



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 155 288**

⑫ Número de solicitud: **009201750**

⑤① Int. Cl.⁷: **C12N 15/17, C12N 15/62**
C12N 15/85, C12N 15/86
C12N 5/10, A01K 67/027

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **30.07.1992**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2001**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2001

⑦① Solicitante/s:
UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA
08193 Bellaterra, Barcelona, ES

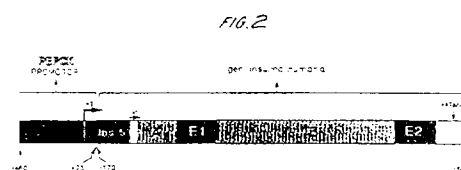
⑦② Inventor/es: **Bosch Tubert, Fátima y**
Valera Abril, Alfons

⑦④ Agente: **Ponti Grau, Ignacio**

⑤④ Título: **Gen quimérico que utiliza el gen o cDNA de la insulina, en especial para terapia génica de la diabetes.**

⑤⑦ Resumen:

Gen quimérico que utiliza el gen o cDNA de la insulina, en especial para terapia génica de la diabetes. El gen quimérico está dirigido por un promotor o fusión de promotores, los cuales preferentemente son regulables y están activados por el proceso diabético. Preferentemente, se obtiene por fusión del gen de la insulina humana al promotor de la PEPCK (p-enolpiruvato carboxiquinasa). Dicho promotor (fragmento - 460 pb a + 73 pb) está fusionado a la zona 5' franqueante del gen de la insulina humana (-170 pb a +1). El gen de la insulina humana contiene dos exones codificantes E1 y E2 y dos intrones A y B. También se refiere a un vector de expresión que permite expresar insulina en células diferentes de las células β del páncreas y a un animal transgénico no humano que expresa el citado gen quimérico. Se utiliza especialmente para la terapia génica de la diabetes.



DESCRIPCION

Gen quimérico que utiliza el gen o cDNA de la insulina, en especial para terapia génica de la diabetes.

La presente invención se refiere en primer lugar a un gen quimérico que utiliza el gen o cDNA (ADN complementario) de la insulina dirigido por un promotor o fusión de promotores.

Más concretamente se refiere al diseño de un gen quimérico formado por la fusión del promotor de la P-enolpiruvato carboxiquinasa al gen estructural de la insulina humana, que permite la producción de insulina humana, de manera fisiológicamente regulada, en un tejido diferente del páncreas.

La invención se refiere también a otros objetos que se describen más adelante.

Antecedentes de la invención

Los pacientes afectados de diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) (tipo I) dependen dramáticamente de la administración de la hormona. La interrupción de la administración de insulina provoca primero hiperglucemia y cetoacidosis, posteriormente coma y finalmente muerte si la hormona no es inyectada. Por tanto, la vida y la calidad de vida de estos pacientes depende completamente de las fluctuaciones de sus niveles de insulina en sangre.

La terapia génica consiste en la transferencia de material genético en células de un paciente a fin de tratar una enfermedad. Actualmente se están desarrollando diferentes aproximaciones de terapia génica, basadas en la introducción de genes directamente en animales o en células que posteriormente son trasplantadas.

Sin embargo, la meta más importante no es conseguir trasplantar con éxito células que expresen el gen en un animal, sino conseguir que el gen se exprese de manera regulada y fisiológica. La elección de un buen promotor que dirija la expresión del gen adecuado es crucial a fin de obtener niveles plasmáticos adecuados de la correspondiente proteína.

En el caso de la diabetes se trata de elegir el promotor que dirija la expresión del gen para obtener niveles plasmáticos de insulina adecuados a cada circunstancia en que se encuentre el individuo. La sobreexpresión del gen de la insulina provocaría hipoglucemia y una expresión baja de dicho gen no modificaría los niveles de glucosa elevados en el proceso diabético.

