

# DIABETIS AVUI



associació  
catalana  
de diabetis

## TERÀPIA GÈNICA DE LA DIABETIS MELLITUS.

EDUARD AYUSO

Investigador

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA



Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica

Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra.



93 581 41 92



[eduard.ayuso@uab.cat](mailto:eduard.ayuso@uab.cat)

## 1.- Introducció

La diabetis mellitus és una malaltia metabòlica causada per la deficiència o la manca d'acció de la insulina, una hormona produïda a les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees. La diabetis de tipus 1 (DT1) és causada per una *destrucció autoimmunitària* de les cèl·lules  $\beta$ , i per tant, per una deficiència total d'insulina. Per contra, la diabetis de tipus 2 (DT2) no és una malaltia autoimmunitària, però les cèl·lules  $\beta$  pateixen alteracions funcionals que afecten a la producció d'insulina. A més, els teixits perifèrics (com per exemple el fetge o el múscul esquelètic) es tornen insensibles a l'acció de l'hormona, causant el que es coneix com a *resistència a la insulina*. En tots el casos, el símptoma comú de la malaltia és l'increment de la glucosa a la sang o hiperglucèmia.

L'objectiu de la teràpia per la diabetis és el manteniment de la normoglucèmia, tant en períodes de dejú com en estat postpandrial. L'hiperglucèmia crònica es la causa de les complicacions secundàries de la malaltia, mentre que episodis hipoglucèmics són inclús més perillosos, ja que poden arribar a ser letals. El tractament estàndard de la malaltia es basa en la injecció subcutània de l'hormona, però en la majoria de casos no s'eviten les complicacions secundàries, i a més, els pacients estan exposats al risc d'hipoglucèmia (1). Això és degut a que l'alliberació de la insulina no està regulada pel nivell de glucèmia del pacient. Per aquest motiu, el tractament actual és insatisfactori i es continua la recerca de noves teràpies per a la malaltia.

Un dels avenços en el tractament de la malaltia és la utilització de l'anomenat pàncrees artificial, que es tracta d'un dispositiu electrònic d'alliberació d'insulina controlat per un sensor de glucosa implantat subcutàniament en el pacient. Tot i nombrosos estudis clínics, aquests aparells no estan essent emprats de forma rutinària en els pacients. També a nivell clínic, s'ha estudiat amb força èxit el transplantament d'illots pancreàtics (revisat a (2)). Aquesta tècnica consisteix en obtenir els illots de cadàvers humans i trasplantar-los en el fetge dels receptors a través de la vena porta. Per evitar el rebuig, els pacients s'han de tractar amb immunosupressió de per vida. L'avantatge principal d'aquesta teràpia és el bon control de glucèmia ja que la secreció d'insulina està perfectament regulada per la glucosa. No obstant, existeixen nombrosos desavantatges que han restat entusiasme a aquesta aproximació, com per exemple la poca disponibilitat d'illots humans, complicacions degudes a la immunosupressió permanent, i la pèrdua de

l'efecte terapèutic al cap de pocs anys del trasplantament (3). En aquest camp, un gran nombre d'investigacions s'han centrat en la recerca de fonts alternatives d'illots pancreàtics o cèl·lules  $\beta$ , incloent l'ús d'illots porcins (xenotrasplantaments) o la formació de cèl·lules productores d'insulina *in vitro* a partir de cèl·lules progenitores embrionàries (ESC) o adultes (com per exemple les cèl·lules troncales pluripotencials induïdes o iPS). La utilització de cèl·lules iPS derivades del propi pacient podria resoldre el problema de rebuig del postrasplantament, però encara queda força camí per recórrer per aconseguir crear "verdaderes" cèl·lules  $\beta$  a partir de iPS (4).

La teràpia gènica en els últims 30 anys ha anat guanyant terreny en el camp científic i clínic, ja que ofereix la possibilitat de tractar, curar o prevenir tant malalties monogèniques com poligèniques, incloent la diabetis. L'objectiu d'aquesta revisió és descriure les eines i tècniques emprades en el camp de la teràpia gènica, així com la seva utilització pel tractament i/o la prevenció de la diabetis. Cal destacar que la majoria d'aquestes aproximacions terapèutiques es centren en la DT1.

## 2.- Teràpia Gènica

En termes generals, la teràpia gènica implica la transferència de material genètic als pacients amb un objectiu terapèutic o preventiu. La finalitat d'aquesta manipulació genètica és aconseguir que les cèl·lules del pacient sintetitzin el producte codificat per aquest material genètic. Tot i que en la majoria de casos el producte serà una proteïna, també és possible que el producte sigui un RNA o un oligonucleòtid no codificant, amb la funció de regular l'expressió d'altres gens a dins de la cèl·lula.

Un fet comú en totes les estratègies de teràpia gènica és la necessitat de transferir el material genètic a les cèl·lules del pacient d'una manera eficient i segura. Els agents utilitzats per a realitzar aquesta tasca són els anomenats **vectors**. A grans trets aquests vectors es classifiquen en dos grans categories: els *virals* i els *no virals* (revisat a (5)).

