



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 156 769**

② Número de solicitud: **009902696**

⑤ Int. Cl. 7: **C12N 15/16**

C12N 15/85

C12N 15/86

C12N 5/10

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **26.11.1999**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2001**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.07.2001

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA
DE BARCELONA
08193 Bellaterra, Barcelona, ES**

⑦ Inventor/es: **Bosch Tubert, Fátima**

⑦ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑤ Título: **Gen quimérico que permite expresar el gen o el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en páncreas y su utilización para la terapia génica de la diabetes mellitus.**

⑤ Resumen:

Gen quimérico que permite expresar el gen o el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en páncreas y su utilización para la terapia génica de la diabetes mellitus.

Se refiere a un gen quimérico que utiliza el gen o el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) dirigido por un promotor o fusión de promotores que permite la expresión regulada del IGF-I en páncreas. También se refiere a un vector de expresión que permite expresar IGF-I en páncreas. También se refiere a una célula pancreática que expresa dicho gen quimérico.

Finalmente, se refiere a la utilización de dicho gen quimérico o de dicho vector de expresión utilizarse en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

ES 2 156 769 A1

DESCRIPCION

Gen quimérico que permite expresar el gen o el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en páncreas y su utilización para la terapia génica de la diabetes mellitus.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un gen quimérico que contiene el gen o el cDNA (ADN complementario) del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) dirigido por un promotor o fusión de promotores que permiten expresar IGF-I en páncreas y su utilización para la terapia de la diabetes mellitus.

Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus es la enfermedad metabólica más común. Comprende una gran variedad de síndromes con distintas etiologías que afectan colectivamente de un 2 a un 7% de la población mundial. De un 5 a un 10% de los pacientes se les puede agrupar en la categoría de diabetes mellitus dependiente de insulina o diabetes tipo 1, la cual se manifiesta generalmente antes de los 40 años, frecuentemente durante la adolescencia, y es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que lleva a una deficiencia de insulina, hiperglucemia y al desarrollo de complicaciones microvasculares, macrovasculares y neurológicas. El riesgo de sufrir estas complicaciones se incrementa en función del grado de hiperglucemia. Los pacientes de diabetes tipo 1 dependen dramáticamente de la administración de insulina. La interrupción o la falta del tratamiento con insulina conduce, en primer lugar, a hiperglucemia, posteriormente a coma y finalmente a muerte del enfermo si la hormona no es inyectada. Si bien la terapia con insulina permite a la mayoría de pacientes llevar una vida activa, esta sustitución es imperfecta y afecta en gran manera a su estilo de vida. La terapia intensiva con insulina (tres o más inyecciones diarias) puede retrasar y enlentecer la aparición y progresión de las complicaciones microvasculares. Sin embargo, esta clase de tratamiento no se puede llevar a cabo en todos los pacientes diabéticos, siendo desaconsejable tanto en niños como en personas mayores. Además, los pacientes sometidos a este tratamiento intensivo con insulina presentan un elevado riesgo de sufrir episodios de hipoglucemia.

Actualmente, la mayoría de pacientes son tratados con inyecciones subcutáneas de preparaciones de insulina humana recombinante que intentan mimetizar los perfiles fisiológicos de la hormona (niveles basales bajos a los que se superponen picos postprandiales de secreción de insulina). La insulina administrada en solución es rápidamente absorbida, y es de acción rápida, mientras que suspensiones de partículas de insulina de diferentes tamaños proporcionan acción intermedia y larga. Sin embargo, la mezcla de insulina soluble con lenta reduce la disponibilidad de los componentes de acción rápida [Heine et al. (1985) *Bio. Med. J.* 290, 204-205]. Una de las principales deficiencias de las insulinas de acción retardada es la absorción variable a partir del tejido subcutáneo [Binder et al. (1984). *Diabetes Care* 7, 188-199]. Además, las preparaciones de

acción retardada no son generalmente capaces de producir niveles basales de insulina adecuados, resultando en muchos casos en la aparición tanto de hiperglucemia como de hipoglucemia. Por tanto, los niveles de insulina circulante que se consiguen con las terapias actuales están bastante alejados de los que se obtendrían si las células β funcionasen correctamente.