Descripción de la invención

La invención tiene por objeto un gen quimérico que utiliza el gen o cDNA (ADN complementario) de la insulina dirigido por un promotor o fusión de promotores, preferentemente regulables y activados por el proceso diabético.

Preferentemente, la invención tiene por objeto un gen quimérico que se obtiene por la fusión del gen de la insulina humana al promotor de la P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK).

La P-enolpiruvato carboxiquinasa es un enzima clave en el control de la vía gluconeogénica, y se encuentra principalmente en el hígado, riñón, yeyuno y tejido adiposo. La actividad de este enzima se regula a nivel de la expresión de su gen (Hanson, R.W., et al. (1976) Gluconeogene-

sis: Its Regulation in mammalian Species. John Wiley & Sons, Inc., New York). La expresión de gen de la PEPCK se encuentra finamente regulada por hormonas. En el fragmento del promotor de la PEPCK utilizado (-550 pb a +73 pb) se han descrito secuencias que responden a AMPc a glucocorticoides y a insulina (Wynshaw-Boris A. et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 12161-12169; Wynshaw-Boris, A., et al. (1986) J. Biol. Chem. 261, 9714-9720; Short, J.M., et al. (1986) J. Biol. Chem. 261, 9721-9726; O'Brien, R.M., et al. (1990) Science 249, 533-537). El glucagón, actuando vía AMPc, y los glucocorticoides activan la expresión del gen, mientras que la insulina inhibe dicha expresión. En animales diabéticos, la expresión del gen de la PEPCK está incrementada debido al aumento de los niveles plasmáticos de glucagón y al descenso en los niveles de insulina (Tilghman, S.M., et al. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1304-1308; Hopgood, M.F., et al. (1973) Biochem. J. 134, 445-453; Kioussis, D., et al. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4327-4332). Este fragmento del promotor de la PEPCK es capaz de dirigir la expresión del gen de la hormona de crecimiento bovino de manera regulada y específica de tejido en animales transgénicos no humanos (McGrane, M.M., et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 11443-11451; Short, M.K., et al. (1992) Mol. Cell. Biol. 12, 1007-1020; Eisenberger, C.L. (1992) Mol. Cell. Biol. 12, 1396-1403).

Por tanto, al fusionar este promotor de la PEPCK al gen de la insulina humana se producirá insulina en los tejidos donde se expresa el promotor de la PEPCK. En un animal diabético, se transcribirá el gen quimérico, pero, cuando ya se haya sintetizado suficiente, la propia insulina inhibirá el promotor de la PEPCK que dirige su expresión.

La invención tiene, pues, por objeto la creación de un gen quimérico PEPCK/ insulina. En este gen quimérico, el fragmento correspondiente al gen de la insulina conserva 170 pb de la zona flanqueante 5'. El gen quimérico PEPCK/ insulina contiene dos inicios de transcripción, uno correspondiente al promotor de la insulina, y el otro al promotor de la PEPCK.

Se trata en realidad de un promotor quimérico, al que la parte del promotor de la PEPCK le confiere especificidad de tejido (principalmente hígado, riñón, yeyuno y adiposo). Este gen quimérico se ha introducido en células de hepatoma en cultivo y en hepatocitos en cultivo primario mediante transfección transitoria, observándose que aparecía en estas células mRNA específico de insulina en hígado e insulina inmunoreactiva en el medio de cultivo.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de fusión de promotores o elementos reguladores de genes que permitan expresar la insulina en tipos celulares distintos de las células β del páncreas. En el gen quimérico, la parte del promotor de la PEPCK le confiere especificidad de tejido (principalmente hígado, riñón, yeyuno y adiposo).

Esta invención también tiene por objeto un vector de expresión que permite expresar insulina en células diferentes de las células β del páncreas, más particularmente, un vector plasmídico

pPCK/Ins y un vector retroviral vPCK/Ins. Estos vectores permiten la expresión del gen quimérico en células. También pueden utilizarse otros vectores de expresión virales (adenovirus, herpes virus, papillomavirus, etc.) o no virales.

