



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 170 720**

② Número de solicitud: 200003056

⑤ Int. Cl.⁷: A01K 67/027

C12N 15/52

C12N 15/85

C12N 15/86

C12N 5/10

A61K 48/00

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **20.12.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2002**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.08.2002

⑰ Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA
DE BARCELONA
08193 Bellaterra, Barcelona, ES**

⑱ Inventor/es: **Bosch Tubert, Fátima;
Otaegui Goya, Pedro;
Riu Pastor, Efrén;
Ferrí Masferrer, Tura y
Mas Monteys, Alejandro**

⑳ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

㉔ Título: **Utilización conjunta del gen de la insulina y del gen de la glucoquinasa en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.**

㉖ Resumen:

Utilización conjunta del gen de la insulina y del gen de la glucoquinasa en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

La presente invención se refiere a un animal doble transgénico que expresa simultáneamente el gen o el cDNA (ADN complementario) de la insulina y el gen o el cDNA (ADN complementario) de la glucoquinasa dirigidos por un promotor o fusión de promotores que permiten expresar insulina y glucoquinasa en músculo y su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

La presente invención también se refiere a un vector o vectores de expresión que permite expresar conjuntamente dichos genes quiméricos en células musculares. Dichos vectores pueden ser un plásmido, un vector viral o un vector no viral.

ES 2 170 720 A1

DESCRIPCION

Utilización conjunta del gen de la insulina y del gen de la glucoquinasa en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un animal doble transgénico que expresa simultáneamente el gen o el cDNA (ADN complementario) de la insulina y el gen o el cDNA (ADN complementario) de la glucoquinasa dirigidos por un promotor o fusión de promotores que permiten expresar insulina y glucoquinasa en músculo y su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para 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. Mucho más común es la diabetes tipo 2 o diabetes mellitus no dependiente de insulina, que se manifiesta en individuos adultos, y que, al menos en los estadios iniciales, no se caracteriza por una deficiencia de insulina sino por la incapacidad de la hormona de actuar eficientemente en tejidos diana como músculo, hígado o tejido adiposo [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997). *Diabetes Care* 20, 1183-1197; McGarry, J.D. (1992). *Science* 258, 766-770; De Fronzo, R.A. (1997). *Diab. Rev.* 5, 177-269]. La incidencia de la diabetes tipo 2 en nuestro país es de alrededor de un 10% de la población mayor de 30 años, aunque muchos pacientes no son detectados hasta estadios muy avanzados de la enfermedad. Aproximadamente un 45% de los varones y un 70% de las mujeres con diabetes tipo 2 son obesos.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la diabetes mellitus dependiente de insulina (o de tipo 1) es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, 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 la hormona. 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 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, pacientes bajo este tratamiento intensivo con insulina presentan un elevado riesgo de hipoglucemia.

Todas las formas de diabetes se caracterizan por la presencia de hiperglucemia, la cual se ha postulado que es el principal factor responsable del desarrollo de patología microvascular en la retina y en el riñón y de las complicaciones neurológicas. Como consecuencia de esta patología microvascular, la diabetes mellitus es actualmente la causa principal de ceguera en adultos y la responsable de un tercio de los casos de fallo renal crónico. Los pacientes de diabetes tipo 2 presentan también un incremento del riesgo de desarrollo de aterosclerosis prematura y un aumento de mortalidad por infarto de miocardio, enfermedad cerebrovascular y vascular periférica [Pickup J.C. and Williams, G. (1994). *Chronic Complications of Diabetes*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK]. El ensayo realizado por el *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) ha mostrado que la terapia intensiva con insulina (tres o más inyecciones diarias) puede retrasar el inicio y la progresión de la retinopatía, nefropatía y neuropatía en pacientes de diabetes tipo 1 [The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986; American Diabetes Association (1993). *Diabetes* 42, 1555-1558]. Una mejora en el control de la glucemia podría reducir también las complicaciones microvasculares en pacientes de diabetes tipo 2. No obstante, la utilización de esta terapia en estos pacientes podría exacerbar las complicaciones macrovasculares, que son la principal causa de mortalidad en esta enfermedad. La hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina, muy comunes en pacientes de diabetes tipo 2, están asociadas a un incremento del riesgo de padecer hipertensión, enfermedad coronaria e infarto de miocardio, lo cual hace pensar en la posibilidad de que la insulina por sí sola tenga acciones aterogénicas. Además, este tipo de tratamiento no puede realizarse en todos los pacientes de diabetes tipo 1, especialmente en los muy jóvenes y en los viejos. Por otra parte, los pacientes bajo tratamiento con terapia intensiva con insulina presentan un riesgo muy elevado de desarrollar 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 postpandriales 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.

