gut Ins⁺).

Ejemplo 4

Las células Gut Ins⁺ se originan a partir de células progenitoras negativas para insulina

Para investigar el origen de estas células Ins⁺ y proporcionar evidencia independiente de su identidad, se generaron tres modelos genéticos adicionales en ratones. Los datos en ratones NKO indican que la ablación de *Foxo1* en progenitores endocrinos intestinales Neurogenina 3 es suficiente para activar la diferenciación endocrina similar al páncreas, pero no demuestran que esta es una propiedad específica de las células Neurogenina 3⁺, a diferencia de una característica general de las células progenitoras intestinales no comprometidas, tales como las células madre, las progenitoras amplificadoras del tránsito o las progenitoras secretoras 21. En primer lugar, se eliminó *Foxo1* en las células precursoras epiteliales duodenales, que son las células progenitoras enteroendocrinas de las células Neurog3⁺, utilizando *Pdx-cre* (9) (defectivos en *Foxo1* dirigida por *Pdx1* o *PKO*). Similar a los ratones NKO, Los ratones *PKO* mostraron células Ins⁺ en el duodeno y un aumento marcado de células Neurog3-Gfp⁺ (Figura 10). Los ratones *PKO* se cruzaron con ratones indicadores *Neurog3-Gfp*, lo que confirmó la ablación de *Foxo1*. Estos experimentos confirmaron que las células Ins⁺ en el intestino surgieron de un grupo expandido de progenitores Neurogenina 3⁺ (N3 Prog). Las células Gut Ins⁺ no se vieron afectadas por la función de *Foxo1* en las células madre intestinales o progenitoras amplificadoras del tránsito. La eliminación generalizada de *Foxo1* en los precursores intestinales (la célula de la que surgirán todas las células epiteliales intestinales, incluyendo células secretoras) fenocopiaron la eliminación *Foxo1* en las células progenitoras enteroendocrinas (la forma celular de la que surgirán las células enteroendocrinas). Los precursores intestinales dan lugar a todos los tipos de células intestinales, incluyendo células madre y progenitoras amplificadoras del tránsito que a su vez dan lugar a células progenitoras N3. Este experimento destaca que la eliminación de *Foxo1* en las células madre del intestino y Gut N3 Prog y sus descendientes también da lugar a la formación de fenotipos de células enteroendocrinas Ins⁺. También es posible que algunas células enteroendocrinas intestinales Ins⁻ puedan adquirir un fenotipo Ins⁺ reduciendo las proteínas FOXO.

Se generó un ratón con un alelo *Insulina2-Gfp* insertado mediante direccionamiento génico para proporcionar una lectura sensible y específica de la transcripción de *Ins2* endógena. Cuando el alelo *Ins2-Gfp* se introdujo en ratones NKO (NKO-*Insulina2-Gfp*), se detectaron fácilmente células Ins2-Gfp⁺ en el intestino de los ratones mutantes, mientras que no había tales células en sus hermanos de camada TS. Por el contrario, La expresión de *Ins2-Gfp* se detectó en los islotes pancreáticos de ambos genotipos (Figura 1d). La doble inmunohistoquímica con anticuerpos frente a insulina y *Gfp* confirmó la identificación de las células Gfp⁺ como células Ins⁺ (Figura 1e).

Finalmente, Se utilizaron experimentos de rastreo del linaje genético para investigar si las células Ins⁺ surgen de mecanismos celulares autónomos o no autónomos. Para ello, se generaron ratones NKO portadores de un alelo indicador *Rosa26eGfp* para marcar las células activas Neurog3-Cre y sus células hija en los intestinos adultos (NKO-*Rosa26eGfp*). En el páncreas, todas las células beta fueron Gfp⁺ tanto en los ratones NKO como los hermanos de camada de control (Figura 1f). En los ratones NKO, solo las células Gut Ins⁺ eran Gfp⁺ CONFIRM, lo que indica que la expresión de insulina se produjo en células que se habían sometido a recombinación mediada por Cre (Figura 1f).

Ejemplo 6

Las células Gut Ins⁺ se diferencian terminalmente y tienen un linaje compartido con las células beta pancreáticas

Para investigar si las células Gut Ins⁺ se diferencian terminalmente, se realizó inmunohistoquímica con marcadores apropiados. Se detectó expresión de la prohormona convertasa-2 (Pc2), glucoquinasa (Gck), receptor de sulfonilurea (Sur1) y transportador de glucosa 2 (Glut2) (Figura 2a-d). Estos marcadores se expresan en células beta pancreáticas diferenciadas terminalmente. En particular, la Pc2 es específica de las células beta en ratones normales. Las células Gut Ins⁺ también se decoraron con un anticuerpo para el marcador panendocrino sinaptofisina (Figura 2e), lo que indica que son células productoras de hormonas. En resumen, las células Gut Ins⁺ comparten características clave con las células beta pancreáticas. Los hallazgos inmunohistoquímicos se asociaron con mayores niveles de ARNm que codifica *Pc2*, *Gck*, *Kir6.2* y *Sur1* en aislados de células epiteliales del intestino (FIG. 11).

Usando el quelante de Zn ditizona (DTZ), un marcador de islotes pancreáticos vitales (10), se localizaron muestras de intestino enriquecidas en células Ins⁺ para análisis adicionales. El ARNm codificador de reguladores de la transcripción de la diferenciación de células beta *Pdx1*, *MafA*, *Nkx6.1*, *Nkx2.2*, y *Pax4* se detectó en células epiteliales aisladas de intestino *NKO* enriquecido con DTZ, FIG. 12). La expresión de *Pdx1* y *Nkx6.1* se confirmó mediante inmunohistoquímica (FIG. 13). Usando matrices de PCR de baja densidad, se detectó un aumento sustancial (> 100 veces) de los transcritos que codifican el gen *Aes* relacionado con groucho (potenciador aminoterminal de la división, también conocido como *Tle5*) (11) en células epiteliales intestinales *NKO* (Figura 14). *Aes* se expresa en el páncreas en desarrollo y adulto (12) y la expresión ectópica de *Aes* se asocia con dominios neuronales *Nkx 2.2* y *Nkx 6.1* expandidos (13). Mediante inmunohistoquímica, la expresión de *Aes* se localizó en las células Gut Ins⁺. Adicionalmente, los experimentos de rastreo de linaje indicaron que las células Gfp⁺ en ratones *NKO*:*Rosa26eGfp* estaban recubiertas de anticuerpos *Aes* (FIG. 14), lo que demuestra que la ablación de *Foxo1* estimula la expresión de *Aes* de forma autónoma en las células. Estos hallazgos proporcionan evidencia adicional de un linaje compartido entre las células Gut Ins⁺ y las células beta pancreáticas.

25 Ejemplo 7

Los intestinos *NKO* secretan insulina y péptido C de una manera dependiente de la dosis de glucosa

La secreción de insulina regulada es una característica crucial de las células beta pancreáticas que ha demostrado ser difícil de replicar en células productoras de insulina derivadas de células ES (14). Para determinar si las células Gut Ins⁺ son funcionalmente competentes para secretar insulina, los inventores realizaron ensayos *ex vivo* de secreción de insulina en respuesta a la glucosa y a los moduladores de los canales de K_{ATP}, utilizando tinción con DTZ para seleccionar segmentos intestinales enriquecidos en células Ins⁺ de ratones *NKO* y segmentos anatómicamente equivalentes de ratones control. Los intestinos *NKO* liberaron insulina y péptido C de una manera dependiente de la dosis de glucosa; por tanto, la incubación en glucosa 11 mM dio como resultado un aumento de dos veces y media en la secreción de insulina, mientras que la incubación en glucosa 22 mM dio como resultado un aumento > 7 veces mayor en la secreción de insulina. La sulfonilurea glibenclamida (un bloqueador de los canales de K_{ATP}) aumenta la liberación de insulina inducida por la glucosa, mientras que el diazóxido activador del canal de K_{ATP} lo anuló (Fig. 3a-b).

Ensayo de secreción de insulina y péptido C dependiente de glucosa

Se cribaron intestinos adultos en medio que contenía ditizona 0,12 mM (DTZ) (Tuttle et al. Nat Med, 2001) y se seleccionaron fragmentos DTZ⁺ de 5 pulgadas de longitud de ratones *NKO* o fragmentos anatómicamente equivalentes de ratones de control TS. Se realizaron preparaciones directas de los intestinos y se incubaron en tampón HEPES-Krebs Ringer complementado con glucosa a varias concentraciones, diazóxido 0,5 mM (Sigma) o glibenclamida 10 nM (Tocris) durante 1 hora. Al final de la incubación, se midió el contenido de insulina y de péptido C 2 en el medio mediante ELISA (Millipore). Los islotes pancreáticos purificados con colagenasa de ratones TS de 14 semanas de edad sirvieron como controles (Kitamura et al., MCB 2009). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando intestinos adultos (n = 4).

Ejemplo 8

La insulina intestinal secretada por las células Gut Ins⁺ es bioactiva

Para examinar si la insulina intestinal secretada por las células Gut Ins⁺ es bioactiva, se prepararon extractos de ácido-etanol de intestino *NKO*, también se prepararon extractos de intestino, páncreas e hígado de ratones TS y se inyectaron en ratones recién nacidos. Los extractos del intestino *NKO* recién nacido redujeron la glucosa en sangre en aproximadamente un 20 %, similar a los extractos pancreáticos de ratones de control de la misma edad o insulina humana recombinante (Figura 3c). Por el contrario, los extractos de intestinos o hígado de control no tuvieron efecto. La capacidad de los extractos de intestino *NKO* (que refleja la presencia de células Gut Ins⁺) para disminuir la glucosa en sangre se anticipó mediante la adición de un anticuerpo neutralizante de insulina, al igual que los extractos pancreáticos de ratones de control y la insulina recombinante. Por el contrario, la incubación de los extractos de intestino de *NKO* con IgG de control del mismo isotipo no tenía ningún efecto sobre su capacidad para disminuir la glucemia (FIG. 3c), lo que indica que el efecto hipoglucémico se debe a la insulina y no a otros factores en los extractos de intestino *NKO*. Estos resultados demuestran que la secreción de insulina por las células Ins⁺ de

intestino se puede regular mediante glucosa y moduladores de los canales de KATP y que la insulina derivada del intestino es bioactiva.

Ejemplo 9

5 Los ratones *NKO* tratados con estreptozotocina *in vivo* mostraron una tolerancia casi normal a la glucosa oral

10 A diferencia de las células endocrinas pancreáticas, las células enteroendocrinas intestinales surgen de los progenitores Neurog3⁺ a lo largo de la vida (21). Por lo tanto, es posible que las células Gut Ins⁺ tengan mayores capacidades de regeneración que las células beta de los islotes en un modelo de diabetes inducida por toxinas. Para ensayar esto, se administró estreptozotocina (STZ) a ratones *NKO* y de control, que produjo hiperglucemia (FIG. 4a). Los niveles de glucosa en los ratones de control se mantuvieron a aproximadamente 500 mg/dl mediante la administración diaria de insulina durante 28 días. Por el contrario, los ratones *NKO* no recibieron insulina, pero sus niveles de glucosa comenzaron a disminuir espontáneamente nueve días después de la STZ, y se estabilizaron a aproximadamente 250 mg/dl en el estado alimentado (Figura 4a).

20 Tras la retirada de la insulina, El 100 % de los ratones de control había muerto para el día 60, mientras que el 75 % de los ratones *NKO* sobrevivió hasta el final del experimento el día 92 (Figura 4b). los ratones *NKO* tratados con STZ mostraron una tolerancia a la glucosa oral casi normal (Figura 4c). Los análisis inmunohistológicos revelaron que la STZ eliminaba las células Gut Ins⁺ pancreáticas y entéricas (Figura 4d). La sensibilidad de las células Gut Ins⁺ a la ablación con STZ proporciona evidencia adicional de que son similares a las células beta pancreáticas (15).

25 En muestras obtenidas el día 28 después de la administración de STZ, las células Gut Ins⁺ estaban presentes en el intestino *NKO* con mayor frecuencia en comparación con el tratamiento pre-STZ, y expresaron marcadores de células beta maduras, Pc2 (Figura 4d) y Aes (Figura 14), lo que sugiere que sus propiedades funcionales permanecieron intactas. Usando ratones con inserción de *NKO:Ins2-Gfp* a las células de rastreo de linaje, los inventores determinaron que, después de la administración de STZ, las células Gut Ins⁺ activaron la expresión de Pc2 endógena, que es similar a las células Gut Ins⁺ observadas antes de la administración de STZ (Figura 2b). En contraste con el intestino, los estudios inmunohistoquímicos no mostraron evidencia de regeneración de células beta pancreáticas en ratones *NKO* (Figura 4d), y el contenido de insulina pancreática al final del experimento fue casi indetectable en comparación con los controles tratados con vehículo ($0,1 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{páncreas}$ post-STZ frente a $26 \pm 2,25 \text{ (g/páncreas pre-STZ)}$), por lo tanto, se descarta una contribución de la regeneración de células beta pancreáticas al fenotipo observado (16). No hubo células Ins⁺ en el intestino o el páncreas de los ratones de control en ninguna etapa (Figura 4d). Las células Gut Ins⁺ en ratones PKO se encontraron con mayor frecuencia en comparación con el tratamiento pre-STZ.