Se han utilizado para infectar diferentes tipos de células en cultivo primario y líneas celulares establecidas (hepatoma, fibroblastos, mioblastos, preadipocitos). Las líneas celulares infectadas expresan insulina humana de manera predecible.

La invención tiene por objeto, además, un animal transgénico no humano que expresa el gen quimérico descrito anteriormente, así como un tipo celular originado a partir de este animal transgénico no humano.

En el laboratorio se han obtenido ratones transgénicos mediante la técnica de microinyección del gen quimérico a óvulos fecundados de ratón antes de la fusión de los dos pronúcleos femenino y masculino. Los animales obtenidos resultaron estar sanos y normoglucémicos, indicando que existe un buen control en la regulación del gen quimérico.

Otro objeto de la invención es el cromosoma del animal transgénico que contiene el gen quimérico anteriormente descrito.

Finalmente la invención tiene por objeto un gen quimérico del tipo descrito anteriormente, para la utilización en la terapia génica de la diabetes, más concretamente, para la utilización en la terapia génica de la diabetes en tejidos diferentes del páncreas en mamíferos, particularmente, en la especie humana.

También se refiere a un animal transgénico no humano del tipo descrito para su utilización en el desarrollo de protocolos de terapia génica.

Breve descripción de los dibujos

Para mejor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos referidos a ejemplos de realización.

En dichos dibujos, la figura 1 representa la construcción del gen quimérico PEPCK/Insulina a partir del plásmido pB7.0 y del gen de la insulina humana; la figura 2 representa la estructura del gen quimérico PEPCK/insulina; y la figura 3 representa el proceso de obtención del vector retroviral vPCK/Ins a partir del plásmido pPCK/Ins.

Ejemplos de realización

Para la construcción del gen quimérico PEPCK/insulina (Fig. 1) se partió del plásmido pB7.0 que contiene el gen completo de la PEPCK. La zona 5' flanqueante de este gen se obtuvo mediante digestión con los enzimas XbaI y BglII (fragmento -460 pb a +73 pb). A continuación, se subclonó este fragmento en el polylinker del plásmido pTZ18. Para ello se digirió este plásmido con XbaI y BglII y se ligó posteriormente el fragmento del promotor, a estas dianas. De esta manera se había subclonado el promotor de la PEPCK en pTZ18 y aún quedaban otras dianas en el polylinker que podían ser utilizadas posteriormente. A continuación se procedió a introducir el gen de la insulina humana. En este caso, se cortó el gen completo de la insulina con BglII y SphI y se obtuvo el fragmento -170 pb a +1561 pb (Bell, I.B., et al (1980) Nature 284, 26-32). El plásmido pTZ18, que contenía el pro-

motor de la PEPCK, se digirió con BglII, diana situada al final del promotor (extremo 3'), y con SphI, diana situada en el polylinker. Este plásmido linearizado se ligó con el fragmento BglII/SphI del gen de la insulina, y se obtuvo el gen quimérico PEPCK/insulina, subclonado en pTZ18 (Fig. 1). Este plásmido se nombró pPCK/Ins.

En la Fig. 2 se presenta, con detalle, la estructura del gen quimérico PEPCK/insulina. El promotor de la PEPCK (fragmento -460 pb a +73 pb) está fusionado a la zona 5' flanqueante del gen de la insulina humana (-170 pb a +1). Este fragmento del promotor de la insulina contiene los elementos que reconoce la maquinaria general de transcripción y un elemento de respuesta a AMPc (que induce la expresión del gen). Por tanto, en la región 5' flanqueante del gen quimérico se encontraban dos TATA box y dos inicios de la transcripción, uno al final del promotor de la PEPCK y otro al final del promotor de la insulina. El gen de la insulina humana contiene tres exones (dos codificantes, E1 y E2) y dos intrones (A y B). En posición 5' respecto al intrón A se encuentra el "cap site" y en 3' del último exón se encuentra la zona de polyadenilación (Fig. 2).