A més, cal dir que existeixen dos tipus d'aproximacions de teràpia gènica: 1) l'anomenada **teràpia gènica *in vivo***, en la que el vector es transfereix directament al pacient, i 2) l'anomenada **teràpia gènica *ex vivo***, que consisteix en extraure cèl·lules del pacient, transduir-les al laboratori amb el vector i reimplantar-les al pacient.

## 2.1. Vectors no virals

La forma més simple de vectors no virals són els plasmidis, que contenen el gen d'interès, un promotor i una senyal de poliadenilació. No obstant, la transferència gènica mediada per aquests vectors és de baixa eficiència i transitòria, principalment degut a la baixa capacitat de les cèl·lules per captar el DNA. Per incrementar l'eficiència, el DNA plasmídic es pot acomplexar amb polímers catiònics que neutralitzen les càrregues negatives dels grups fosfats del DNA i incrementen així la captació, ja que impedeixen l'entrada a l'endosoma i la degradació d'aquest DNA per nucleases endosomals. Els polímers més utilitzats freqüentment són els **liposomes catiònics**.

Una estratègia alternativa, i que ha demostrat elevada eficiència en certs teixits, és l'aplicació de polsos elèctrics *in vivo* després de la injecció del DNA plasmídic. Aquesta aproximació s'anomena **electroporació** i es basa en la formació de porus a la membrana cel·lular -d'una manera transitòria- que permetria l'entrada de macromolècules al citoplasma. A més, l'aplicació de camps elèctrics té un efecte electroforètic sobre el DNA afavorint l'entrada a la cèl·lula (6).

De forma similar, es poden utilitzar ultrasons per incrementar l'incorporació de DNA dins les cèl·lules; procés anomenat **sonoporació** (7). Aquests ultrasons es poden aplicar directament o bé en combinació amb un contrast ecogràfic constituït per microbombolles de gas (8).

Per últim, també s'ha descrit una forma eficient de transferir material genètic al fetge mitjançant vectors no virals que consisteix en la injecció en pocs segons d'un gran volum de DNA plasmídic en solució. Aquesta sobrecàrrega hidrodinàmica provoca una distensió hepàtica i obertura de les fenestracions dels sinusoides que afavoreix l'entrada del DNA dins dels hepatòcits i altres cèl·lules hepàtiques, i per aquest motiu es coneix com a **mètode hidrodinàmic** (9).

## 2.2. Vectors virals

Els vectors virals es basen en la utilització de virus modificats, i aprofiten la capacitat natural dels virus per infectar les cèl·lules i transferir el seu material genètic dins del nucli. Per aquest motiu, no és estrany que, en termes generals, els vectors virals siguin més eficients *in vivo* que els vectors no virals. Per a generar vectors a partir de virus salvatges es modifica el seu genoma de manera que s'eliminen les seves capacitats de replicar i de causar malaltia, però es mantenen intactes les seves capacitats d'entrar a les cèl·lules i transportar el DNA fins el nucli. A més, l'eliminació d'aquests gens virals en el genoma s'aprofita per crear espai de clonatge

pel casset terapèutic (Figura 1). Així, els vectors virals són capaços d'entrar a la cèl·lula i transportar el material genètic d'interès fins al nucli, però llavors el cicle viral és avortat i s'evita la seva replicació. En teràpia gènica es coneix aquest fenomen com a **transducció**, a diferència del terme infecció, utilitzat en virologia per descriure l'entrada del virus salvatge a la cèl·lula i la inherent replicació del mateix. Els vectors virals més utilitzats en teràpia gènica deriven dels retrovirus, adenovirus o dels virus adeno-associats.

### 2.2.1. Vectors retrovirals

Històricament, aquests vectors han estat àmpliament utilitzats en assaigs clínics de teràpia gènica. En particular, els vectors derivats del virus de la leucèmia murina de Moloney han estat molt utilitzats en teràpia gènica *ex vivo*. Aquests vectors només tenen la capacitat de transduir cèl·lules en replicació, el seu genoma de RNA és retrotranscrit després d'entrar a la cèl·lula i el DNA resultant s'integra en el genoma cel·lular, de manera que la manipulació genètica és permanent i té la capacitat de transferir-se a les cèl·lules "filles". La manipulació de cèl·lules hematopoiètiques *ex vivo* pel tractament d'immunodeficiències severes ha estat un dels primers èxits de la teràpia gènica, aconseguint curar completament els coneguts com "nens bombolla" (10, 11). Però pocs anys més tard, aquest èxit es va veure afectat per una de les complicacions d'aquesta teràpia, la mutagènesi insercional. Alguns dels pacients tractats amb aquests vectors derivats del virus de Moloney van desenvolupar leucèmies, i un cop analitzats aquests clons leucèmics es va determinar que la causa havia estat la inserció del DNA a prop d'un oncogen (12).