Debido a que la terapia sustitutoria con insulina no es perfecta, se han intentado llevar a cabo trasplantes de páncreas y también trasplantes de islotes [Remuzzi et al. (1994). *Lancet* 343, 27-31]. Estas aproximaciones pretenden eliminar las inyecciones diarias de insulina, pero requieren inmunosupresión crónica y los resultados no han sido muy exitosos. Además, los donantes son muy limitados y, por lo tanto, el tratamiento de un gran número de pacientes no parece muy realista. Otra aproximación se basa en la regeneración de las células β a partir de los precursores de las células de los islotes o bien en la inducción de la proliferación de aquellas células β que aún no hayan sido destruidas durante el proceso autoinmune en los pacientes diabéticos de tipo 1. Se ha observado que la expresión de IGF-I aumenta en las áreas de regeneración tras pancreatectomía parcial, lo cual sugiere que IGF-I puede tener un importante papel en el crecimiento y diferenciación del tejido pancreático [Smith et al. (1991) Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 6152-6156]. Así pues, la expresión local en páncreas del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) permitiría contrarrestar la diabetes tipo 1 mediante inducción de la proliferación y neogénesis de los islotes pancreáticos. El factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) es un polipéptido que presentan una alta homología de secuencia con la insulina [Le Roith, D. (1997) Insulin-like growth factors. *N. Engl. J. Med.* 336, 633-640; Schofield, P.N. (ed.) (1992). The insulin-like growth factors: structure and biological function. *Oxford Univ. Press, Oxford*]. Su principal acción es estimular la proliferación y diferenciación celular. El IGF-I circulante es mayoritariamente producido por el hígado, si bien se ha observado que en ratón adulto el páncreas expresa niveles elevados de IGF-I [Mathews et al. (1986) Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9343-9347]. Nuestra aproximación para la terapia génica de la diabetes se basa en la utilización de vectores que permitan manipular genéticamente el páncreas para que produzca IGF-I, lo que induciría la regeneración de las células β pancreáticas, mediante un mecanismo de acción autocrino o paracrino, para así recuperar la producción de insulina por parte del páncreas del propio paciente.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un gen quimérico que utiliza el gen o el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) dirigido por un promotor o fusión de promotores que permite la expresión de IGF-I en páncreas durante el proceso diabético. Dicho gen quimérico puede contener un promotor o fusión

de promotores que permiten la expresión regulada de IGF-I en páncreas endocrino o exocrino durante el proceso diabético.

La presente invención también se refiere a un vector de expresión que permite expresar el gen quimérico descrito anteriormente en páncreas. Dicho vector puede ser un plásmido, un vector viral o un vector no viral.

Cuando se trata de un vector viral, éste puede ser un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector vírico adenoasociado, un vector vírico Sindbis, un vector lentiviral o un vector derivado del herpes virus.

Es objeto de la presente invención la utilización del gen quimérico para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus, así como la utilización del vector de expresión de la invención para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

Se llevó a cabo una aproximación *in vivo* para la terapia génica de la diabetes mediante la obtención de animales transgénicos que sobreexpresan IGF-I en células β pancreáticas bajo el control del promotor del gen de la insulina. En particular, dicho animal transgénico es un ratón.

En primer lugar, se obtuvo el gen quimérico y se microinyectó a oocitos fecundados para generar los ratones transgénicos. Posteriormente, una vez identificados los transgénicos, se determinó la distribución tisular de la expresión del transgén. Así, se determinó la presencia de mRNA de IGF-I en el páncreas de los ratones transgénicos, lo que indicaba que el promotor de la insulina era capaz de dirigir la expresión del IGF-I en aquellos tejidos donde se expresa el gen de la insulina endógeno. Estos resultados indicaban que la expresión de IGF-I por parte del páncreas en estos animales transgénicos era compatible con la supervivencia normal del animal. A los 2 meses de edad, los ratones transgénicos alimentados presentaban unos niveles tanto de insulina como de glucosa en suero similares a los de los ratones control (glucosa: 140 ± 6 mg/dl control frente a 137 ± 5 mg/dl transgénico; insulina: $1,50 \pm 0,15$ μ IU/ml control frente a $1,8 \pm 0,25$ μ IU/ml transgénico).

Los ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-I presentan hiperplasia de los islotes con la edad (más de 6 meses). Por ello, procedimos al estudio del comportamiento de dichos ratones transgénicos en condiciones inductoras de hiperglucemia para determinar si estos animales podían contrarrestar las alteraciones diabéticas, provocadas por el tratamiento con Stz, mediante la formación de nuevos islotes o bien mediante la inducción de la regeneración de los islotes residuales. Para ello, se indujo, tanto en ratones control como en ratones transgénicos, diabetes experimental mediante la inyección durante cinco días consecutivos del tóxico estreptozotocina (Stz) por vía intraperitoneal. La administración de Stz a bajas dosis durante cinco días consecutivos lleva al desarrollo de inflamación y a la destrucción autoinmune de las células β [Rossini et al. (1977) Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes*, 26, 916-920].