Este gen quimérico se ha introducido en células de hepatoma en cultivo y en hepatocitos en cultivo primario mediante transfección transitoria del plásmido pPCK/Ins, observándose que aparecía en estas células mRNA específico de insulina, e insulina inmunoreactiva en el medio de cultivo.

Una vez comprobado que el gen quimérico PEPCK/Insulina se expresaba de manera predecible procedimos a la obtención de un vector retroviral que contuviera el gen quimérico, y que, a su vez, se expresara de manera regulada y controlable por el propio producto de expresión, la insulina. Este es un requisito imprescindible para la elaboración de un vector de utilidad en terapia génica.

Tal como se esquematiza en la figura 3, para la construcción del vector retroviral se subclonó el fragmento EcoRI - HindIII del plásmido pPCK/Ins, que contiene el gen quimérico PEPCK/insulina completo, al plásmido p12N. Posteriormente se obtuvo el fragmento ClaI del p12NPCK/Ins, conteniendo el gen quimérico, y se introdujo en la diana ClaI del vector retroviral pLJ(-SV40) (derivado del vector parental pLJ (Korman, A.J., et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2150-2154)). El vector resultante, vPCK/Ins, contiene el gen quimérico PEPCK/insulina en orientación contraria al LTR 5' (promotor del retrovirus).

Este vector fue introducido en células psi-2 (Mann, R., (1983) Cell 33, 153-159) mediante precipitación con fosfato cálcico. Las células fueron expuestas al antibiótico de selección G418 a las 48 horas de la transfección, y las que fueron positivas a la integración del vector sobrevivieron al tóxico. Se mantuvieron estas células en cultivo durante un mes, y cuando llegaron a confluencia se recolectó el medio de cultivo, que contenía los viriones defectivos.

A continuación se expone brevemente el proceso de obtención de un animal transgénico no humano que expresa el gen quimérico PEPCK/Insulina.

Una vez verificado que el gen quimérico era funcional mediante transfección de células en cultivo, se procedió a microinyectar el gen quimérico (fragmento XbaI-SphI) a óvulos fecundados de ratón antes de la fusión de los dos pronúcleos femenino y masculino según el método descrito por Wagner, et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5016). Estos embriones eran posteriormente transferidos a una madre receptora. De los animales obtenidos se aisló DNA a partir de un fragmento de cola y a continuación, se analizó la presencia del transgen mediante Southern blot

y posterior hibridación con una sonda específica que contenía un fragmento del gen quimérico microinyectado. Con los animales transgénicos se han establecido colonias, en las que se ha analizado la expresión del gen quimérico. Así los animales transgénicos obtenidos expresan el transgen en los tejidos donde normalmente se expresa la PEPCK. Los animales obtenidos resultaron estar sanos y normoglucémicos, indicando por tanto que existe un buen control en la regulación del gen quimérico.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Gen quimérico que utiliza el gen o cDNA (ADN complementario) de la insulina dirigido por un promotor o fusión de promotores.

2. Gen quimérico según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que los promotores son regulables y son activados por el proceso diabético.

3. Gen quimérico según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que se obtiene por la fusión del gen de la insulina humana al promotor de la PEPCK (Penolpiruvato carboxiquinasa).

4. Procedimiento de fusión de promotores o elementos reguladores de genes que permitan expresar la insulina en cualquier tipo celular distinto de las células β del páncreas.

5. Vector de expresión que permite expresar insulina en células diferentes de las células β del páncreas.

6. Vector plasmídico pPCK/Ins según la reivindicación 5, que permite expresar insulina en células diferentes de las células β del páncreas.

7. Vector retroviral vPCK/Ins según la rei-

vindicación 5, que permite expresar insulina en células diferentes de las células β del páncreas.