Els vectors retrovirals derivats del virus de la immunodeficiència humana (VIH), anomenats **lentivirus**, han anat guanyant interès ja que, a diferència dels vectors derivats de virus de Moloney, tenen la capacitat tant de transduir cèl·lules en divisió com cèl·lules quiescents. Aquesta característica fa que es puguin utilitzar tant per teràpia gènica *ex vivo* com per teràpia gènica *in vivo*. La bioseguretat dels vectors derivats del VIH ha estat sempre un tema de preocupació, però l'última generació d'aquests vectors, completament delecionats de gens patògens i amb inactivacions de les regions promotores endògenes (LTRs), han demostrat una elevada seguretat i ja s'estan utilitzant en assaigs clínics amb resultats molt prometedors (Figura 1)(13). A més, els estudis preliminars sobre la potencial mutagènesi insercional semblen indicar un risc molt més baix dels vectors lentivirals respecte als vectors derivats del virus de Moloney (13).

També cal destacar l'eficiència d'aquests vectors lentivirals per transduir de forma permanent el fetge *in vivo* per via endovenosa (14) o també el cervell mitjançant injecció intraparenquimal –aquesta última aproximació ja està en fases clíniques- (identificador clinicaltrials.gov: NCT00627588).

### 2.2.2. Vectors adenovirals

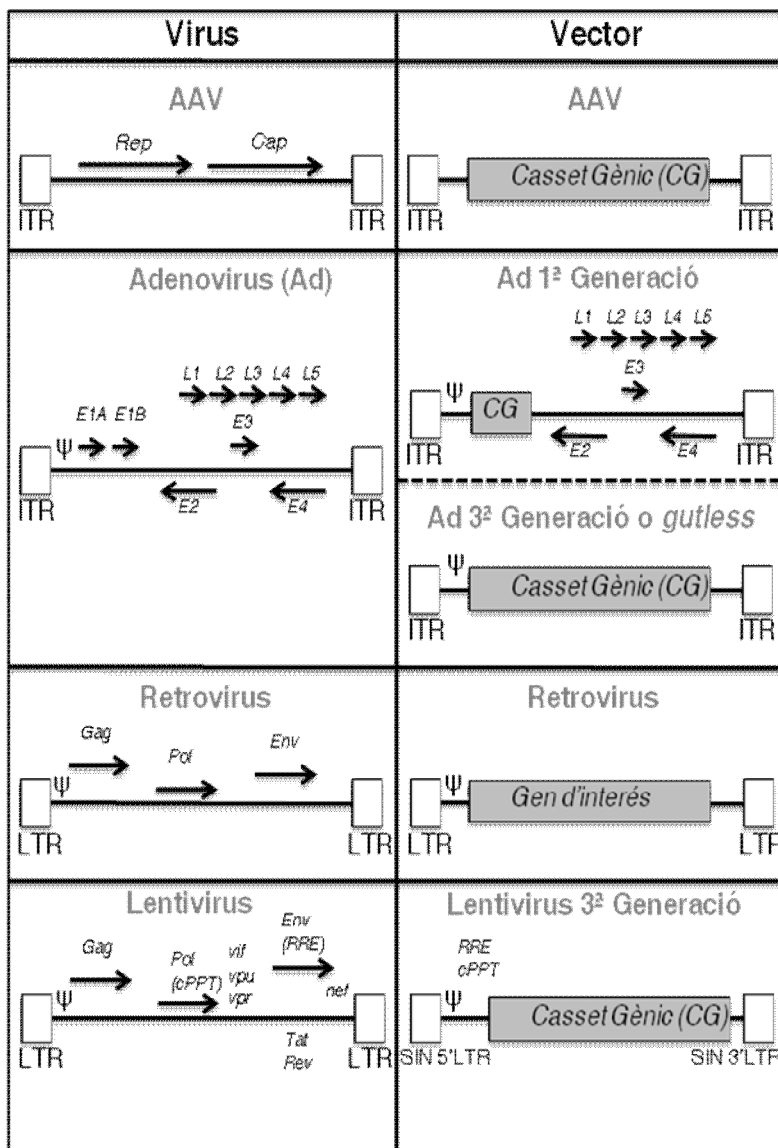
Els vectors adenovirals deriven dels adenovirus, i els més freqüentment utilitzats en teràpia gènica són adenovirus humans de serotip 5 o serotip 2. Els vectors adenovirals no s'integren, o ho fan amb extrema ineficiència, en el genoma de la cèl·lula hoste, son àmpliament utilitzats per la seva eficiència per transduir cèl·lules quiescents o en divisió, presenten nivells d'expressió del gen d'interès molt elevats, ampli tropisme cel·lular i facilitat de producció al laboratori. Totes aquestes característiques el fan un vector ideal per a la teràpia *in vivo*, no obstant, els vectors de primera generació indueixen una forta resposta immunitària contra les cèl·lules transduïdes, degut a la presència d'alguns gens virals en el vector (Figura 1). Per resoldre aquest problema, s'han generat vectors adenovirals completament delecionats de gens virals, els anomenats “*gutless*” o també “*helper-dependent*” (15). Aquests vectors d'última generació no indueixen resposta immune –i per tant mantenen l'expressió del transgen a llarg termini- i a més tenen una gran capacitat de clonatge respecte els vectors adenovirals de primera generació (36 kb vs 8 kb, respectivament) (15,16). La contrapartida d'aquests vectors *gutless* respecte els de primera generació és la complicació en la seva producció, un fet que ha impedit fins a l'actualitat que arribin a la fase d'assaig clínic.