Debido a que la terapia sustitutiva 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.

La aproximación de la presente invención se basa en manipular genéticamente células musculares para que produzcan, simultáneamente, un tipo de proinsulina que pueda ser procesada completamente por las endoproteasas presentes en la vía de secreción constitutiva presente en el músculo, a fin de obtener insulina humana biológicamente activa, y el enzima fosforilador de glucosa glucoquinasa que permite un incremento en la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, lo que lleva a una disminución de la hiperglucemia diabética.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un animal transgénico no humano que expresa simultáneamente el gen o el cDNA de la insulina o derivados y el gen o el cDNA de la glucoquinasa dirigidos por un promotor o fusión de promotores que permite la expresión de estos genes en células musculares durante el proceso diabético.

La presente invención también se refiere a un vector o vectores de expresión que permite expresar conjuntamente los genes quiméricos descritos más arriba en células musculares. Dichos vectores pueden ser un plásmido, un vector viral o un vector no viral.

Cuando se trata de un vector viral éste puede ser un vector retrovítico, un vector adenovítico, un vector vírico adenoasociado, un vector vírico Sindbis, vector lentivítico, o un vector derivado del herpes virus.

Los animales de la presente invención expresan el gen quimérico que contiene el cDNA de la insulina humana mutada (Ins*) bajo control del promotor de la cadena ligera de la miosina (MLC) y el cDNA de la glucoquinasa de rata bajo control del mismo promotor MLC. El promotor MLC confiere expresión constitutiva en músculo esquelético y en miotubos en cultivo [Donoghue et al. (1988) *Genes Dev.* 2, 1779-1790; Rosenthal et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7780-7784]. El cDNA de la insulina humana se obtuvo por digestión del plásmido pP2.4Insm [Gros et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 8, 2249-2259] y, a continuación, se insertó en un plásmido que contenía el promotor y secuencia reguladora del gen de la MLC.

También se considera objeto de la presente invención una célula muscular que exprese al mismo tiempo los genes quiméricos descritos en la invención. En dicha célula se ha introducido dichos genes quiméricos mediante el vector descrito, para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

Otro objetivo de la presente invención es un dispositivo que contenga las células musculares descritas más arriba, las cuales se encuentran empaquetadas.

Es objeto de la presente invención la utilización conjunta de los genes quiméricos descritos anteriormente para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus, así como la utilización del vector o vectores de expresión de la invención para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.

Los animales dobles transgénicos de la presente invención se obtuvieron por cruzamiento de animales transgénicos que expresan un gen quimérico que comprende el gen o cDNA (ADN complementario) de la insulina humana dirigido por un promotor o fusión de promotores y de animales transgénicos que expresan el gen o cDNA (ADN complementario) de la glucoquinasa de rata dirigido por un promotor o fusión de promotores. En particular, dicho animal transgénico es un ratón.

Con el fin de estudiar los efectos de la producción conjunta de insulina y de glucoquinasa por parte del músculo esquelético, se obtuvieron ratones dobles transgénicos que expresaban simultáneamente el gen quimérico MLC/Ins*, que contenía el cDNA de la insulina humana mutada (Ins*) bajo el control del promotor de la cadena ligera de la miosina (MLC), y el gen quimérico MLC/GK, que contenía el cDNA de la glucoquinasa de rata (GK) bajo el control del mismo promotor MLC.

Después del sacrificio de los animales, se analizó la expresión de los genes quiméricos. Así, se determinó la presencia de mRNA de insulina y de glucoquinasa en el músculo esquelético de los ratones dobles transgénicos. Los resultados indicaban que los ratones dobles transgénicos presentaban las dos bandas correspondientes al mRNA de insulina y de glucoquinasa y que la expresión de ambos genes quiméricos de forma constitutiva por parte del músculo esquelético era compatible con la supervivencia normal del animal. A los 3 meses de edad, los ratones dobles transgénicos presentaban unos niveles de glucemia similares a los de los ratones control.

Se realizó un test de tolerancia a la glucosa para estudiar si la expresión simultánea de insulina y glucoquinasa en el músculo esquelético podía afectar el metabolismo de la glucosa *in vivo*. Los ratones dobles transgénicos presentaban unos niveles de glucosa más bajos que los controles a lo largo de todo el test, lo que indicaba que la expresión conjunta de insulina y glucoquinasa incrementaba la captación de glucosa.