8. Animal transgénico no humano que expresa el gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

9. Tipo celular originado a partir del animal transgénico no humano de la reivindicación 8.

10. Cromosoma del animal transgénico no humano de la reivindicación 8, que contiene el gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

11. Gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización en la terapia génica de la diabetes.

12. Gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización en la terapia génica de la diabetes en tejidos diferentes del páncreas en mamíferos.

13. Gen quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización en la terapia génica de la diabetes en tejidos diferentes del páncreas en la especie humana.

14. Animal transgénico no humano según la reivindicación 8, para su utilización en el desarrollo de protocolos de terapia génica.

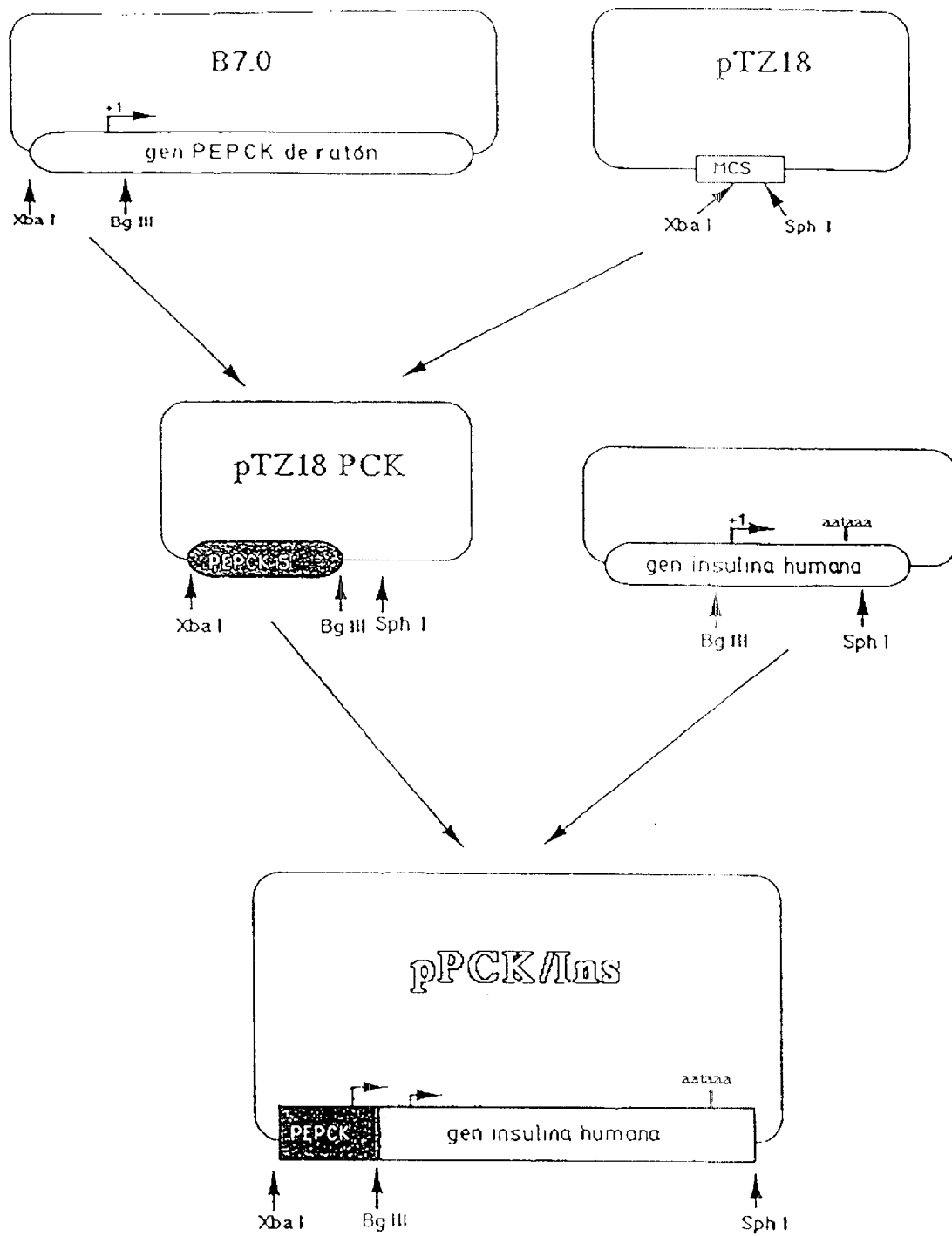
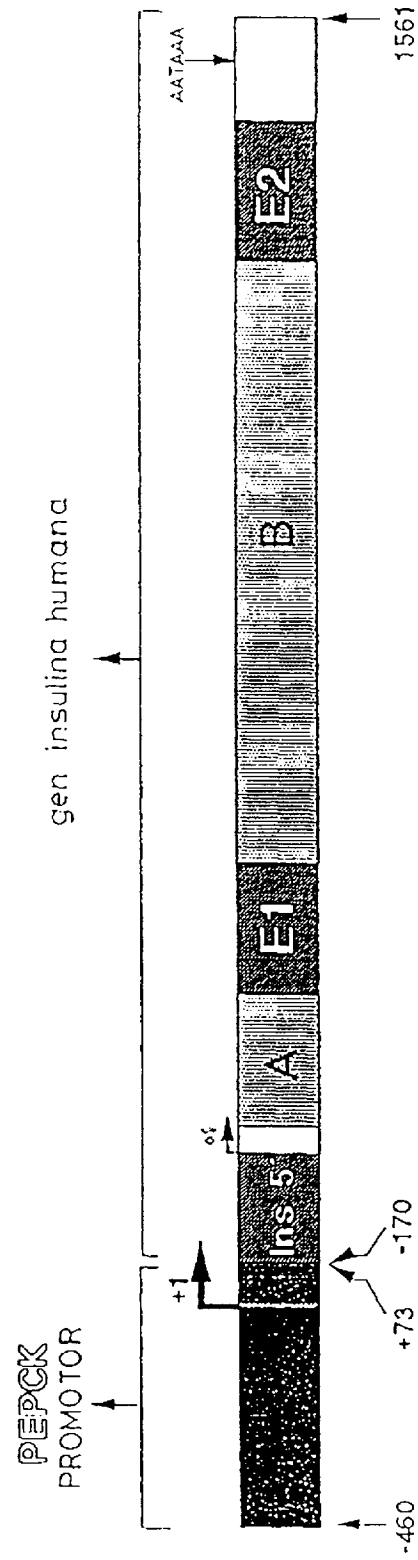