Els vectors adenovirals de primera generació s'utilitzen per aproximacions terapèutiques que requereixen d'expressió transitòria del gen d'interès, com podrien ser la teràpia contra el càncer o també la inducció d'immunitat, actuant en aquest darrer cas com a vehicle de vacunes de DNA. Donada la importància i incidència d'aquestes aplicacions, no es estrany que els vectors adenovirals siguin els vectors més utilitzats en assaigs clínics de teràpia gènica en l'actualitat (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

### 2.2.3. Vectors adeno-associats

Els vectors adeno-associats (AAV) deriven dels virus adeno-associats, que com el seu nom indica varen ser identificats com a virus contaminants de preparacions d'adenovirus. Els AAV són del gènere *dependovirus* i això implica que necessiten d'altres virus per poder replicar-se (normalment adenovirus o també

Figura 1



**Figura 1.- Organització del genoma en els virus i els seus respectius vectors de teràpia gènica.** El genoma dels virus adenoassociats (AAV) és molt simple, conté únicament dos gens (Rep i cap) i les seqüències de DNA anomenades Inverted Terminal Repeats (ITR), que serveixen com a origen de replicació del genoma i com a senyal per l'empaquetament del virus. Els vectors AAV mantenen les ITRs però els gens virals es substitueixen pel casset gènic (CG). El CG normalment està compost per un promotor, el gen d'interès i una senyal de poliadenilació. Els **adenovirus** tenen un genoma més complex amb un conjunt de gens Early (E) i gens Late (L), una senyal d'empaquetat ( $\Psi$ ) i també limitat pels ITRs. En els vectors adenovirals de 1ª generació es substitueixen els gens E1A i E1B pel CG, i es mantenen la resta de gens virals,  $\Psi$ , i ITRs. En canvi, els vectors gutless no contenen cap gen viral i, a part del CG, només contenen  $\Psi$  i ITRs. Els **retrovirus** contenen 3 gens virals (Gag, Pol, Env) i les seqüències terminadores anomenades LTRs, que en el cas dels retrovirus tenen també funció promotora. En els vectors retrovirals s'eliminen els gens virals però es mantenen les seqüències LTRs, i com que aquestes són promotores, en molts casos és suficient incloure únicament el gen d'interès en el vector. Els **lentivirus** s'assemblen als retrovirus però a més de contenir el gens estructurals (Gag, Pol, Env), també presenten gens reguladors (*rev*, *tat*) i gens accessoris (*vif*, *vpr*, *vpu* i *nef*). Els vectors lentivirals d'última generació estan modificats per incrementar la seva seguretat de manera que les LTRs no tinguin funció promotora (s'anomenen *self-inactivating* o SIN), s'inclou un CG complet i es mantenen algunes proteïnes com la *cPPT* (codificada en el gen *Pol*) o la *RRE* (codificada en el gen *Env*) importants pel transport nuclear del genoma.

herpesvirus). Els AAV són virus no patògens i de mida molt petita –aproximadament 20 nm-, el seu genoma només conté dos gens –*rep* i *cap*-, aquest fet limita la seva capacitat de clonatge fins a només 4.7 kb. L'únic element viral present en els AAV recombinants són les seqüències reguladores, situades als dos extrems del genoma conegudes com “Inverted Terminal Repeats (ITRs)” que son necessàries per la síntesi de les partícules virals ja que actuen com inici de replicació del DNA i senyal d'empaquetament per tal que els genomes entrin dins les càpsides (Figura 1).

La teràpia gènica basada en vectors AAV ha guanyat molts adeptes en els últims anys, sobretot gràcies a la descoberta de nous serotips (17). Donat que cada serotip presenta un tropisme preferencial per un teixit concret, avui en dia existeixen AAV recombinants per transduir molts teixits d'interès *in vivo* (18). Els vectors AAV també es poden produir al laboratori amb facilitat (19), es mantenen principalment de forma episomal –com els adenovirus, també s'ha descrit la seva integració al genoma de forma esporàdica- i presenten un bon perfil des del punt de vista de la bioseguretat, ja que deriven de virus no patògens. En models animals no generen resposta immune, i la seva expressió en teixits amb baixa taxa replicació –com el fetge o el múscul esquelètic- es manté durant molts anys (18), no obstant s'han detectat respostes immunitàries febles en alguns assaigs clínics en humans que aparentment es poden controlar amb una lleu immunosupressió (20).