Posteriormente, se analizó el comportamiento de dichos ratones dobles transgénicos en condiciones de hiperglucemia. Para ello, se indujo, tanto en ratones control como en ratones dobles transgénicos, diabetes experimental mediante la inyección durante cinco días consecutivos del tóxico estreptozotocina (Stz) por vía intraperitoneal. A continuación se analizó la expresión de los genes quiméricos en el músculo esquelético de los animales dobles transgénicos diabéticos, pudiéndose comprobar que dichos animales mantenían la expresión de insulina y glucoquinasa en estas condiciones.

A las 3 semanas de haber iniciado el tratamiento con Stz, los ratones control mostraban una gran elevación de la concentración de glucosa, mientras que los ratones dobles transgénicos sólo presentaban un ligero incremento en la concentración de glucosa circulante. Por tanto, la expresión simultánea de insulina y glucoquinasa en el músculo esquelético era capaz de contrarrestar la hiperglucemia diabética.

Por otra parte, se llevaron a cabo un test de tolerancia a la insulina y un test de tolerancia a la glucosa en los animales diabéticos. En el primero de ellos, los ratones dobles transgénicos mostraron una respuesta más rápida y más significativa respecto a los controles tratados con Stz y similar a la de los ratones control no tratados, mientras que en el segundo los ratones dobles transgénicos tratados con Stz mostraron, a lo largo del test, unos niveles de glucosa inferiores a los de los controles tratados con Stz, indicando que dichos animales dobles transgénicos tenían una mayor capacidad de captación de glucosa.

También se determinó la concentración intramuscular de glucosa-6-fosfato, glucógeno y lactato. La producción de insulina y glucoquinasa por parte del músculo esquelético después del tratamiento con Stz en los ratones dobles transgénicos favorecía una mayor utilización y un mayor almacenamiento de la glucosa intramuscular respecto a los ratones control diabéticos.

Paralelamente, se determinaron los niveles de diferentes metabolitos relacionados con el metabolismo hepático de la glucosa en los ratones tratados con Stz. Los ratones control mostraron una marcada disminución en la concentración de glucosa-6-fosfato y de glucógeno. Por el contrario, los ratones dobles transgénicos mostraron una normalización de dichos parámetros.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen son ilustrativos y no limitantes de la invención.

60

Ejemplo I

Ratón transgénico que expresa el cDNA de la insulina humana mutada (Ins) y el cDNA de la glucoquinasa de rata en músculo esquelético*

5

I.1. *Obtención del ratón transgénico*

El ratón transgénico se obtuvo a partir del cruzamiento de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico que contiene el cDNA de la insulina humana mutada (Ins*) bajo control del promotor de la cadena ligera de la miosina (MLC) y de ratones transgénicos que expresan el cDNA de la glucoquinasa de rata bajo control del mismo promotor MLC.

A las 3 semanas después del nacimiento se analizó la presencia de los dos transgenes 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 los enzimas de restricción *Hind* III y *Eco*RI. Dichas digestiones dan como resultado una banda de 1.9 Kb., correspondiente al gen quimérico promotor MLC-insulina mutada y una banda de 2.3 Kb. que corresponde al gen quimérico promotor MLC-glucoquinasa. Así pues, los animales dobles transgénicos son aquellos que presentan los dos fragmentos característicos.

20

I.2. *Análisis de la expresión del transgén*

Se pudo comprobar la expresión de los genes quiméricos en el músculo de los ratones transgénicos mediante el análisis del RNA total extraído del músculo esquelético de los animales control y dobles transgénicos. El RNA total se obtuvo empleando el método del isotiocianato [Chirwin et al. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299] y, a continuación, se separaron muestras de RNA (30 μ g) en un gel de electroforesis de agarosa al 1% que contenía formaldehído 2,2 M y se transfirió (*Northern blot*) a una membrana para su hibridación, empleándose como sondas el cDNA de la insulina humana mutada y el cDNA de la glucoquinasa de rata, obtenidas ambas mediante digestión con *Eco*RI. Para ello, se marcaron dichas sondas con [α -³²P]dCTP mediante el método de *oligoprimering* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La actividad de las sondas fue de aproximadamente 10⁹ cpm/ μ g DNA. Las membranas de transferencia se pusieron en contacto con películas Kodak XAR-5. La presencia de hibridación correspondiente al RNA de la insulina y al RNA de la glucoquinasa en las muestras de RNA obtenidas a partir de los músculos esqueléticos de los ratones dobles transgénicos indica la expresión de los dos genes quiméricos en dicho tejido, no observándose ninguna de las dos bandas en las muestras procedentes de los músculos de los ratones control.