En primer lugar, se determinaron las concen-

traciones en suero de glucosa y de insulina 30 días y 90 días en controles y transgénicos y 180 días en transgénicos después de la última inyección de Stz tal y como se muestra en la Tabla 1 que sigue.

5 TABLA 1

Niveles de glucosa e insulina en suero de animales tratados con STZ

	Control		
	día 0	día 30	día 90
10 Glucosa (mg/dl)	140 ± 6	579 ± 16	>700
15 Insulina (μ IU/ml)	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1

	Transgénico			
	día 0	día 30	día 90	día 180
20 Glucosa (mg/dl)	137 ± 5	530 ± 32	225 ± 30	215 ± 23
25 Insulina (μ IU/ml)	1.8 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.4

30 Así, se observa que tras tratamiento con Stz todos los animales controles desarrollan gran hiperglucemia, ya que carecen de insulina, y no sobreviven más de tres meses tras el tratamiento. En cambio, los animales transgénicos que expresan IGF-I tratados con Stz, tras desarrollar hiperglucemia, recuperan la normoglucemia 2 meses después del tratamiento, mantienen el peso corporal y sobreviven más allá de un año al tratamiento con Stz. Análisis histológicos e inmunohistoquímicos del páncreas de estos animales transgénicos muestran que si bien existe un proceso de insulinitis en los islotes pancreáticos en los estadios iniciales, éste desaparece posteriormente, detectándose un gran número de células productoras de insulina en los islotes, lo cual indica que se ha establecido un proceso de replicación de las células β . Además, se observa un gran incremento en número de nuevos islotes a partir de células de los conductos y una disminución en la apoptosis. Estos resultados indican que la transferencia del gen del IGF-I a páncreas de pacientes de diabetes tipo 1 induciría un proceso de proliferación que llevaría a un incremento en la masa de células β y, por tanto, a una terapia curativa de esta enfermedad.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen son ilustrativos y no limitantes de la invención. A menos que se indique lo contrario, los reactivos se obtuvieron de proveedores comerciales y, donde corresponda, se emplearon de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo I

60 *Obtención de un gen quimérico que incluye el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I)*

Para la construcción del gen quimérico RIP/IGF-I se partió del plásmido pKCR3 que contiene el gen de la β -globina de conejo. El fragmento BamHI-XhoI de dicho gen se introdujo en los lugares de restricción BamHI-XhoI del polylinker del vector plasmídico Bluescript SK+.

Este fragmento del gen de la β -globina contiene los dos últimos exones, el último intrón, y la región 3' ligada al enhancer del SV40. El fragmento SacI-BamHI (-570 pb a +3 pb) del promotor de la insulina de rata-I (RIP-I) se introdujo en los lugares SacI-BamHI en el polylinker del vector Bluescript. Finalmente, el fragmento EcoRI (577 pb) que contenía el cDNA completo del IGF-I de rata se introdujo en la diana EcoRI del segundo exón del gen de la β -globina. El plásmido final resultante se denominó pRIP/IGF-I.

Ejemplo II

Ratón transgénico que expresa el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en células β pancreáticas

II.1. Generación del ratón transgénico

El ratón transgénico se obtuvo a partir de la microinyección del fragmento SacI-XhoI de 3.4 Kb que contiene el gen quimérico RIP/IGF-I descrito en el ejemplo anterior.

Los oocitos fertilizados se recogieron mediante el vaciado de los oviductos de las ratonas donantes 12 horas después del apareamiento. A continuación se inyectaron de 2 a 3 pl de una solución de DNA (4 ng/ μ l) en el pronúcleo del cigoto. Los cigotos inyectados se implantaron en el oviducto de hembras pseudogestantes, aproximadamente 10 cigotos por lado [Hogan et al. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York].

A las 3 semanas después del nacimiento se analizó la presencia del transgén en la descendencia mediante análisis de transferencia e hibridación Southern (*Southern blot*) de 10 μ g de DNA procedente de la cola de cada uno de los animales. Las muestras de DNA fueron digeridas con un enzima de restricción adecuado, resultando los fragmentos característicos, la presencia de los cuales tan sólo es detectable en los ratones transgénicos.