### **3.- Prevenció de la diabetis mitjançant teràpia gènica.**

La diabetis autoimmunitària -o DT1- és d'etiologia desconeguda i es sol diagnosticar durant la infància o l'adolescència, tot i que també pot aparèixer en l'edat adulta. Les manifestacions clíniques de la malaltia es detecten després d'un període asimptomàtic -o prediabetes- durant el qual progressa la resposta immunitària contra les cèl·lules  $\beta$ . A més de la simptomatologia, el diagnòstic de la malaltia s'intenta confirmar analitzant la presència de marcadors d'autoimmunitat, els denominats autoanticossos, que es desenvolupen contra antígens de les cèl·lules  $\beta$  (com per exemple anticossos anti-insulina (IAA) o anti-glutamat descarboxilasa (GADA)). Tot i que la malaltia té un fort component genètic, encara no és possible fer un diagnòstic precoç de la malaltia i aquest fet impossibilita actuar de forma preventiva en humans. No obstant, existeix un gran nombre d'aproximacions de teràpia gènica preventives en models animals de DT1 que es podrien aplicar en un futur en humans, sempre que siguem capaços de diagnosticar precoçment la DT1.



Si l'autoimmunitat és la resposta immunitària contra antígens propis, la **tolerància** és el mecanisme contrari, és a dir, el sistema immunitari reconeix correctament tots els antígens propis de l'individu. La pèrdua de tolerància contra els antígens de l'illot pancreàtic és, per tant, la causa de la DT1, i mantenir la tolerància, és l'objectiu de les teràpies preventives. La tolerància es regula per un complex mecanisme que implica tant la resposta immunitària innata com l'adaptativa. Els limfòcits T formen part de la resposta immunitària adaptativa, i són un dels elements més importants en la DT1, ja que els limfòcits T citotòxics (CTLs) són, juntament amb els macròfags, les cèl·lules efectores que acaben destruint dels cèl·lules  $\beta$ . Per contra, els limfòcits T reguladors (Tregs) actuen de forma contrària, evitant l'autoimmunitat (tant en DT1 com altres malalties autoimmunitàries). En pacients amb DT1, sembla que aquestes cèl·lules podrien tenir alterada la seva capacitat supressora (21).

L'objectiu d'aquesta revisió no és profunditzar en els mecanismes de l'autoimmunitat en la diabetes tipus 1 (revisat a (22)), sinó en enumerar i resumir les diferents estratègies de teràpia gènica que s'han assajat per prevenir aquesta malaltia autoimmunitària.

### **3.1. Teràpia amb citoquines o inhibidors de citoquines.**

Les citoquines poden actuar potenciant la tolerància –com per exemple afavorint les Tregs- o bé suprimint l'autoimmunitat, per exemple inhibint els macròfags i els CTLs. Les citoquines són molècules que es secreten a la sang amb molta facilitat, independentment del teixit que les produeix, i poden tenir efectes molt potents inclús a baixes concentracions. Aquestes característiques fan que les citoquines tinguin una acció sistèmica important, i en alguns casos actuen fora de les cèl·lules diana i poden causar efectes secundaris. L'avantatge de les teràpies amb citoquines és que es pot utilitzar el fetge o el múscul esquelètic com a “fàbrica” d'aquestes molècules, emprant tècniques de transferència gènica tant viral com no viral.

Entre les citoquines reguladores més utilitzades per prevenir la DT1 es troben les interleuquines (IL-4, IL-10, IL-2) o el TGF- $\beta$ . També es pot optar per utilitzar inhibidors de citoquines marcadament inflamatòries, com el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  o la IL-12. Tot i ser efectiva en models animals, aquesta última aproximació té el risc de causar immunosupressió i afavorir infeccions en els pacients, com ha succeït en pacients d'artritis reumatoide tractats amb anti-TNF- $\alpha$  (23). Una de les

maneres de minimitzar aquests efectes secundaris seria limitar el lloc d'expressió de la proteïna –aconseguir una expressió selectiva de teixit- i controlar finament les dosis utilitzades.

En els últims anys s'han desenvolupat tècniques de transferència gènica viral molt eficients per transduir les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees (24, 25), i s'ha pogut demostrar l'eficàcia d'expressar citoquines reguladores com IL-4 o CCL-22 específicament en aquestes cèl·lules per prevenir la DT1 en ratolins NOD –el model murí de DT1 més àmpliament utilitzat- (26, 27). En aquesta línia, també s'ha demostrat que illots pancreàtics que expressen un antagonista del receptor IL-1 $\beta$ , mitjançant la transducció amb vectors adenovirals, presenten una millor supervivència en el context de l'autoimmunitat (28).

D'altra banda, el fetge també es un òrgan interessant en la prevenció de la diabetis, ja que té característiques d'òrgan limfoide (29). Així, l'expressió de IL-4 i IL-10 mitjançant teràpia gènica en el fetge indueix una clara immunoprotecció en front de la DT1 (30); de forma similar, l'expressió de TGF- $\beta$  en el fetge de ratolins NOD –mitjançant vectors adenovirals- indueix la formació de Tregs amb efecte anti-diabetogènic (31).

Tot i que el múscul no tingui característiques limfoides, s'ha observat que l'expressió de IL-10 pel múscul esquelètic –mitjançant vectors AAV- indueix tolerància i redueix l'autoimmunitat (32).