35

I.3. *Test de tolerancia a la glucosa*

El test de tolerancia a la glucosa es una de las pruebas utilizadas en clínica para el diagnóstico de resistencia a la insulina. Con el fin de determinar si la expresión constitutiva de insulina y de glucoquinasa a nivel muscular podría alterar el metabolismo de la glucosa *in vivo*, se realizó un test de tolerancia a la glucosa en condiciones de ayuno en ratones controles y dobles transgénicos de 3 a 4 meses de edad. No se observaron diferencias en el nivel basal de glucemia de ambos grupos. A lo largo del test se observó que los niveles de glucemia de los ratones dobles transgénicos eran más bajos que los del grupo de ratones control, indicando que la producción de insulina y de glucoquinasa por parte del músculo esquelético incrementaba la captación de glucosa, mejorando de esta manera la respuesta frente a cambios en la concentración de glucosa.

40

I.4. *Obtención de ratones diabéticos*

Con el fin de analizar si la expresión simultánea de insulina y glucoquinasa en el músculo de los ratones dobles transgénicos era capaz de contrarrestar la hiperglucemia del proceso diabético, se indujo diabetes experimental a los ratones control y dobles transgénicos mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina (Stz) disuelta en una solución de tampón citrato sódico 10 mM con 0.9% NaCl pH 4,5 durante cinco días consecutivos, a una dosis de 45 mg Stz/Kg de peso vivo. Se confirmó la diabetes mediante la medida de los niveles sanguíneos de glucosa.

55

I.5. *Análisis de los niveles de glucosa*

60

La concentración de glucosa se determinó mediante el sistema Glucometer EliteTM de Bayer.

Se analizaron los niveles de glucosa en sangre de los ratones control y dobles transgénicos tratados con Stz y de los ratones control no tratados. A las 3 semanas de iniciar el tratamiento con Stz, los ratones control habían incrementado 4 veces sus niveles de glucosa en sangre, presentando una marcada hiperglucemia (578 ± 15 mg/dl), mientras que los ratones dobles transgénicos presentaban unos niveles de glucosa circulante próximos a la normoglucemia, observándose únicamente un aumento de 1.5 veces respecto a los ratones control sin tratar (231 ± 35 mg/dl frente a 150 ± 5 mg/dl). A lo largo de los tres meses de duración del experimento, se observó que en los ratones dobles transgénicos los niveles de glucosa en sangre se mantenían constantes, sin tendencia a incrementar, mientras que en los ratones control, los niveles de glucosa en sangre continuaban aumentando, presentando a las 6 semanas de haber iniciado el tratamiento con Stz unos niveles de glucosa superiores al límite de detección del analizador utilizado (>600 mg/dl). Esto indicaba que la expresión simultánea de insulina y de glucoquinasa en los ratones dobles transgénicos llevaba a un aumento en la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, evitando así el desarrollo de hiperglucemia.

1.6. *Test de tolerancia a la insulina en ratones tratados con Stz*

Con el fin de analizar si los animales dobles transgénicos tratados con Stz podrían ser más sensibles a la insulina que los animales control tratados con Stz, se realizó un test de tolerancia a la insulina 21 días después de la administración de la droga. Se inyectaron 0.75 U de insulina soluble por Kg de peso a ratones control sanos y a ratones control y dobles transgénicos tratados con Stz y se determinó la glucemia a intervalos regulares de tiempo.

La respuesta hipoglucémica a la administración de la hormona observada en los ratones dobles transgénicos fue más rápida y más significativa respecto a la de los ratones control tratados y similar a la observada en los ratones control no tratados con Stz. A los 15 minutos de la administración de insulina, la glucemia basal de los ratones dobles transgénicos ya se había reducido un 20%, mientras que en los ratones control diabéticos no se observó una reducción significativa en los valores de glucemia hasta 30 minutos después de la administración de la hormona, observándose sólo una disminución de aproximadamente un 10% respecto a su nivel basal. Este efecto fue mayor a los 60 minutos, ya que los ratones dobles transgénicos presentaban una disminución cercana al 50% (de 232 ± 43 mg/dl a 99 ± 21 mg/dl) alcanzando valores normoglucémicos, mientras que los ratones control continuaban siendo marcadamente hiperglucémicos, con una reducción de un 20% (de 593 ± 7 mg/dl a 521 ± 28 mg/dl).