Ejemplo 10

40 **El ARNip que hibrida con Foxo1 hace que las células Insulina-Prog intestinales se diferencien en células Gut Ins⁺**

45 Para determinar si el ARNip podría reducir la expresión de una proteína Foxo, se aislaron una serie de experimentos con criptas del íleon distal y el colon de ratones de control TS y de ratones defectivos para Neurog3-Foxo1 (*NKO*), ambos de los cuales fueron sometidos a bioingeniería para transportar un indicador GFP en el locus *Ins2*. En primer lugar, se cultivaron las células *in vitro* en Medio 1. Después de tres días en cultivo, no hubo células GFP-Ins⁺ en los ratones normales ni en *NKO*-GFP. FIG. 16. Al tercer día, se cambiaron las células a medio 2, y el día 6, las micrografías con fluorescencia *in vivo* mostraron que algunas de las células Insulina-Prog en ratones *NKO* se habían diferenciado/convertido en células insulina⁺ que expresaban proteína verde fluorescente. FIG. 17. Cuando las criptas aisladas como se acaba de describir se incubaron en Medio 1 durante 1 día, Medio 2 durante 2 días y, después, Medio 4b durante 3 días, el porcentaje de células insulina⁺ aumentó a niveles aún más altos. FIG. 18. Cuando se analizaron estas criptas, se determinó que las células verdes estaban vivas y las células azules estaban muertas. FIG. 19.

55 Finalmente, se llevó a cabo un experimento para determinar si las células Ins-Prog TS normales responderían a la inactivación de Foxo1 poniéndolas en contacto con ARNip, lo que haría que se diferenciaran en células productoras de insulina. Las CRIPTAS aisladas se mantuvieron en Medio 1 durante 1 día, Medio 2 durante 2 días. Al tercer día, se cambió a las células a Medio 4b, al que se incluyó 50 nM de ARNip administrado en liposomas de transfección (Trans-IT por Mirus) // concentración final total = 50 nM en exposición a las células, sin adición de 50 nM de ARNip // que sea lo suficientemente complementario con el gen Foxo1 CONFIRM para inactivar su expresión. A continuación, las criptas se incubaron con el ARNip durante 72 horas adicionales. A la dosis actual ya es bastante tóxico // Como se muestra en la FIG. 20, la inhibición de ARNip de la expresión de Foxo1 (transcripción de genes) dio lugar a la aparición de células Insulina+. Esto muestra que el contacto de las células Gut Ins- Prog TS normales con el ARNip contra Foxo1 hace que las células se conviertan al fenotipo enteroendocrino insulina⁺.

65 Las células se aislaron y se cultivaron de forma similar a los experimentos sin ARNip durante 3 días en (Medios 1 y

2). Se sembraron 100 criptas por pocillo en placas de 96 pocillos en Matrigel de dilución 1:5 (BDbiosciences.).

El ARNip se diluyó para una concentración final de 50 nM y se transfectó en medios 4b (brevemente, Medios 2 + FCS al 0 %, 100 ng/ml de mWnt3a, 50 ng/ml de FGF4) utilizando el protocolo según la fabricación (Trans-It, Mirus) durante 72 horas.

Los experimentos se realizaron con Thermo Scientific (Dharmacon Accell SMARTpool, FOXO1 de ratón, E-041127-00-0010, 3'-UTR) y controles negativos y de transfección (kit de ARNip Dharmacon Accell Mouse Control - Rojo, K-005000-R1-02, cuatro controles).

Cada condición se realizó por cuadruplicado.

Los ARNip se analizaron para determinar los cambios fenotípicos (número de células verdes vivas) por pocillo en una placa de 96 pocillos, y la disminución de Foxo1 se confirmó mediante qPCR.

Las células tratadas con ARNip de Foxo1 dieron lugar a 2 % de células verdes por pocillo.

Accell SMARTpool siRNA A-041127-13, Secuencia diana: CUAUUUUUGUACAUGAUUG FOXO1 <u>Peso mol.</u> 13.501,1 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 372,198 (l/mol · cm)	SEQ ID NO. 7
Accell SMARTpool siRNA A-041127-14, FOXO1 Secuencia diana: CGAUGAUACCUGAUAAUG <u>Peso mol.</u> 13.521,4 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 365,968 (l/mol · cm)	SEQ ID NO. 8
Accell SMARTpool siRNA A-041127-15, FOXO1 Secuencia diana: UCGUAAACCAUUGUAAUUA <u>Peso mol.</u> 13.489,3 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 376.470 (l/mol·cm)	SEQ ID NO. 9
Accell SMARTpool siRNA A-041127-16, FOXO1 Secuencia diana: CCAGGAUAAUUGGUUUUAC <u>Peso mol.</u> 13.519,3 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 361.874 (l/mol·cm)	SEQ ID NO. 10
Artículo del catálogo K-005000-R1 -02 Kit de ARNip de ratón de control Accell - Rojo La	
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-041127-05, FOXO1 Secuencia diana: GGUGUCAGGCUAAGAGUUA <u>Peso mol.</u> 13.429,9 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 371.219 (l/mol·cm)	SEQ ID NO. 11
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-041127-06, FOXO1 <u>Peso mol.</u> 13.414,8 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 377.004 (l/mol·cm) Secuencia diana: GUAAUGAUGGGCCCUAAUU	SEQ ID NO. 12
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-041127-07, FOXO1 <u>Peso mol.</u> 13.459,8 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 357.691 (l/mol·cm) Secuencia diana: GCAAACGGCUUCGGUCAAC	SEQ ID NO. 13
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-041127-08, FOXO1 <u>Peso mol.</u> 13.384,9 (g/mol) <u>Coef. de ext.</u> 384.302 (l/mol·cm) Secuencia diana: GGACAACAACAGUAAUUU	SEQ ID NO. 14

Sumario

En resumen, ablación somática de un solo factor de transcripción, *Foxo1*, en los progenitores enteroendocrinos intestinales resulta en la generación de células Gut Ins⁺ con linaje y características funcionales de la producción de

insulina, células sensibles a la glucosa (Figura 15) comparables a las células beta pancreáticas. A diferencia de las células productoras de polipéptido inhibidor gástrico intestinal (GIP), diseñado para expresar el transgén de proinsulina (17), Las células Gut Ins⁺ parecen seguir la misma vía de desarrollo que las células beta endógenas, como lo indica la activación del alelo de inserción *Ins2-Gfp*. Esta característica podría explicar la inversión más rápida de la diabetes STZ en ratones *NKO* que en ratones transplantados con células productoras de insulina derivadas de células madre embrionarias (14). La capacidad de las células Gut Ins⁺ para secretar insulina de una manera dependiente de la glucosa e inhibible con diazóxido disipa los temores de una secreción de insulina no regulada que haya plagado los enfoques de reemplazo celular de la diabetes de tipo 1. En un contexto más amplio, la plasticidad de las células progenitoras enteroendocrinas del intestino podría desempeñar un papel importante en las funciones metabólicas proteicas del intestino (18), incluida la sorprendente inversión de la diabetes después de la cirugía bariátrica (19).

La invención se ilustra en el presente documento mediante los experimentos descritos anteriormente y por los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes. Los expertos en la materia entenderán que la presente invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe considerarse limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. En su lugar, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación transmita completamente la invención a los expertos en la técnica. Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención vendrán a la mente de un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención que tiene el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior. Aunque se emplean términos específicos, se utilizan como en la técnica a menos que se indique lo contrario.

Referencias

1. G. Gradwohl, A. Dierich, M. LeMeur, F. Guillemot, neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1607 (2000).
2. C. S. Lee, N. Perreault, J. E. Brestelli, K. H. Kaestner, Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* 16, 1488 (Jun 15, 2002).
3. S. E. Schonhoff, M. Giel-Moloney, A. B. Leiter, Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Dev Biol* 270, 443 (Jun 15, 2004).
4. C. Talchai, H. V. Lin, T. Kitamura, D. Accili, Genetic and biochemical pathways of beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4, 38 (Nov, 2009).
5. T. Kitamura et al., Regulation of pancreatic juxtaductal endocrine cell formation by FoxO1. *Mol Cell Biol* 29, 4417 (Aug, 2009).
6. M. Al-Masri et al., Effect of forkhead box O1 (FOXO1) on beta cell development in the human fetal pancreas. *Diabetologia* 53, 699 (Apr, 2010).
7. G. Gu, J. Dubauskaite, D. A. Melton, Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129, 2447 (2002).
8. S. E. Schonhoff, M. Giel-Moloney, A. B. Leiter, Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145, 2639 (Jun, 2004).
9. S. R. Hingorani et al., Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437 (Dec, 2003).
10. R. L. Tuttle et al., Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med* 7, 1133 (Oct, 2001).
11. T. Nakamura, K. Tsuchiya, M. Watanabe, Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *J Gastroenterol* 42, 705 (Sep, 2007).
12. B. G. Hoffman, B. Zavaglia, M. Beach, C. D. Helgason, Expression of Groucho/TLE proteins during pancreas development. *BMC Dev Biol* 8, 81 (2008).
13. J. Muhr, E. Andersson, M. Persson, T. M. Jessell, J. Ericson, Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 104, 861 (Mar 23, 2001).
14. E. Kroon et al., Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443 (Apr, 2008).
15. K. Nielsen et al., Beta-cell maturation leads to in vitro sensitivity to cytotoxins. *Diabetes* 48, 2324 (Dec, 1999).

16. F. Thorel et al., Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464, 1149 (Apr 22, 2010).
- 5 17. A. T. Cheung et al., Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 290, 1959 (Dec 8, 2000).
18. D. J. Drucker, The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3, 153 (Mar, 2006).
- 10 19. J. P. Thaler, D. E. Cummings, Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology* 150, 2518 (Jun, 2009).
20. Supported by grants from the NIH (DK57539 and DK64819), the Columbia University Diabetes & Endocrinology Research Center (DK63608).
- 15 21. Bonal, C. & Herrera, P.L., Genes controlling pancreas ontogeny. *Int J Dev Biol* 52 (7),823-835 (2008).
22. Schwitzgebel, V.M. et al., Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127 (16), 3533-3542 (2000).
- 20 23. Jensen, J. et al., Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49 (2), 163-176. (2000).
- 25 24. Xu, X. *et al.*, Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132(2), 197-207 (2008).
25. Hunt, R.K. y Jacobson, M., Development and stability of positional information in *Xenopus* retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69 (4), 780-783 (1972).
- 30 26. T. Kitamura et al., The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 110,1839 (Dec, 2002).
27. Okamoto, H. et al., Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *J Clin Invest* 116 (3), 775-782 (2006).
- 35 28. Kitamura, T. et al., Regulation of pancreatic juxtaductal endocrine cell formation by FoxO1. *Mol Cell Biol* 29 (16), 4417-4430 (2009).
29. Kitamura, Y.I. et al., FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2 (3), 153-163 (2005).
- 40 30. Kawamori, D. et al., The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J Biol Chem* 281(2), 1091-1098 (2006).
- 45 31. Accili, D. & Arden, K.C., FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117(4), 421-426 (2004).
32. Paik, J. H. *et al.*, FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128(2), 309-323 (2007).
- 50 33. J. H. Paik et al., FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* 128, 309 (Jan 26, 2007).
34. H. Okamoto et al., Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 114, 214 (Jul, 2004).
- 55 35. B. M. Sherman, P. Gorden, J. Roth, P. Freychet, Circulating insulin: the proinsulin-like properties of "big" insulin in patients without islet cell tumors. *J Clin Invest* 50, 849 (Apr, 1971).
36. L. G. van der Flier, H. Clevers, Células madre, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71, 241 (2009).
- 60 37. N. Gao et al., Foxa2 controls vesicle docking and insulin secretion in mature Beta cells. *Cell Metab* 6, 267 (Oct, 2007).
- 65 38. A. Suzuki, H. Nakauchi, H. Taniguchi, Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into

insulin-producing cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 5034 (Apr 29, 2003).

39. Al-Masri M, Krishnamurthy M, Li J, Fellows GF, Dong HH, Goodyer CG, Wang R. Effect of forkhead box O1 (FOXO1) on beta cell development in the human fetal pancreas. Diabetologia. 2010 Apr;53(4):699-711.