### **3.2. Teràpia amb vacunes de DNA.**

Les vacunes de DNA s'han investigat extensivament per la prevenció de malalties infeccioses i tumors, per la seva simplicitat i flexibilitat. En molts casos, el DNA s'administra en forma de plasmidis –sols, formant complexes o utilitzant tècniques d'electroporació/sonoporació- però els vectors virals també es poden utilitzar amb aquesta finalitat. La hipòtesi que sustenta aquesta estratègia és que el DNA que codifica l'antigen s'expressi a les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) -principalment cèl·lules dendrítiques o macròfags-. Per tant, l'element més important en aquesta aproximació és l'elecció de l'antigen. En el cas de la DT1, els antígens més utilitzats són aquells que s'expressen a la cèl·lula  $\beta$ ; essent la insulina i el GAD els més estudiats. Es pot combinar l'expressió d'aquests antígens amb l'expressió de molècules moduladores, com IL-4 o IL-10, anti-ligand de CD40, o lligand de CTL4 (revisat a (33)). En la majoria de casos s'ha utilitzat teràpia no viral

per a aquesta finalitat, però l'expressió de pèptids de GAD mitjançant vectors AAV en el múscul esquelètic també ha aportat resultats interessants (34), suggerint que la teràpia gènica viral també és una estratègia vàlida.

Tot i no tractar-se d'un antígen específic de les cèl·lules  $\beta$ , s'ha observat que l'expressió del factor de creixement similar a la insulina de tipus 1 (IGF1) en el fetge, per via d'una injecció de plàsmid de forma hidrodinàmica, afavoreix la presència/supervivència de les cèl·lules Treg i prevé l'aparició de DT1 en ratolins (35).

#### **4.- Tractament de la diabetis mitjançant teràpia gènica**

El tractament de la diabetis inclou varies modalitats segons l'objectiu primari que persegueix l'estratègia terapèutica. La teràpia gènica amb insulina és la més estudiada i el seu objectiu és produir la hormona en teixits extrapancreàtics, de manera que aquesta es secreti a la sang i pugui exercir els seus efectes en tot l'organisme. No obstant, la finalitat d'aquest tractament no és curar la malaltia, sinó que pretén millorar el control glucèmic i a la vegada facilitar el maneig diari dels pacients, que no s'haurien d'injectar l'hormona a diari. Un objectiu més ambiciós, i més complex, seria buscar una cura per la malaltia. En aquest cas s'hauria de restituir la població de cèl·lules  $\beta$  i controlar a la vegada l'autoimmunitat.

##### **4.1. Teràpia gènica amb insulina**

Des dels inicis de la teràpia gènica, la producció d'insulina per teixits extrapancreàtics –o cèl·lules pancreàtiques diferents a les  $\beta$ - com a teràpia de la DT1 ha estat extensivament estudiada. La transferència del gen de la insulina es pot realitzar tant per mètodes virals com per mètodes no virals. A més, s'han estudiat tant estratègies *ex vivo* com *in vivo*. Per a la teràpia *ex vivo*, les cèl·lules hepàtiques, musculars o intestinals (entre d'altres) es poden expandir *in vitro* i manipular genèticament per tal que expressin insulina, i posteriorment, aquestes cèl·lules es trasplanten al pacient. Un avantatge d'aquesta aproximació és que el pacient no està en contacte amb el vector de transferència, reduint potencials riscos associats al vector, però la contrapartida són els problemes immunològics que poden causar les cèl·lules trasplantades (a menys que siguin autòlogues) i la difícil elecció de l'òrgan receptor del trasplantament; problemàtica que comparteix amb les teràpies de trasplantament d'illots.

Una altra de les dificultats que afronten les cèl·lules no  $\beta$  és el processament de la insulina, ja que la proinsulina s'ha de processar per les proteases anomenades proconvertases PC1/3, tallant el pèptid-C residual i alliberant la insulina en forma activa. Amb l'excepció de les cèl·lules K intestinals, cap cèl·lula extrapancreàtica expressa aquestes proteases, i per tant el gen de la insulina s'ha de modificar per assegurar els seu correcte processament. La modificació més habitual es substituir els aminoàcids que reconeixen les PC1/3 per aminoàcids que reconeix l'endoproteasa furina, que s'expressa de forma ubiqa a totes les cèl·lules de l'organisme. Aquesta modificació del gen és necessària tant en les aproximacions *ex vivo*, com aquelles *in vivo* on el gen de la insulina es transfereix al teixit diana. El fetge i el múscul esquelètic són els òrgans més utilitzats per les aproximacions *in vivo*. Així, el gen de la insulina s'ha transferit a hepatòcits mitjançant vectors adenovirals (36, 37), AAV (38), lentivirus (39, 40) i mètodes no virals (41). En el múscul esquelètic s'han assajat moltes aproximacions de teràpia amb insulina basades en l'electroporació de DNA plasmídic (revisat a (42, 43)), però també s'han utilitzat vectors lentivirals (44) i AAV (45).