FIG. 1

FIG. 2



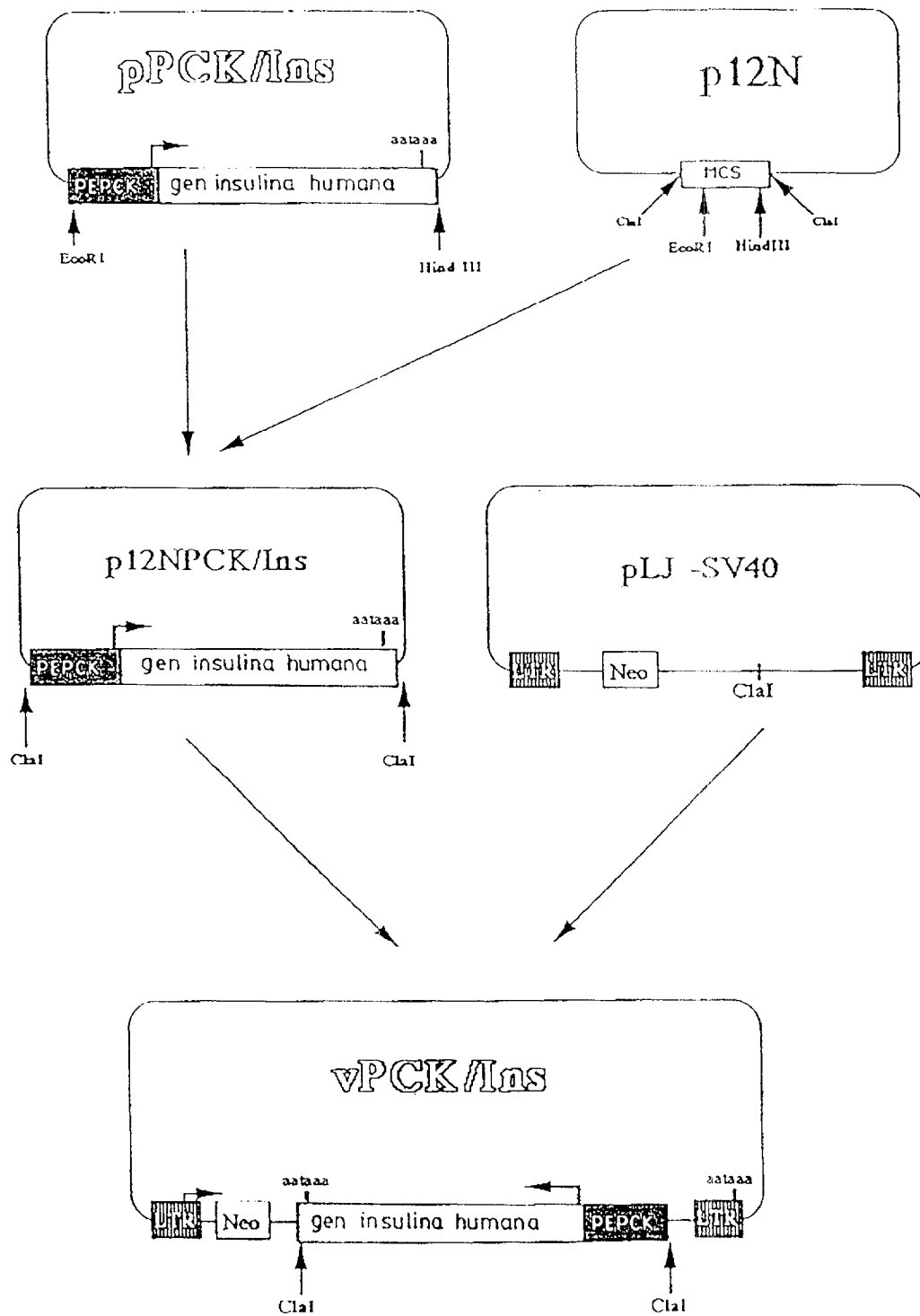


FIG.3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(11) ES 2 155 288

(21) N.º solicitud: 009201750

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.1992

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/17, 15/62, 15/85, 15/86, 5/10, A01K 67/027

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 8810304 A1 (EDISON ANIMAL BIOTECHNOLOGY CENTER) 29.12.1988, todo el documento.	1-14
A	WYNshaw-BORIS, A. et al. "Characterization of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Promoter-regulatory Region", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1986, Vol. 261, N° 21, páginas 9714-9720. Todo el documento.	1-14
A	O'BRIEN, R.M. et al. "Identification of a Sequence in the PEPCK Gene that mediates a negative effect of Insulin on Transcription", SCIENCE, 1990, Vol. 249, páginas 533-537. Todo el documento.	1-14
A	SHORT, M.K. et al. "Tissue-Specific, Developmental, Hormonal, and Dietary regulation of Rat Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-Human Growth Hormone Fusion Genes in Transgenic Mice", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1992, Vol. 12, N° 3, páginas 1007-1020. Todo el documento.	1-14
A	EISENBERGER, C.L. et al. "Differential Regulation of the Rat Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene Expression in Several Tissues of Transgenic Mice", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1992, Vol. 12, N° 3, páginas 1396-1403. Todo el documento.	1-14

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
28.03.2001

Examinador
G. González Limas

Página
1/1