REIVINDICACIONES

1. Un agente que reduce la expresión o la actividad biológica de una o más proteínas Foxo o fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas, seleccionados del grupo que consiste en un ARNhc aislado, ARNip, ARN antisentido, ADN antisentido, ADN/ARN antisentido quimérico, microARN y ribozimas que son suficientemente complementarios a un gen o un ARNm que codifica una o más de las proteínas Foxo, y anticuerpos o fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas que se unen específicamente a una o más proteínas Foxo, reduciendo así la actividad biológica de la una o más proteínas, para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un mamífero asociados a una función pancreática alterada, seleccionada del grupo formado por diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia; sensibilidad reducida a la insulina, aumento de la glucosa en ayunas, aumento de la glucosa posprandial y obesidad, en donde el agente se administra en el intestino y causa la generación de células enteroendocrinas en el intestino que producen y secretan insulina.
2. Una formulación farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un mamífero asociados a una función pancreática alterada seleccionada del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia; sensibilidad reducida a la insulina, aumento de la glucosa en ayunas, aumento de la glucosa postprandial y obesidad, que comprende una cantidad eficaz de un agente que reduce la expresión o la actividad biológica de una o más proteínas Foxo o fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas seleccionados del grupo que consiste en un ARNhc aislado, ARNip, ARN antisentido, ADN antisentido, ADN/ARN antisentido quimérico, microARN y ribozimas que son suficientemente complementarios a un gen o a un ARNm que codifica una o más de las proteínas Foxo, y anticuerpos o fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas que se unen específicamente a una o más proteínas Foxo, reduciendo así la actividad biológica de la una o más proteínas, en donde el agente se administra al intestino y causa la generación de células enteroendocrinas en el intestino que producen y secretan insulina.
3. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para producir células enteroendocrinas productoras de insulina a partir de una población de células progenitoras enteroendocrinas no productoras de insulina obtenidas de un segmento del intestino o del colon de un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento
 - a. poner en contacto a la población con un agente que reduce la expresión o la actividad biológica de una o más proteínas FOXO, o fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas en una cantidad y en condiciones que permitan que una parte significativa de la población produzca insulina, y en donde se selecciona el agente del grupo que consiste en un ARNhc aislado, ARNip, ARN antisentido, ADN antisentido, ADN/ARN antisentido quimérico, microARN, y ribozimas que son suficientemente complementarios a un gen o a un ARNm que codifica una o más de las proteínas Foxo, y anticuerpos o fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas que se unen específicamente a una o más proteínas Foxo reduciendo así la actividad biológica de la una o más proteínas, y
 - b. recolectar las células enteroendocrinas productoras de insulina.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que las células enteroendocrinas productoras de insulina producen además, en respuesta al agente, una o más hormonas pancreáticas seleccionadas del grupo que consiste en glucagón, polipéptido pancreático, glucoquinasa y glut2 o una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en prohormona-convertasa Pc2, Pdx1, MafA, Nkx6.1, Nkx2.2 y Pax4..
5. Células enteroendocrinas productoras de insulina obtenibles por el procedimiento de la reivindicación 3.
6. Las células enteroendocrinas productoras de insulina de la reivindicación 5 para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un mamífero, en donde la enfermedad o el trastorno se seleccionan del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia; sensibilidad reducida a la insulina, aumento de la glucosa en ayunas, aumento de la glucosa postprandial y obesidad.
7. Una formulación farmacéutica que comprende las células enteroendocrinas productoras de insulina de la reivindicación 5.
8. Un procedimiento para identificar un agente que sea eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o una afección asociadas a una función pancreática alterada, que comprende:
 - (a) proporcionar un animal que tiene la enfermedad o la afección;
 - (b) determinar la cantidad de expresión de Foxo 1, Foxo3 o Foxo4 en una muestra biológica de pretratamiento tomada del animal;
 - (c) administrar el agente al animal; y
 - (d) determinar la cantidad de expresión de Foxo 1, Foxo3 o Foxo4 en una muestra biológica posttratamiento tomada del animal; en donde si la cantidad en la muestra biológica posterior al tratamiento es significativamente menor que la cantidad en la muestra de pretratamiento, el agente se identifica como un agente que es eficaz

para tratar o prevenir la enfermedad o la afección;
en donde la muestra biológica comprende células enteroendocrinas del tracto gastrointestinal; y
en donde la enfermedad o el trastorno se seleccionan del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo
2, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia; sensibilidad reducida a la insulina, aumento de la
5 glucosa en ayunas, aumento de la glucosa postprandial y obesidad.

FIG. 1

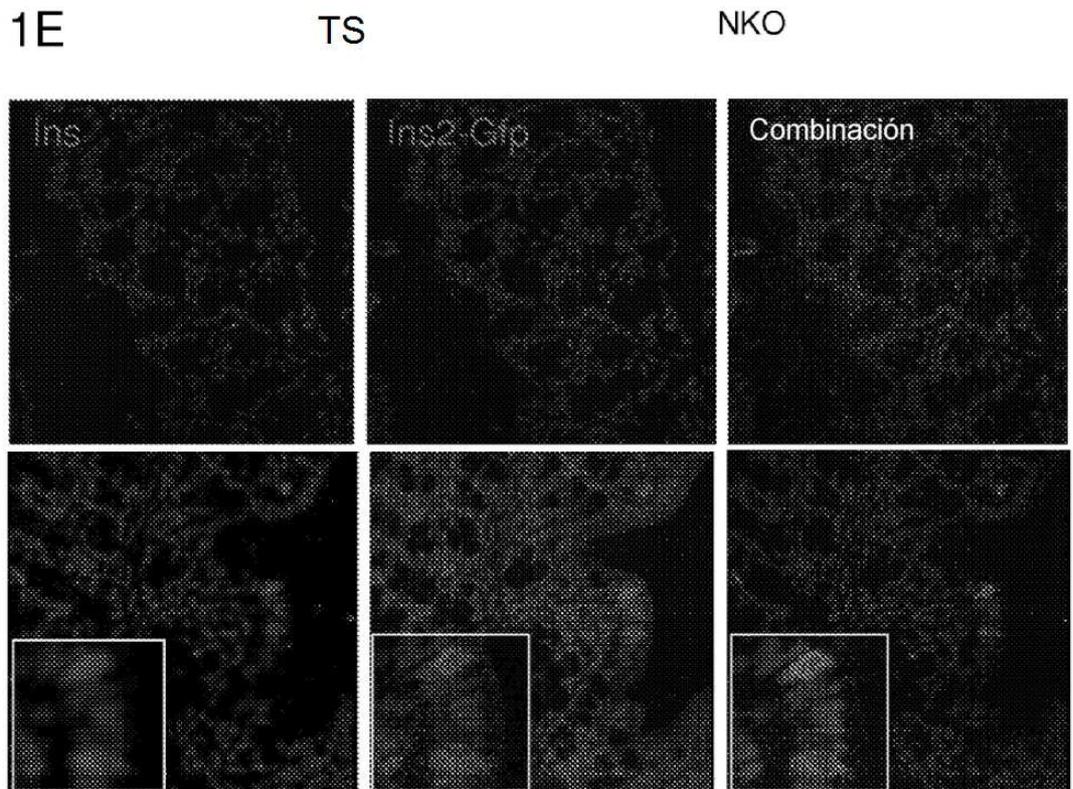
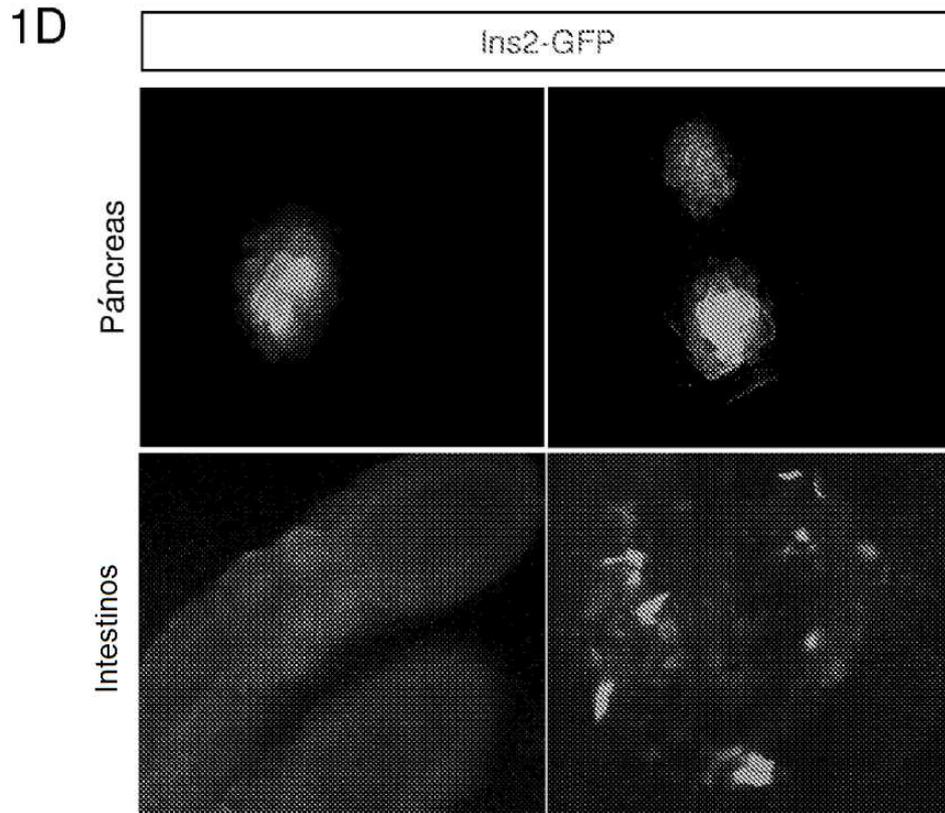
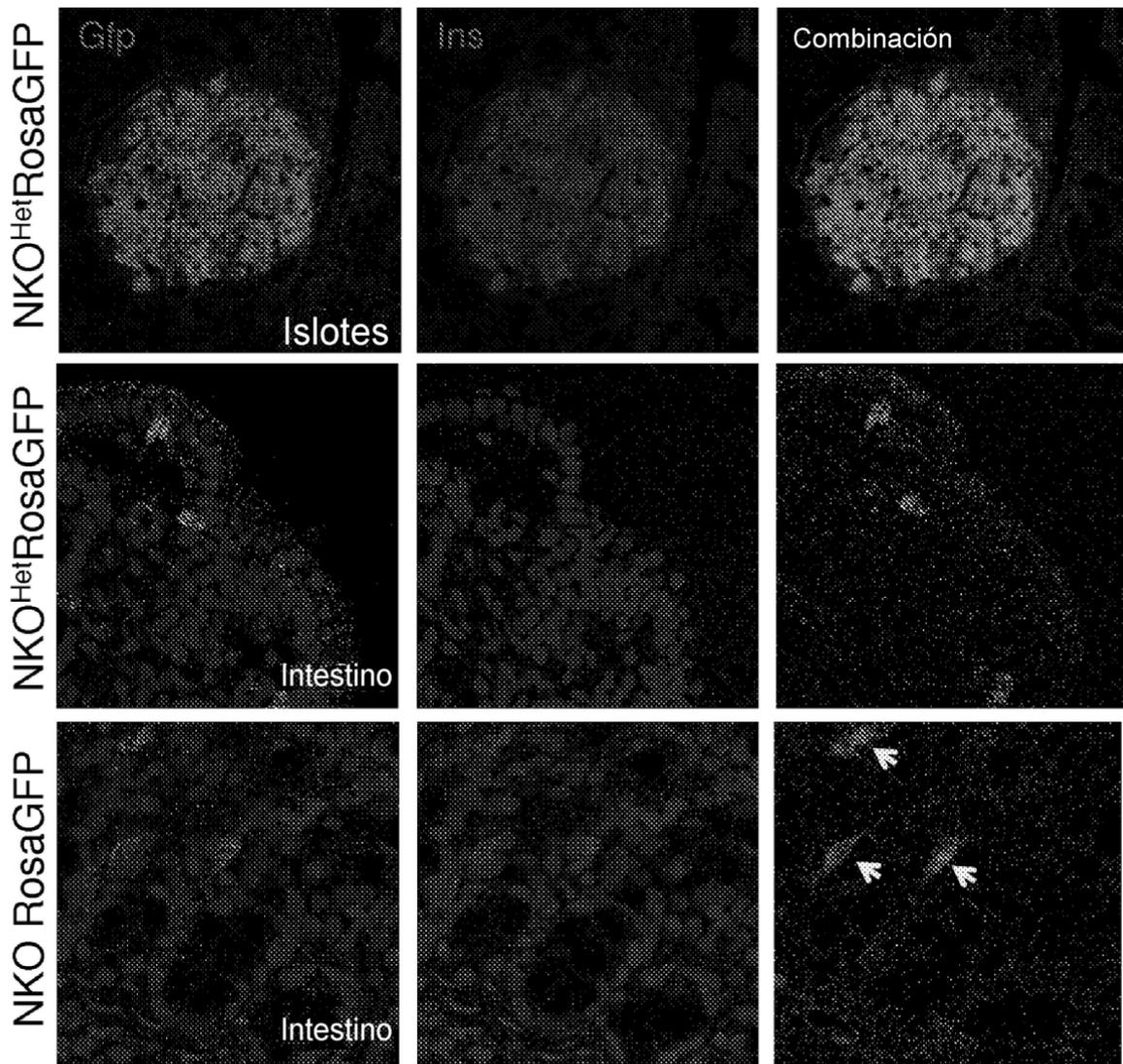