1.7. *Test de tolerancia a la glucosa en ratones tratados con Stz*

Se llevó a cabo un test de tolerancia a la glucosa en condiciones de ayuno en ratones control y dobles transgénicos tres meses después de la administración de Stz. Se inyectó 1 mg de glucosa por g de peso vivo.

Se observaban diferencias significativas ya en los niveles basales de glucemia. Los ratones control tratados con Stz presentaban unos niveles de glucemia en ayuno característicos de un estado diabético (326 ± 14 mg/dl), mientras que en los ratones dobles transgénicos tratados con Stz los niveles de glucosa en sangre no diferían de los observados en los ratones control sin tratar (115 ± 4 mg/dl vs 102 ± 12 mg/dl). A los 15 minutos de la administración de glucosa se observó un incremento en la glucemia de todos los grupos. No obstante, los incrementos observados en los niveles de glucosa de los ratones control y dobles transgénicos tratados con Stz fueron superiores a los alcanzados en los ratones control sin tratar. Por otra parte, durante el desarrollo del test se observó que tanto los ratones control sin tratar como los ratones dobles transgénicos tratados con Stz recuperaban al cabo de 3 horas los niveles basales de glucemia. Por contra, los ratones control tratados con Stz no recuperaron los niveles basales.

1.8. *Parámetros séricos en ratones tratados con Stz*

La insulina se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) con el kit comercial de INSULIN-CT de CIS Biointernational, Francia.

Tres meses después de la administración de Stz se analizaron los niveles séricos de insulina, glucosa, triglicéridos y proteína en los ratones control sin tratar y en los ratones control y dobles transgénicos tratados con Stz. En los ratones control tratados con Stz se observó una disminución en la insulinemia de aproximadamente un 50% respecto a los niveles observados en los ratones control sin tratar, mientras que en los ratones dobles transgénicos tratados con Stz la insulinemia se mantenía normal. Debido a la disminución de los niveles de insulina en sangre los ratones control tratados con Stz presentaban una marcada hiperglucemia, así como unos niveles de triglicéridos y de proteína alterados (Tabla 1). En

los ratones dobles transgénicos, a pesar de presentar una insulinemia normal, se observó que los niveles de glucosa en sangre estaban ligeramente incrementados (Tabla 1), posiblemente debido a que parte de la insulina secretada por parte del músculo esquelético no era insulina madura, sino proinsulina. No obstante, los niveles de triglicéridos y proteínas observados en los ratones dobles transgénicos estaban normalizados (Tabla 1)

TABLA 1
Determinación de parámetros séricos

	Insulina (μ U/ml)	Glucosa (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
Control	35 ± 3	138 ± 9	98 ± 9
Control Stz	19 ± 1	> 600	179 ± 22
Transg. Stz	34 ± 1	244 ± 41	119 ± 17

I.9. Expresión de los genes quiméricos durante el estado diabético

Para analizar la expresión de los genes quiméricos MLC/Insulina y MLC/Glucoquinasa en músculo esquelético de animales tratados con Stz, se utilizaron 15 μ g de RNA total de músculo de ratones control sin tratar y ratones control y dobles transgénicos a los 3 meses del tratamiento con Stz. Al realizar un análisis por Northern Blot, se pudo observar que el músculo esquelético de los ratones dobles transgénicos seguía manteniendo la expresión de los genes quiméricos después de la administración de Stz.

I.10. Análisis de parámetros musculares

Se obtuvieron muestras de músculo esquelético de ratones control y dobles transgénicos tanto tratados como no tratados con Stz. Se determinaron los niveles intracelulares de glucosa-6-fosfato mediante un método espectrofotométrico [Michal, G. (1981) *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. VI, 185-190], utilizando el autoanalizador Cobas Bio (Roche). Asimismo, se determinaron los niveles intracelulares de glucógeno mediante el método de la α -amiloglucosidasa [Keppler, D. and Decker, K. (1981) *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. VI, 11-18]. La glucosa liberada por el enzima se determinó espectrofotométricamente con el autoanalizador Cobas Bio, utilizando el equipo comercial Gluco-Quant de Boehringer Mannheim. Por otra parte, los niveles de lactato fueron determinados mediante el método de la lactato deshidrogenasa (Boehringer Mannheim).