II.2. Análisis de la expresión del transgén

Se pudo comprobar la expresión del gen quimérico en el páncreas de los ratones transgénicos mediante el análisis del RNA total extraído del páncreas de los animales control y transgénicos. El RNA total se obtuvo empleando el método del isotiocianato y, a continuación, se separaron muestras de RNA en un gel de electroforesis de agarosa que contenía formaldehído se transfirió (*Northern blot*) a una membrana para su hibrida-

ción con una sonda del IGF-I. Para ello, se marcó dicha sonda con [α - 32 P]dCTP siguiendo el método de *oligoprimering* según las instrucciones del fabricante. Las membranas de transferencia se pusieron en contacto con películas Kodak XAR-5. La presencia de hibridación en las muestras de RNA correspondientes a los páncreas en los ratones transgénicos indica la expresión del gen quimérico en dicho tejido. Posteriormente, se obtuvieron páncreas de animales controles y transgénicos y se incluyeron en parafina. Los cortes histológicos obtenidos de estos páncreas se analizaron mediante estudios inmunohistoquímicos utilizando un anticuerpo específico anti-IGF-I. Esto permitió detectar la presencia de proteína IGF-I específicamente en las células β pancreáticas, lo que indicaba que el gen quimérico se expresaba de forma adecuada.

II.3. Análisis de los niveles de glucosa e insulina

Se obtuvieron muestras de sangre de ratones control y transgénicos antes (día 0) del tratamiento con estreptozotocina (Stz) y a los (día) y (día) días después del tratamiento.

La concentración de glucosa se determinó mediante el sistema Glucometer EliteTM de Bayer. La insulina se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) con el kit comercial de INSULIN-CT de CIS Biointernational, Francia.

II.4. Obtención de los ratones diabéticos

Se indujo diabetes experimental en ratones controles y transgénicos de semanas de edad mediante inyección intraperitoneal durante 5 días consecutivos de 40 mg Stz/Kg de peso vivo [Rossini et al. (1977) *J. Am. Diab. Assoc.* 26, 916-920]. La Stz fue disuelta en una solución 10 mM de citrato sódico que contenía un 0.9% de cloruro sódico a pH 4.5 inmediatamente antes de la administración. Se confirmó la diabetes mediante la medida de los niveles sanguíneos de glucosa.

Como se puede observar en la Tabla 1, y a diferencia de los ratones control, cuyos valores de glucosa sanguínea aumentaron a lo largo de la realización del experimento, los animales transgénicos diabéticos presentaban una normalización en los niveles de glucosa sanguínea a partir de los 2 meses después del tratamiento con Stz, así como una recuperación de los niveles de insulina en suero debido a la regeneración de las células β pancreáticas.

REIVINDICACIONES

1. Gen quimérico que utiliza el gen o el cDNA del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) dirigido por un promotor o fusión de promotores que permite la expresión del IGF-I en páncreas.

2. Gen quimérico según la reivindicación 1, conteniendo un promotor o fusión de promotores que permiten la expresión regulada del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en páncreas exocrino.

3. Gen quimérico según la reivindicación 1, conteniendo un promotor o fusión de promotores que permiten la expresión regulada del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en cualquiera de los tipos celulares del páncreas endocrino.

4. Gen quimérico según la reivindicación 1, conteniendo un promotor o fusión de promotores que permiten la expresión regulada del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en células β pancreáticas.

5. Gen quimérico según la reivindicación 1, conteniendo un promotor o fusión de promotores que permiten la expresión regulada del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) en células β pancreáticas, siendo este promotor el

promotor de la insulina.

6. Vector de expresión que permite expresar el gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en páncreas.

7. Vector de expresión según la reivindicación 6, siendo este vector un plásmido.

8. Vector de expresión según la reivindicación 6, siendo este vector un vector viral.

9. Vector de expresión según la reivindicación 6, siendo este vector un vector no viral.

10. Célula pancreática que expresa el gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

11. Célula pancreática según la reivindicación 10, en la que se ha introducido el gen quimérico mediante un vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

12. Utilización de un gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

13. Utilización de un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 156 769

⑫ N.º solicitud: 009902696

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.1999

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12N 15/16, 15/85, 15/86, 5/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5837875 A (BOSCH et al.) 17.11.1998, todo el documento.	1-13
Y	WO 9824922 A (GENEMEDICINE INC.) 11.06.1998, página 3, línea 30 - página 26, línea 18.	1-13
Y	KRAKOWSKI M.L. et al., "Transgenic expression of epidermal growth factor and Keratinocyte growth factor in beta-cells results in substantial morphological changes". Agosto 1999. Journal of Endocrinology. Vol. 162, páginas 167-175.	1-13
A	US 5925564 A (SCHWARTZ et al.) 20.07.1999, todo el documento.	1-13
A	WO 9910013 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 04.03.1999, reivindicaciones.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

01.03.2001

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1