FIG. 1F



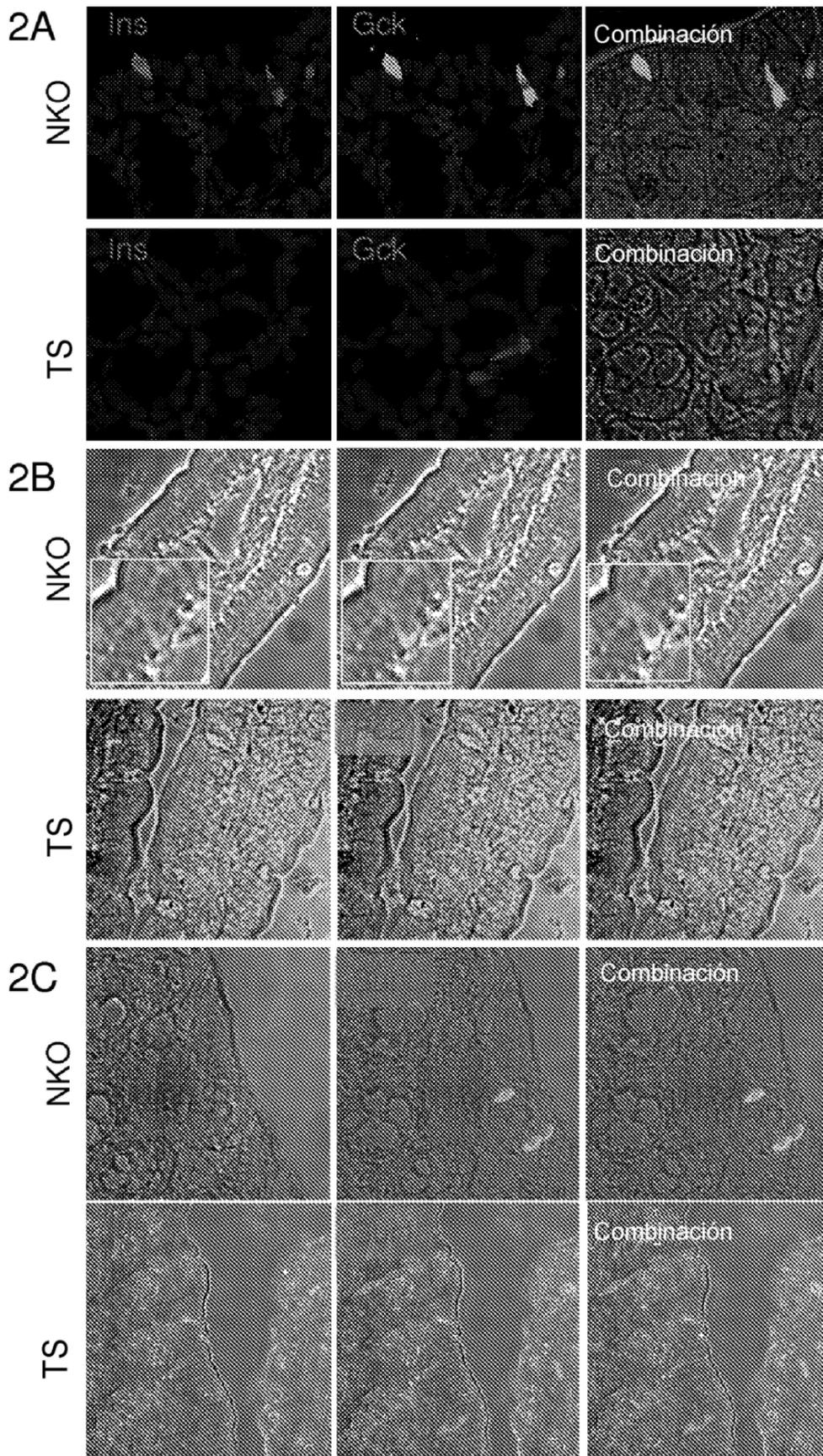


FIG. 2
A, B &
C

FIG. 2D & E

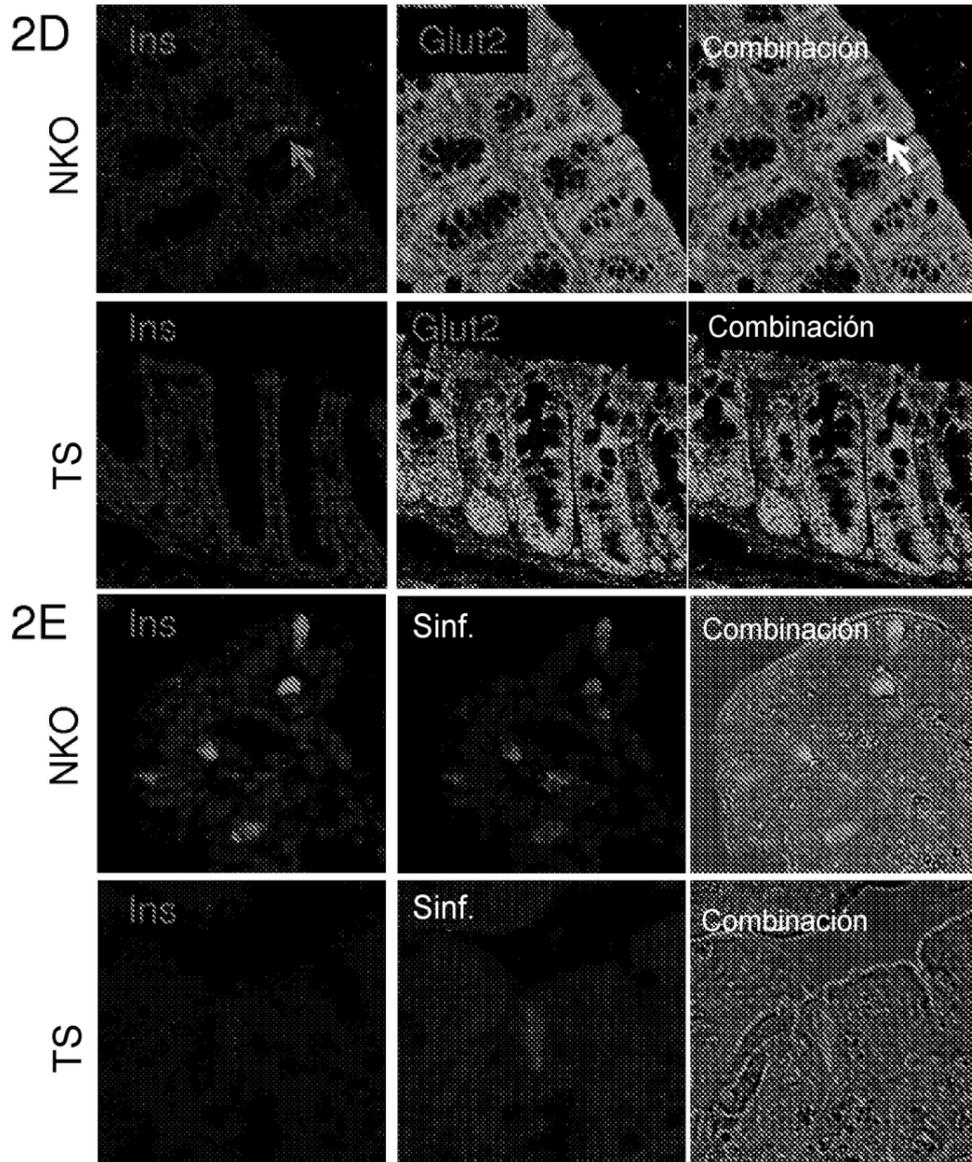


FIG. 3 A & B

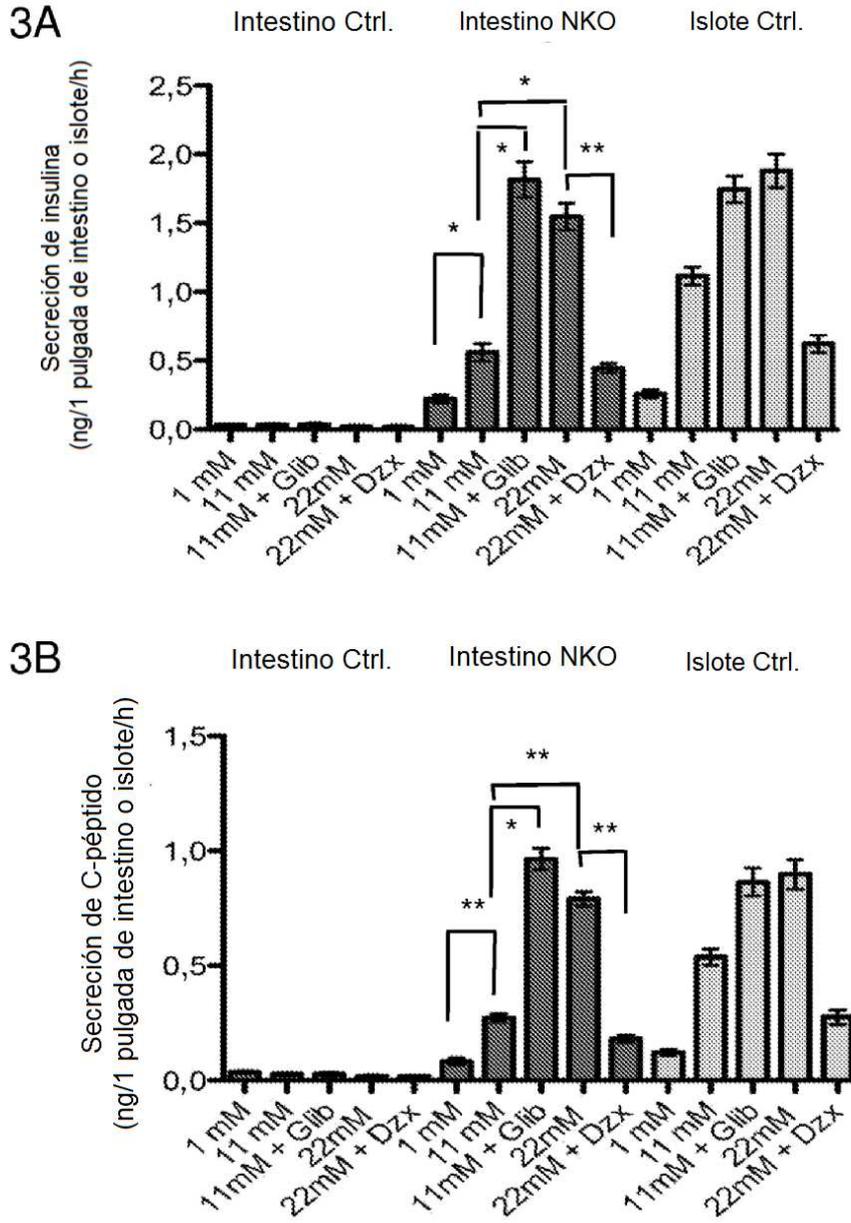


FIG. 3C

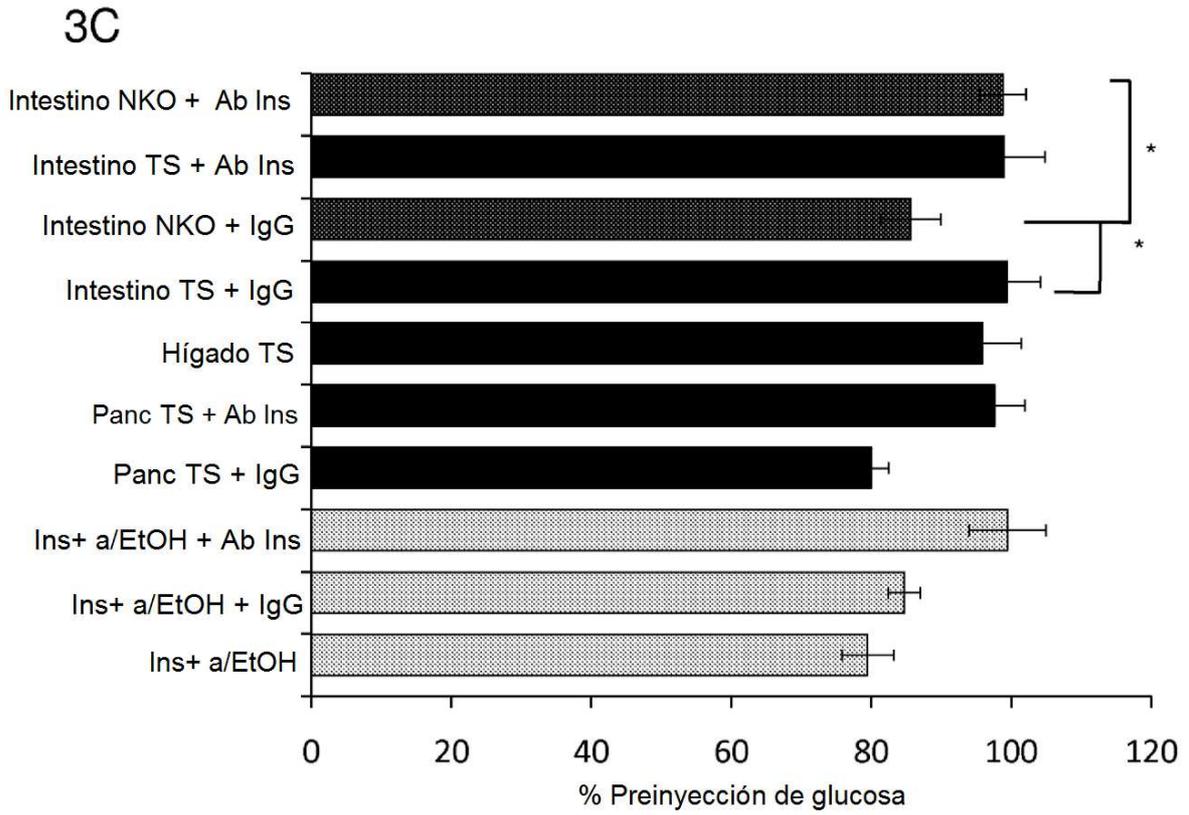
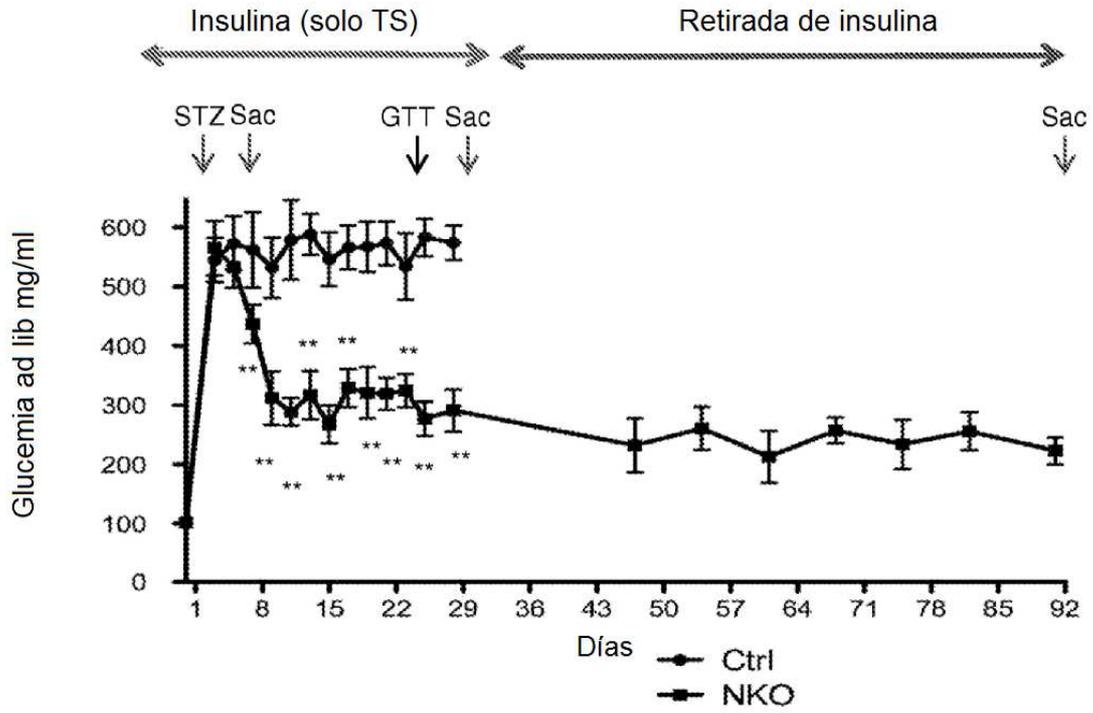
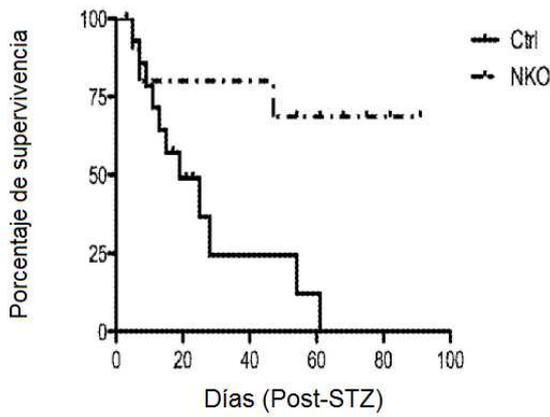