Una problemàtica comuna en totes les teràpies amb insulina és la dificultat de regular correctament la seva producció en funció de la glucèmia. Una de les estratègies és controlar l'expressió de l'hormona mitjançant un promotor regulat per glucosa, com per exemple el promotor de la piruvat kinasa (46) o promotors sintètics (47). No obstant, és difícil aconseguir uns nivells de glucosa ben controlats amb aquesta estratègia, ja que en condicions normals –a les cèl·lules  $\beta$ - la insulina es controla de manera postranscripcional. El control únicament a nivell transcripcional pot comportar una lenta producció de l'hormona quan els nivells de glucosa augmenten i una alliberació de l'hormona quan ja els nivells de glucosa han disminuït. Aquest desfàs pot provocar episodis més o menys perllongats d'hiperglucèmia i d'hipoglucèmia, essent aquests últims especialment perillosos.

Una estratègia alternativa és l'expressió d'insulina de forma constitutiva pel múscul esquelètic i a la vegada expressar l'enzim glucoquinasa (Gck) en aquest teixit (45). Es tracta d'aconseguir una producció d'insulina basal que mantingui la normoglucèmia en dejú, i quan la glucèmia augmenta després de menjar, la Gck incrementa la captació de glucosa en el múscul esquelètic i la disminueix en la circulació. Quan la glucosa torna a valors normoglucèmics la Gck disminueix la seva fosforilació, ja que aquest enzim presenta una Km elevada o el que és el mateix, una afinitat molt baixa pel substrat (48), evitant així l'hipoglucèmia (45).

#### 4.2. Regeneració i protecció de cèl·lules productores d'insulina

La generació de noves cèl·lules productores d'insulina en pacients de DT1 podria constituir una cura per la malaltia, sempre que a la vegada s'aturi l'atac autoimmunitari contra aquestes cèl·lules. Cal destacar que la majoria d'aproximacions preventives descrites a l'apartat 3 es podrien aplicar com a teràpia combinada i evitar aquest atac enfront les noves cèl·lules  $\beta$ .

Durant molts anys una de les estratègies més estudiades per tractar la diabetis ha estat la **generació de cèl·lules  $\beta$  *in vitro*** a partir de cèl·lules progenitores de diferents tipus; per exemple ESC (Embrionic Stem Cells), iPS (inducible Pluripotent Stem cells) o cèl·lules progenitores adultes –com les cèl·lules mesenquimals-. L'objectiu final seria aconseguir una cèl·lula productora d'insulina i poder trasplantar-la en el pacient diabètic. Aquestes estratègies estarien encabides dins de la teràpia cel·lular, no obstant, cal destacar que en alguns casos la transferència de factors a aquestes cèl·lules es fa mitjançant tècniques de teràpia gènica –vectors virals i no virals- com és el cas de les iPS.

També cal destacar un gran nombre d'estratègies de teràpia gènica que busquen protegir els illots pancreàtics en l'ambient del postrasplantament, mitjançant l'expressió de gens anti-apoptòtics, factors pro-angiogènics –per afavorir l'implantament- o factors que indueixen proliferació. En aquest cas, també es parlaria d'una combinació de teràpia cel·lular i teràpia gènica.

La generació, o millor dit, regeneració, de cèl·lules productores d'insulina directament en el pacient utilitzant les eines de la teràpia gènica és un camp molt estudiat i amb un gran potencial. En aquest cas, els vectors s'apliquen directament en l'individu per induir la formació de noves cèl·lules *in vivo*. En general, aquest tipus d'aproximacions pretenen convertir una cèl·lula d'un teixit diferenciat adult –pancreàtic o extrapancreàtic- en una cèl·lula  $\beta$ , aprofitant el que es coneix com plasticitat cel·lular (revisat a (49)). Aquesta conversió d'una cèl·lula en una altra s'anomena **transdiferenciació** o –més acuradament- **reprogramació** cel·lular. Els teixits amb més potencial per a ser utilitzats amb aquesta finalitat són el fetge i el pàncrees exocrí, ja que tots dos teixits provenen d'una cèl·lula progenitora comuna a la pròpia cèl·lula  $\beta$ . Així, la transferència gènica a cèl·lules hepàtiques de factors de transcripció importants pel desenvolupament de les cèl·lules  $\beta$  (PDX-1, Ngn-3, NeuroD), mitjançant vectors adenovirals, indueix la formació de cèl·lules productores d'insulina i reverteix la diabetis en ratolins (50, 51). De forma similar, i també

utilitzant vectors adenovirals, s'ha demostrat que cèl·lules acinars pancreàtiques es poden reprogramar *in vivo* utilitzant una combinació de 3 factors de transcripció (PDX-1, Ngn-3 i MafA), en cèl·lules productores d'insulina (52).