Como se puede observar en la Tabla 2, los ratones dobles transgénicos tratados con Stz presentaban unos valores de los distintos metabolitos iguales o superiores a los observados en los ratones control sin tratar, mientras que en los ratones control tratados con Stz los niveles de metabolitos estaban alterados, lo que indica que la expresión de insulina y glucoquinasa por parte del músculo esquelético favorecería el restablecimiento de las vías metabólicas implicadas en la utilización y acumulación de glucosa.

TABLA 2
Determinación de metabolitos en músculo esquelético

	Glucosa-6-fosfato (nmol/g tejido)	Lactato (mg/g tejido)	Glucógeno (mg/g tejido)
Control	601 ± 49	18.9 ± 0.8	2.3 ± 0.2
Control Stz	409 ± 47	17.1 ± 1.67	1.4 ± 0.3
Transg. Stz	665 ± 16	19.9 ± 1.1	2.1 ± 0.2

I.11. Análisis de los parámetros hepáticos

Para determinar si la expresión de insulina por parte del músculo esquelético podía tener efecto sobre otros tejidos del organismo, se analizó la utilización y acumulación de glucosa en el hígado de los ratones tratados con Stz. Se obtuvieron muestras de tejido hepático de ratones control tanto tratados como no

ES 2 170 720 A1

tratados con Stz y dobles transgénicos tratados con Stz. Las concentraciones de glucosa-6-fosfato y de glucógeno se determinaron siguiendo los mismos métodos descritos anteriormente.

5 Como se observa en la Tabla 3, los ratones dobles transgénicos tratados con Stz mostraban unos niveles de metabolitos relacionados con la captación y utilización de glucosa normalizados, mientras que en los ratones control tratados con Stz dichos metabolitos estaban alterados. Esto indicaba que la expresión de insulina por parte del músculo esquelético favorecía el restablecimiento de las vías metabólicas implicadas en la utilización y acumulación de glucosa a nivel hepático.

10 TABLA 3

Determinación de metabolitos hepáticos

	Glucosa-6-fosfato (nmol/g tejido)	Glucógeno (mg/g tejido)
Control	1300 ± 238	74 ± 3
Control Stz	870 ± 115	51 ± 7
15 Transg. Stz	1200 ± 87	70 ± 6

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Animal transgénico no humano que expresa simultáneamente el gen o el cDNA de la insulina o derivados dirigido por un promotor o fusión de promotores que permite la expresión de insulina o derivados de la insulina en células musculares y el gen o el cDNA de la glucoquinasa dirigido por un promotor o fusión de promotores que permite la expresión de glucoquinasa en células musculares.
2. Vector o vectores de expresión que permiten expresar conjuntamente los genes quiméricos según la reivindicación 1 en células musculares.
3. Vector o vectores de expresión según la reivindicación 2, siendo estos vectores un plásmido.
4. Vector o vectores de expresión según la reivindicación 2, siendo estos vectores un vector viral.
5. Vector o vectores de expresión según la reivindicación 2, siendo estos vectores un vector no viral.
6. Vector viral según la reivindicación 4, siendo este vector un vector retrovítico, un vector adenovítico, un vector vírico adenoasociado, un vector vírico Sindbis, un vector lentivítico, o un vector derivado del herpes virus.
7. Célula muscular que expresa conjuntamente los genes quiméricos según la reivindicación 1.
8. Célula muscular según la reivindicación 7, en la que se han introducido los genes quiméricos mediante un vector según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.
9. Dispositivo que contiene células musculares según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 empaquetadas.
10. Utilización de los genes quiméricos según la reivindicación 1 para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.
11. Utilización de un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 para su utilización en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.
12. Utilización de un dispositivo según la reivindicación 9 para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para la diabetes mellitus.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A01K 67/027, C12N 15/52, 15/85, 15/86, 5/10, A61K 48/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 9717994 A (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA) 22.05.1997, página 5, línea 9 - página 33, línea 15.	1-12
Y	WO 9525169 A (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA) 21.09.1995, página 2, línea 15 - página 5, línea 25.	1-12
Y	WO 0031267 A (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA) 02.06.2000, página 3, líneas 9-30; página 6, líneas 2-9; página 7, líneas 22,23.	2-12
Y	WO 9500644 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 05.01.1995, página 7, línea 20 - página 53, línea 15.	2-12
A	LEE et al. "Myosin Light Chain-2 Luciferase Transgenic Mice Reveal Distinct Regulatory Programs for Cardiac and Skeletal Muscle-specific Expression of a Single Contractile Protein Gene". 1992. J. Biol. Chem., Vol. 267, páginas 15875-15885.	1-12

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

11.03.2002

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1