FIG. 4 A , B & C

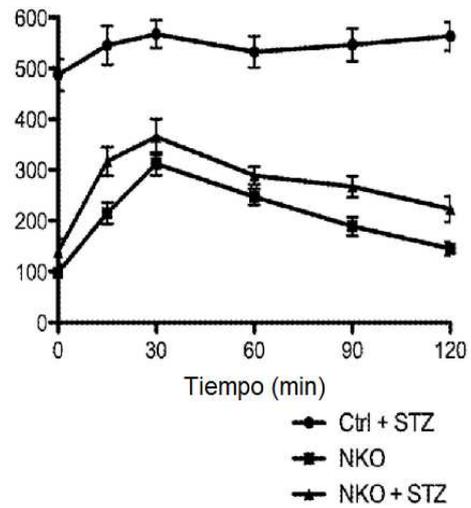
4A



4B



4C



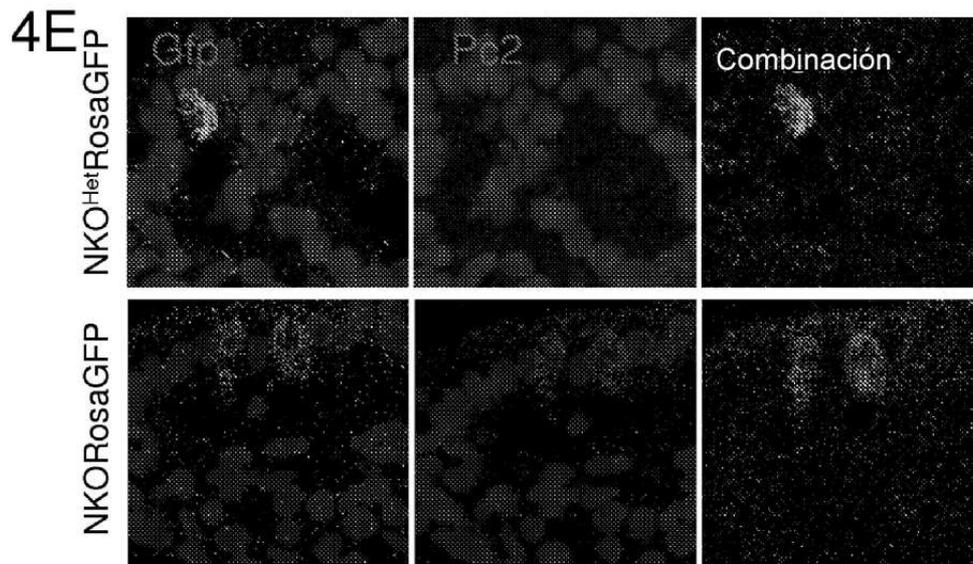
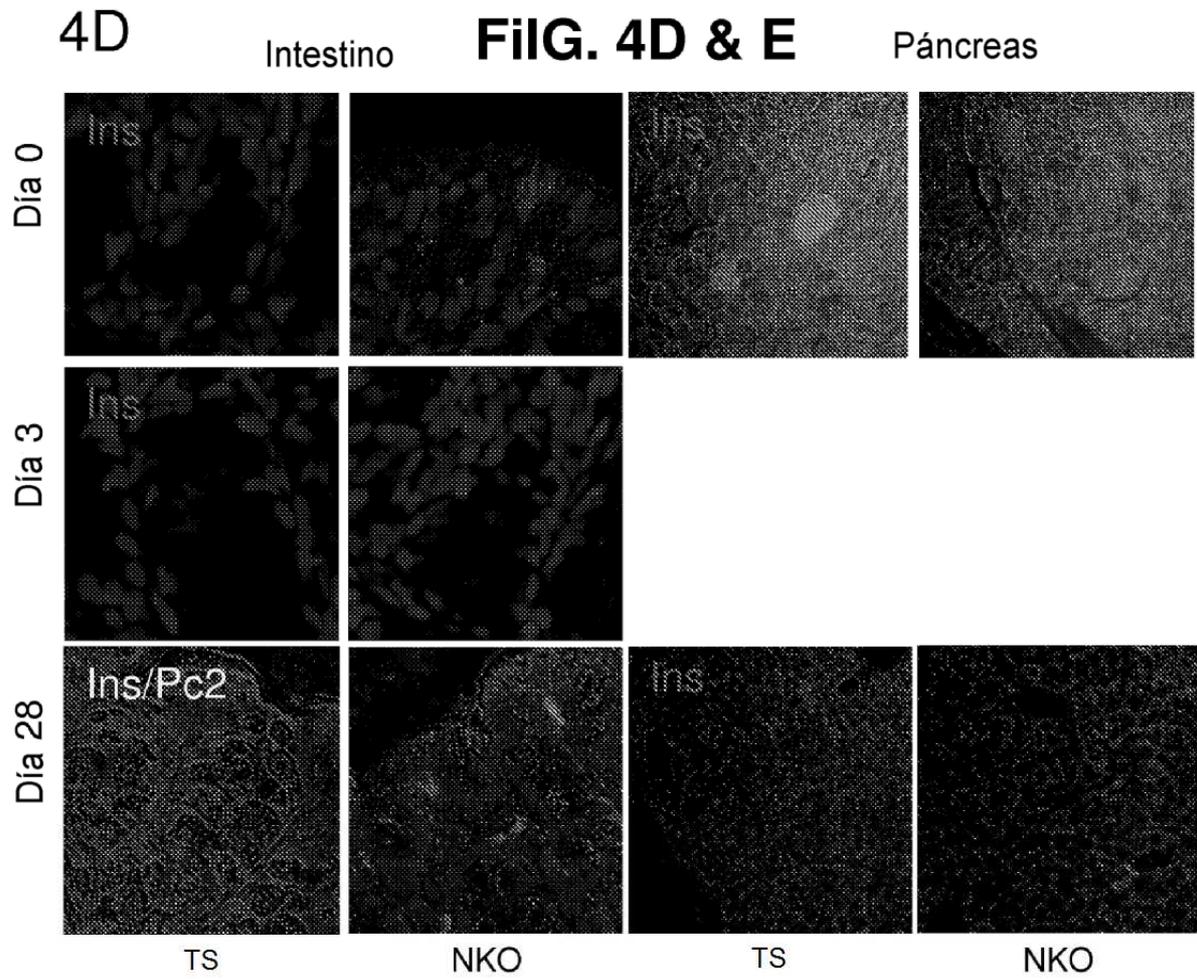


FIG. 5

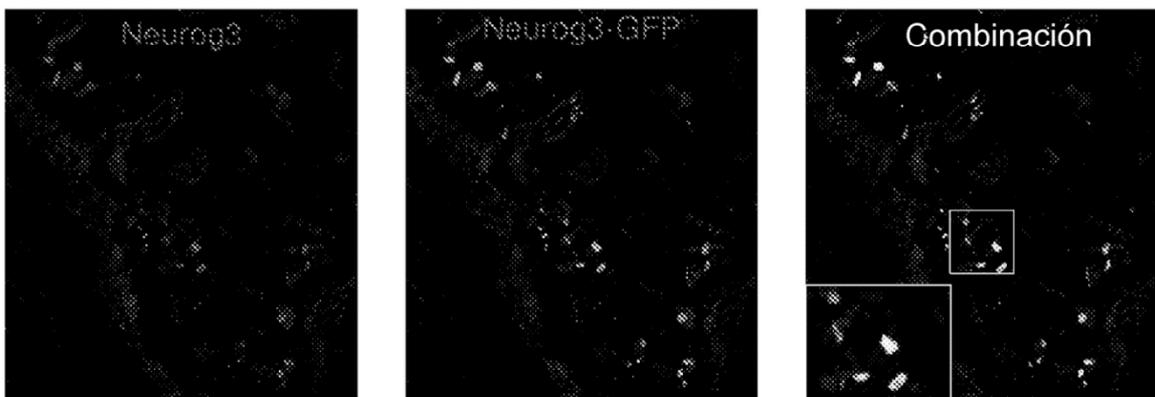


FIG. 6 A-E

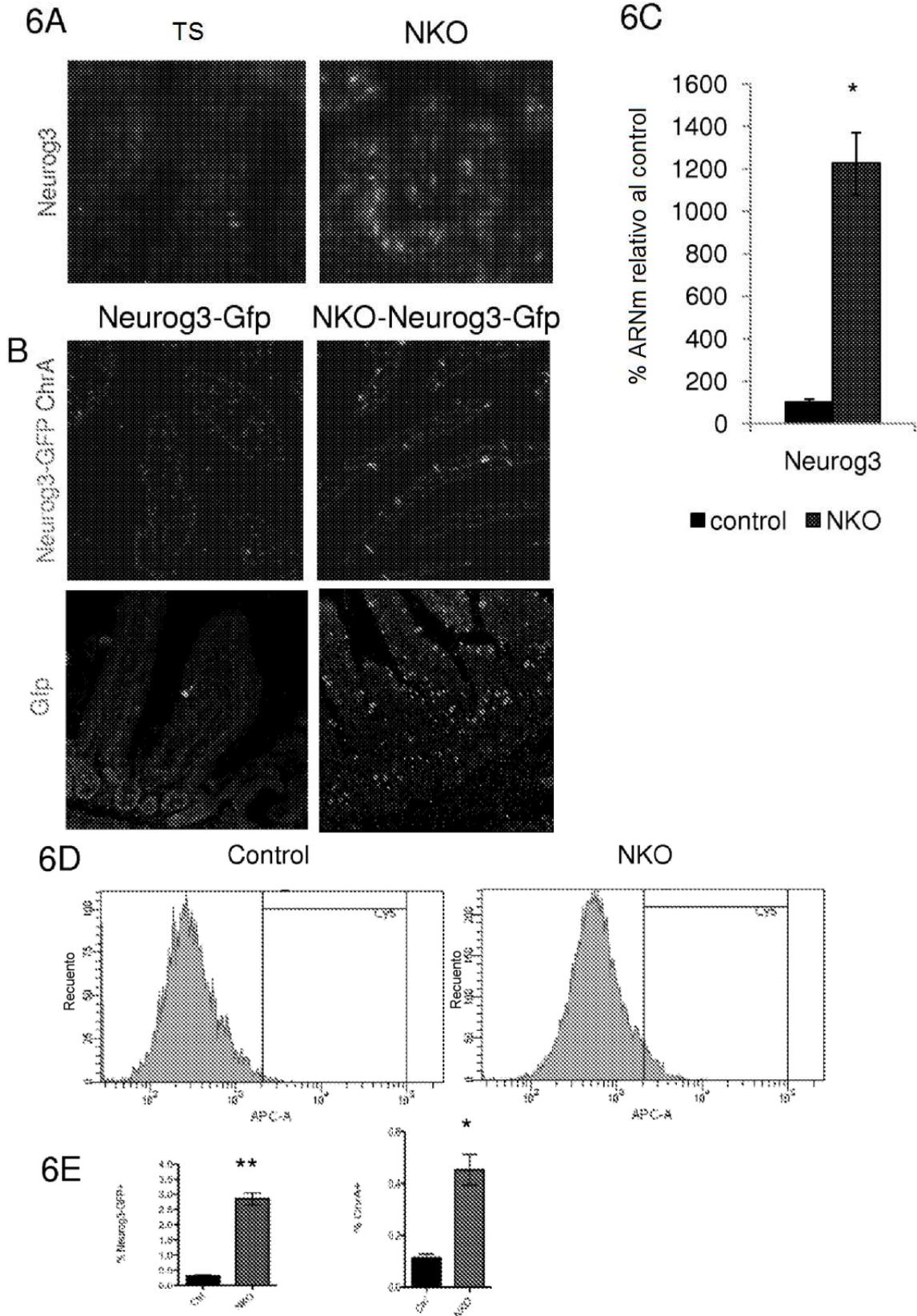


FIG. 7

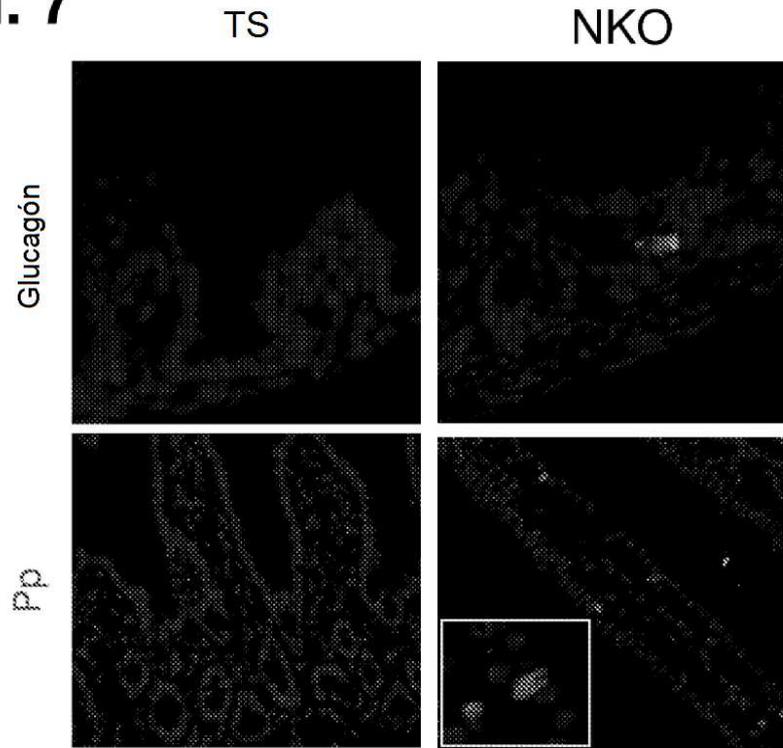


FIG. 8

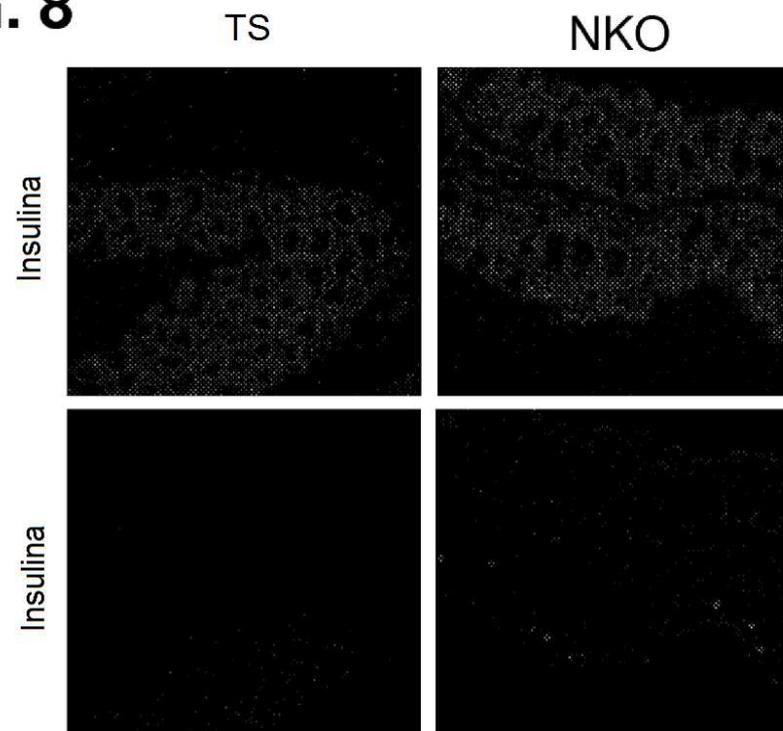


FIG. 9

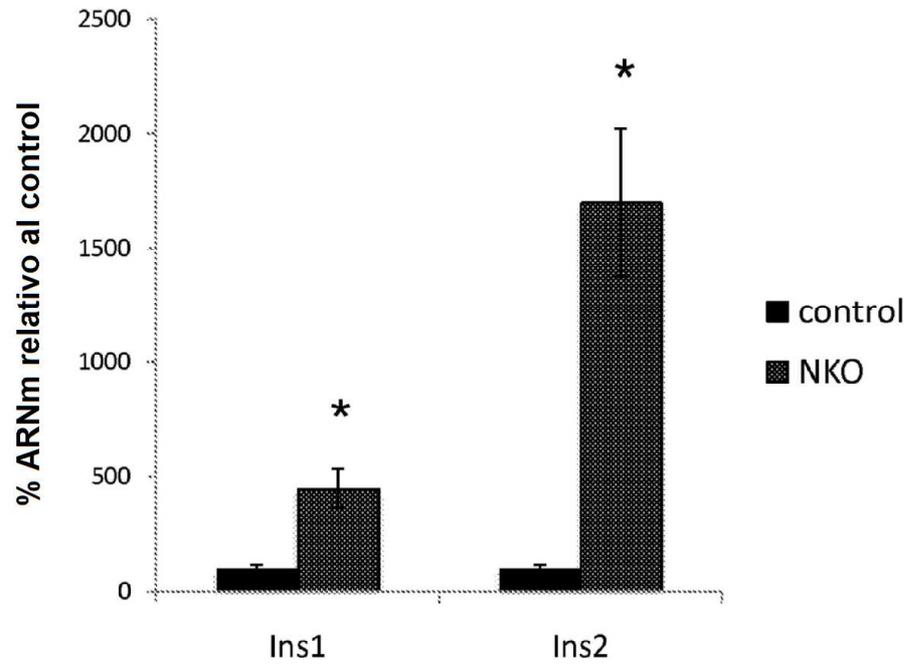


FIG. 10 A-C

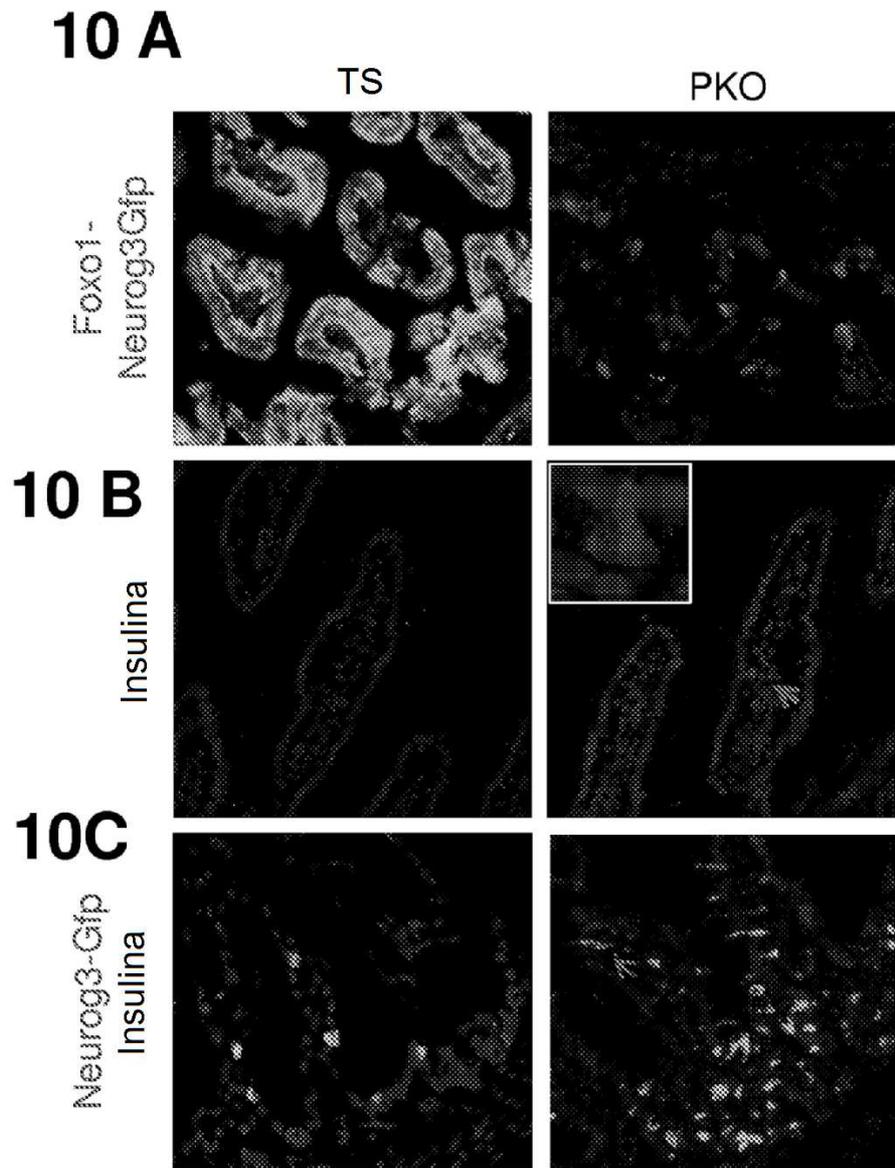


FIG. 11

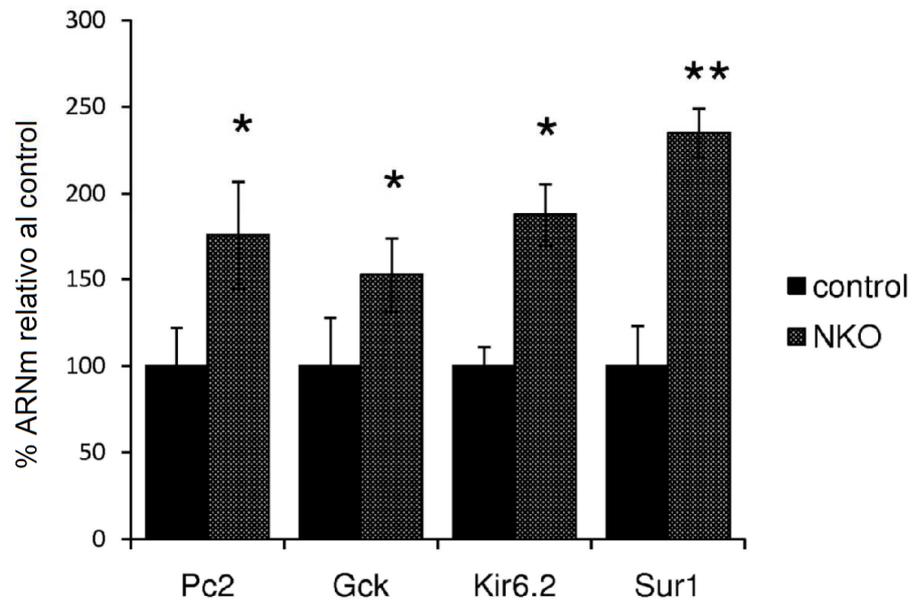
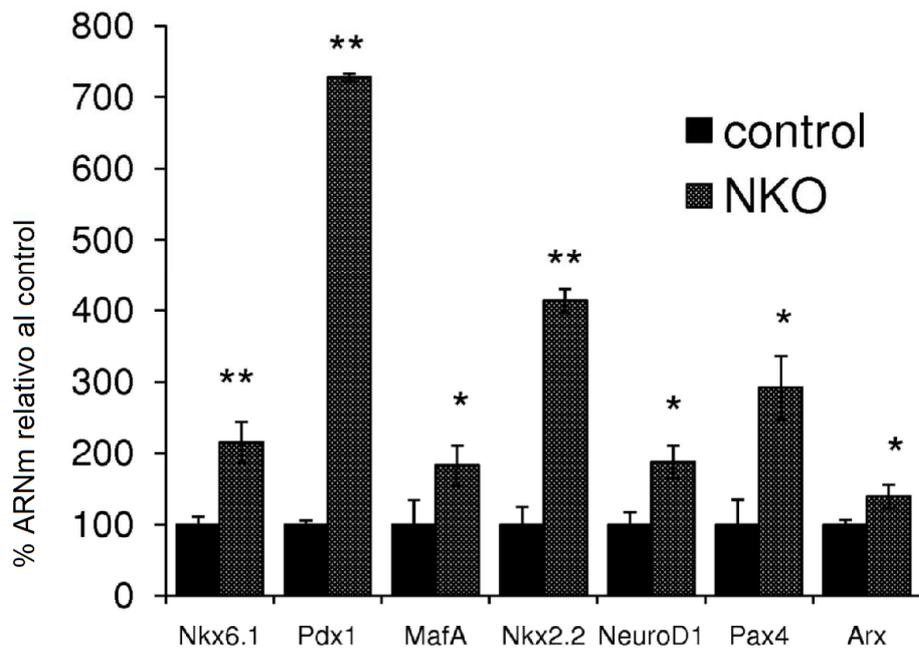
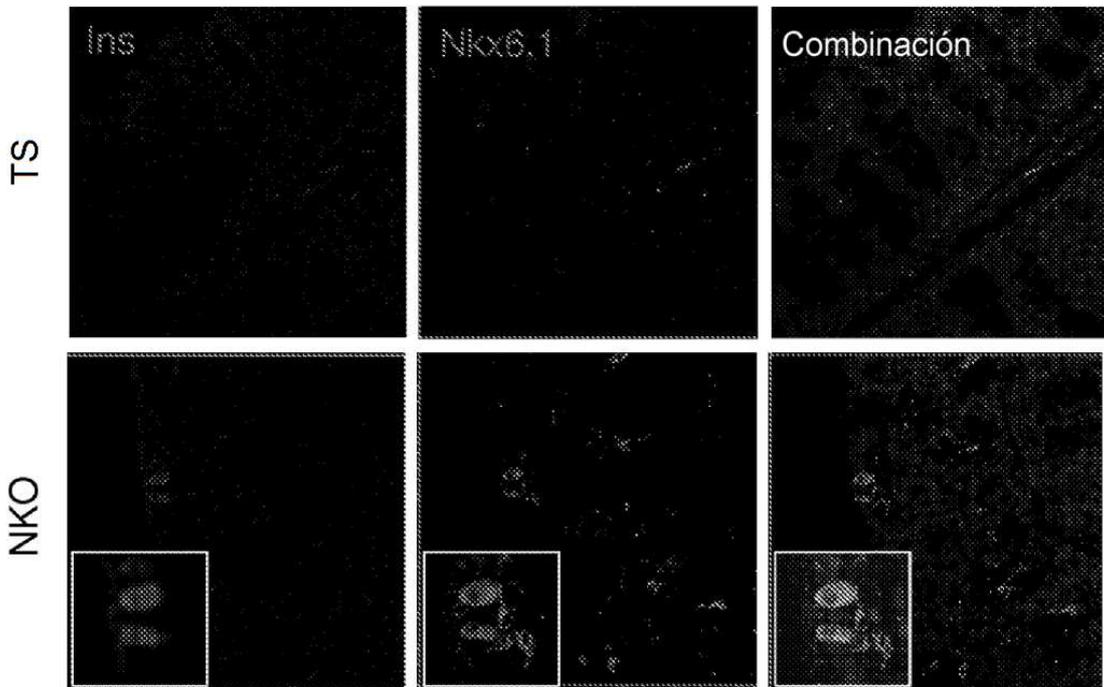
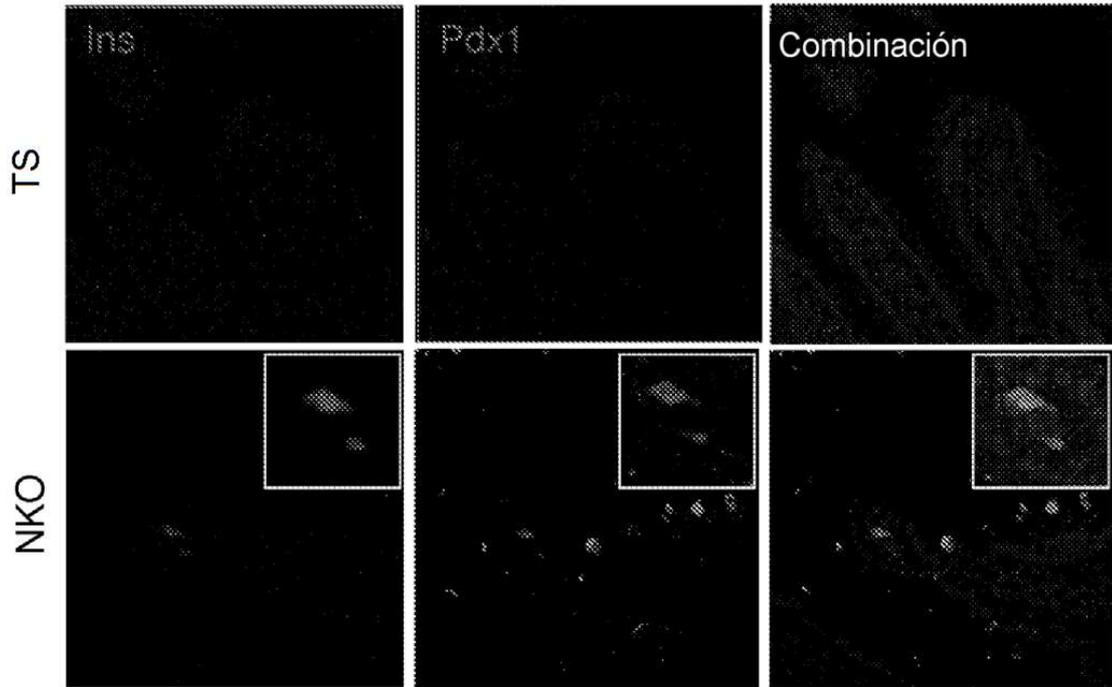


FIG. 12

13 A

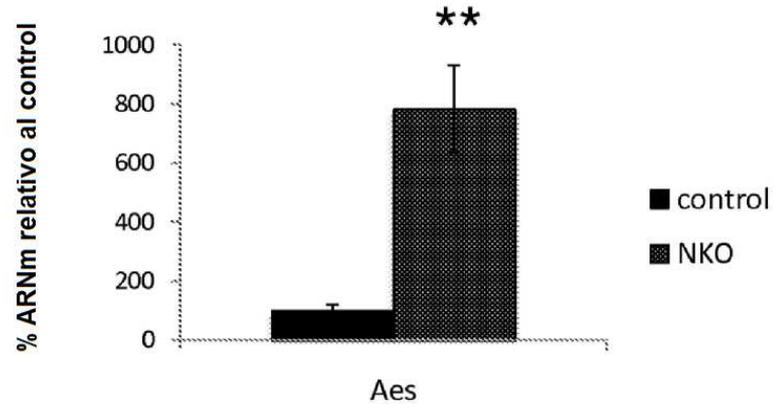
FIG. 13



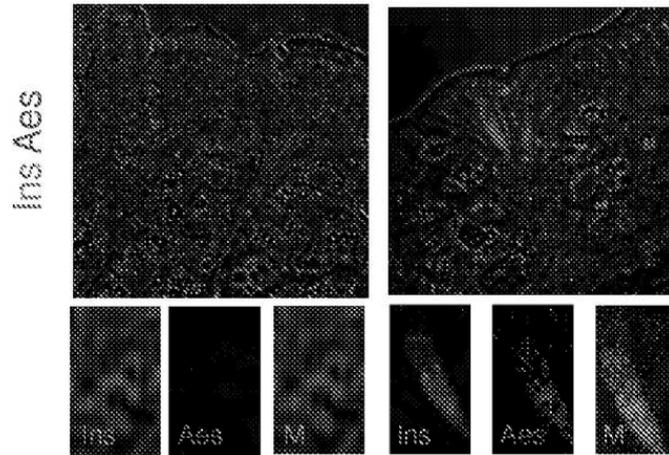
13 B

FIG. 14 A-C

14A



14B



14C

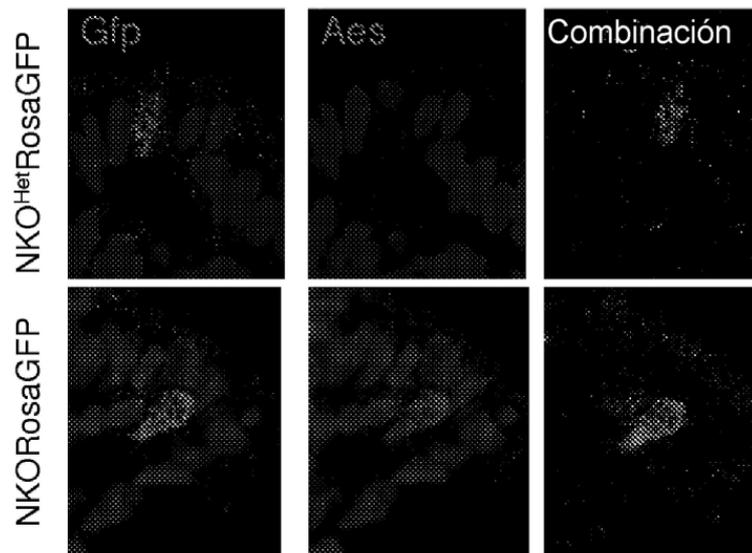
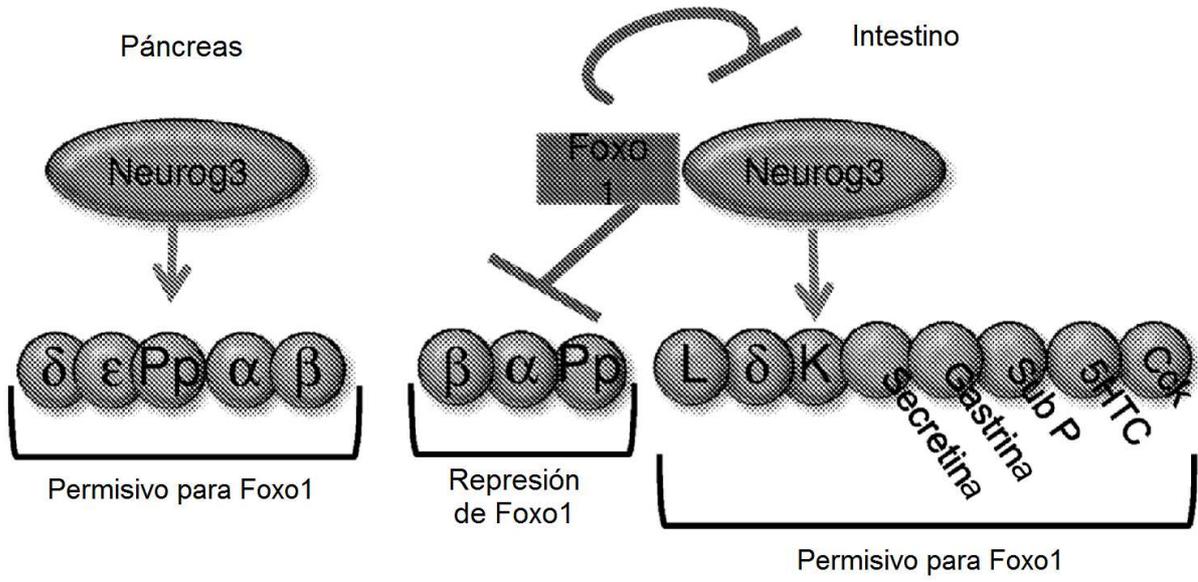
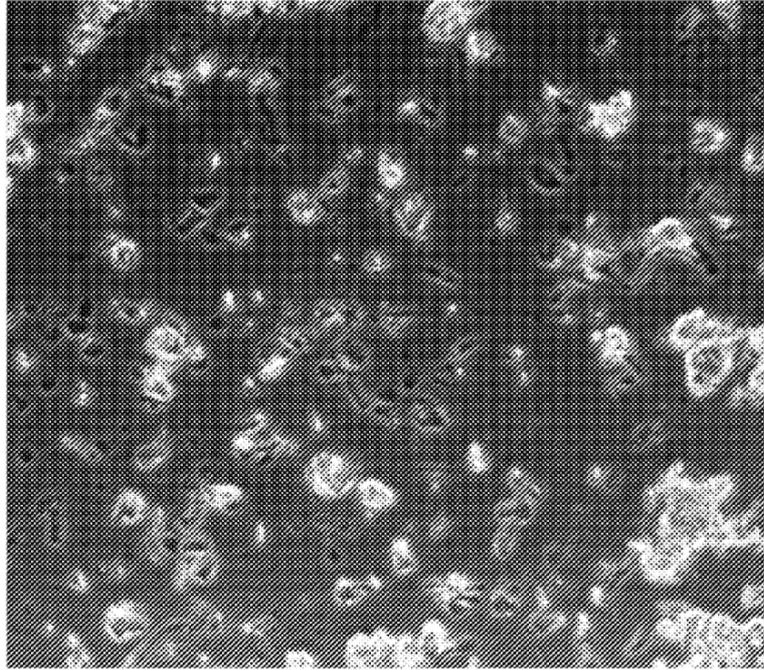


FIG. 15



NKO InsGFP



TS InsGFP

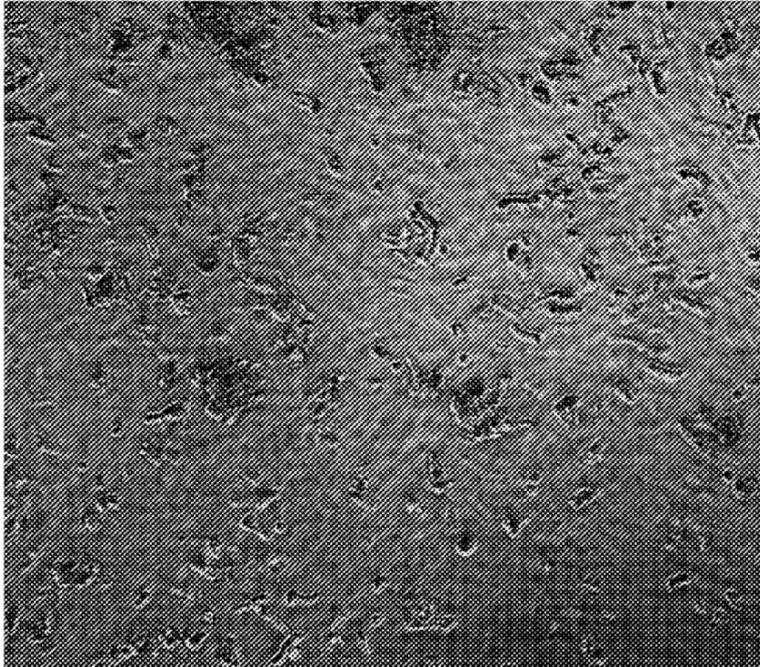


FIG. 16

NKO InsGFP

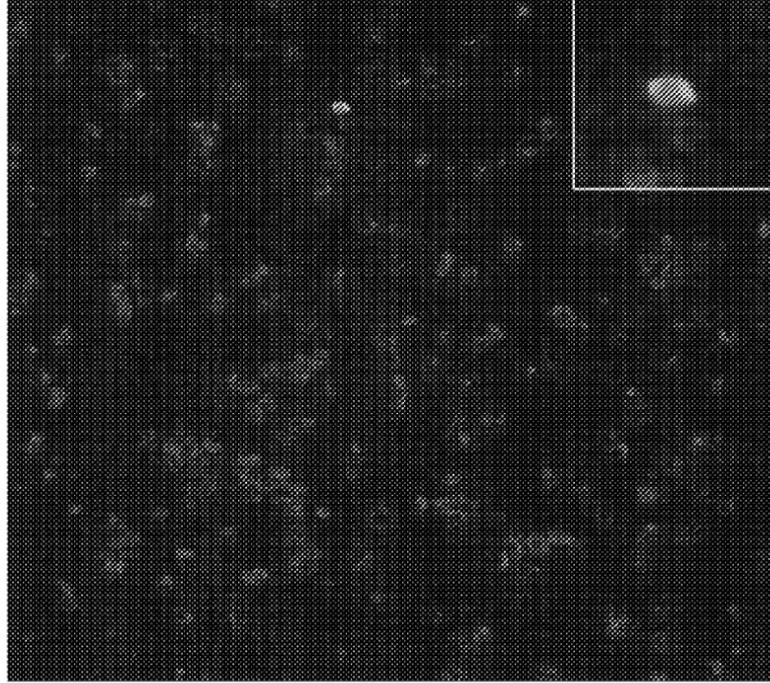
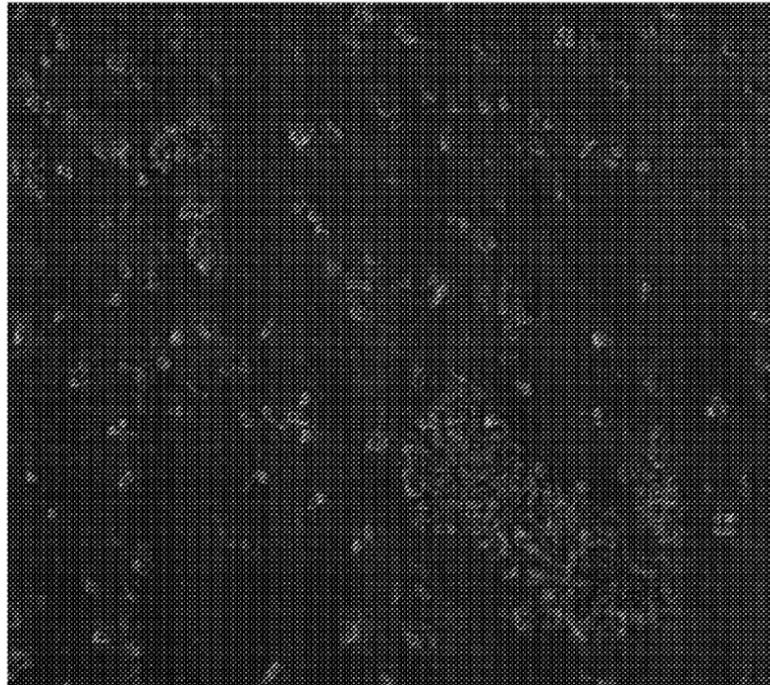


FIG. 17

TS InsGFP



NKO InsGFP

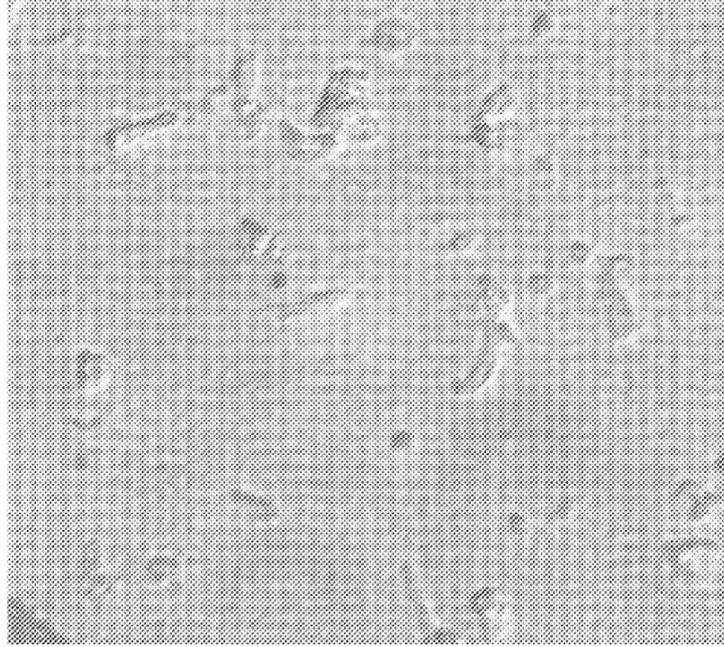
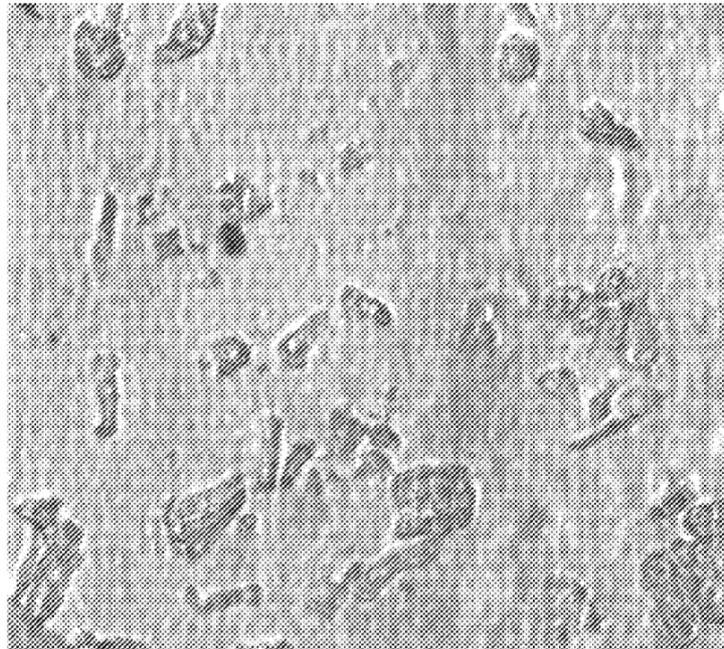


FIG. 18

TS InsGFP



NKO InsGFP

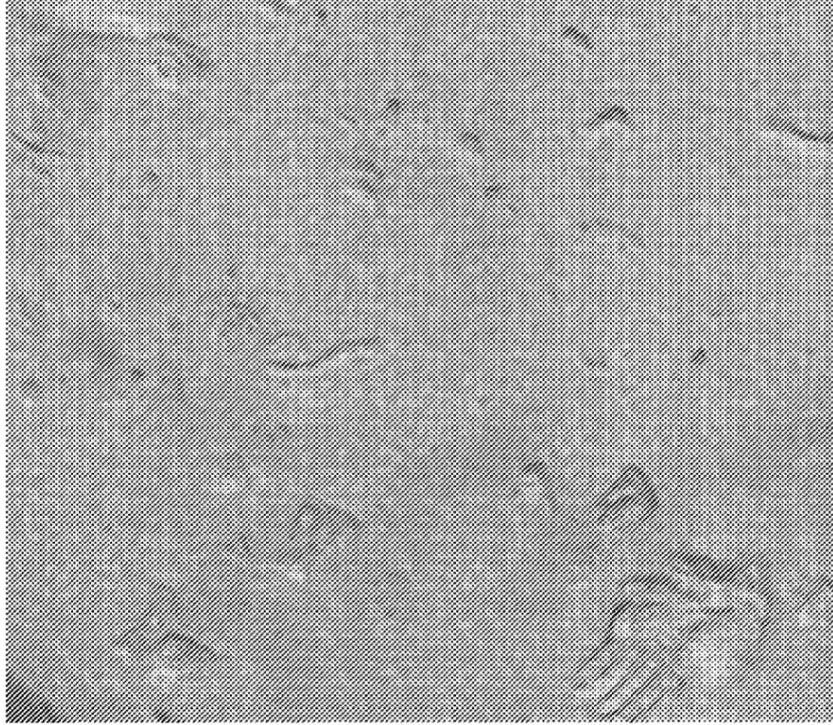
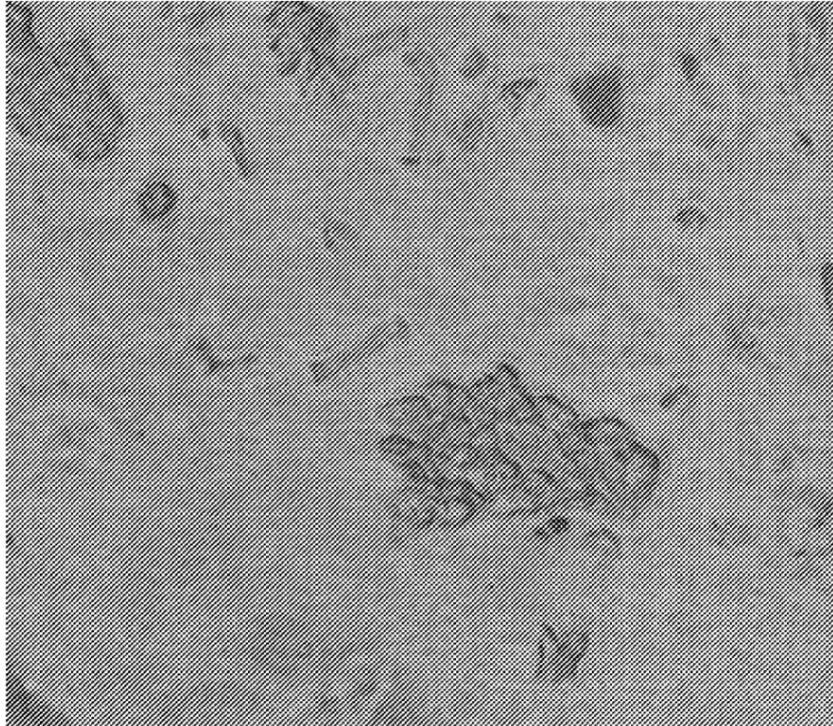
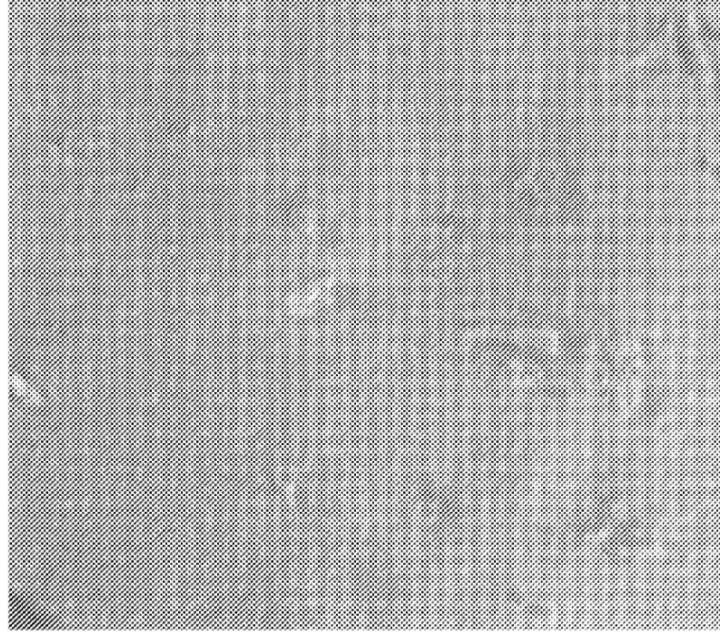


FIG. 19

TS InsGFP



TS InsGFP
ARNip Foxo1



TS InsGFP
ARNip Neg

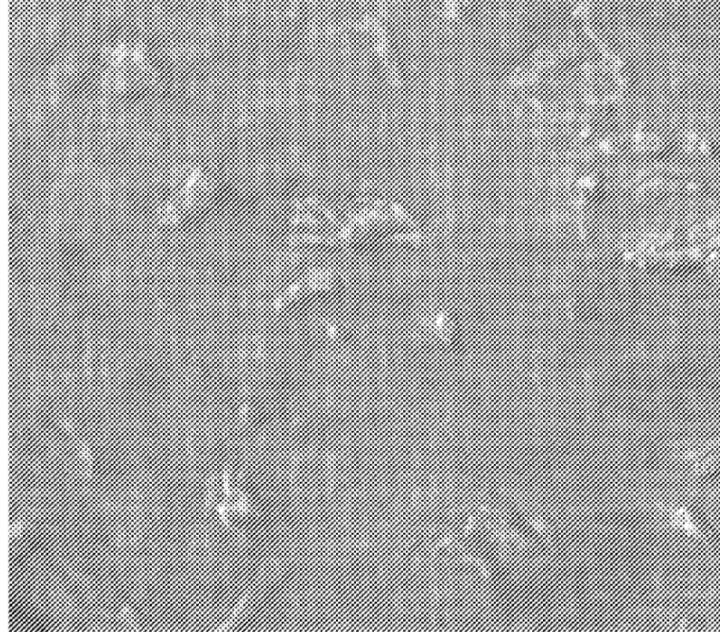


FIG. 20