La **protecció i proliferació** de les cèl·lules  $\beta$  preexistents també té un alt potencial pel tractament de la diabetis. En els pacients de DT1, quan es diagnostica la malaltia més del 80% de cèl·lules  $\beta$  ja han estat destruïdes, però el romanent de d'aquestes cèl·lules es podria expandir mitjançant la inducció de proliferació i recuperar la massa total de cèl·lules productores d'insulina capaç de regular la glucèmia. De fet, s'ha descrit, en ratolins, que la proliferació de les cèl·lules  $\beta$  és el principal mecanisme de manteniment de la massa total de cèl·lules  $\beta$  durant tota la vida adulta (53). A més, en absència de resposta autoimmunitària, les cèl·lules  $\beta$  dels ratolins tenen la suficient capacitat de replicar i restaurar la suficient producció d'insulina (54, 55). Per tant, es possible utilitzar les eines de la teràpia gènica per transferir factors que indueixin la replicació i protecció de les cèl·lules  $\beta$  *in vivo*. Per exemple, s'ha demostrat un efecte de protecció i de proliferació a les cèl·lules  $\beta$  de ratolins diabètics utilitzant el factor de creixement dels hepatòcits (HGF) i també del pèptid similar al glucagó de tipus 1 (GLP-1) (25, 56).

## 5.-Conclusions

Els resultats clínics positius obtinguts recentment amb les diferents estratègies de teràpia gènica per malalties monogèniques com l'hemofília (20), l'amaurosis congènita de Leber (57), l'adrenoleucodistrofia (13) o la deficiència de lipoproteïna lipasa (58) fan pensar en l'aplicació d'aquesta nova modalitat de teràpia també en malalties poligèniques. A més, recentment la agència europea del medicament (EMA) ha aprovat l'entrada al mercat del primer producte de teràpia gènica, basat en vectors virals AAV, pel tractament de la deficiència de lipoprotein lipasa (glybera™), un fet que podria incrementar l'interès de la indústria farmacèutica per aquest nou tipus de teràpies avançades.

En el cas de malalties poligèniques o multifactorials, com la diabetis, l'elecció del gen terapèutic, el teixit diana o el vector de transferència són elements claus per a l'èxit de l'aproximació. En aquesta revisió s'han descrit diferents estratègies de tractament i prevenció, i es veu clarament que es poden utilitzar tant vectors virals com no virals per a la manipulació genètica. A més, en aquestes aproximacions el fetge, múscul esquelètic o el pàncrees són els teixits dianes més àmpliament

manipulats. Exceptuant el cas de la insulina, l'elecció del gen no és una tasca fàcil per prevenir o tractar la DT1.

La seguretat és un dels problemes que encara avui en dia pot afectar a la teràpia gènica, ja sigui la seguretat dels vectors que s'utilitzen o també l'expressió inapropiada del propi gen terapèutic. No obstant, els vectors d'última generació com els AAV o els lentivirus estan demostrant una elevada seguretat en els assajos clínics vigents.

A diferència d'algunes malalties que no tenen cap tractament efectiu, en el cas de la diabetis, els pacients es poden controlar gràcies al tractament amb insulina o altres hipoglucèmians, així que tot i els inconvenients i complicacions que pot comportar aquest tractament, s'aconsegueix cronificar la malaltia amb una baixa mortalitat. Aquest fet fa que les exigències d'eficàcia i seguretat per les noves teràpies siguin necessàriament elevades. Els avenços dels últims anys fan ser optimistes en el camp de la teràpia gènica de la diabetis, però encara cal optimitzar alguns aspectes com la secreció d'insulina ben regulada pels teixits extra-pancreàtics, o la formació de noves cèl·lules productores d'insulina que es comportin de forma idèntica a la cèl·lula  $\beta$  original, una cèl·lula extremadament sofisticada.

## 6.- Referències

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. *Diabetes Care* 20:1183-1197.
2. Robertson, R.P. 2010. Islet Transplantation a Decade Later and Strategies for Filling a Half-Full Glass. *Diabetes* 59:1285-1291.
3. Ryan, E.A., Paty, B.W., Senior, P.A., Bigam, D., Alfadhli, E., Kneteman, N.M., Lakey, J.R., and Shapiro, A.M. 2005. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54:2060-2069.
4. Borowiak, M., and Melton, D.A. 2009. How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol* 21:727-732.
5. Kay, M.A. 2011. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* 12:316-328.
6. Andre, F., and Mir, L.M. 2004. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther.* 11 Suppl 1:S33-S42.
7. Miller, D.L., Pislaru, S.V., and Greenleaf, J.E. 2002. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat Cell Mol Genet* 27:115-134.
8. Zhang, Q., Wang, Z., Ran, H., Fu, X., Li, X., Zheng, Y., Peng, M., Chen, M., and Schutt, C.E. 2006. Enhanced gene delivery into skeletal muscles with ultrasound and microbubble techniques. *Acad Radiol* 13:363-367.
9. Liu, F., Song, Y., and Liu, D. 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6:1258-1266.
10. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nussbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., et al. 2000.



- Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
11. Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., et al. 2002. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296:2410-2413.
  12. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
  13. Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., et al. 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326:818-823.
  14. Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi Sergi, L., and Naldini, L. 2006. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12:585-591.
  15. Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A., and Graham, F.L. 1996. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13565-13570.
  16. Morral, N., O'Neal, W., Rice, K., Leland, M., Kaplan, J., Piedra, P.A., Zhou, H., Parks, R.J., Velji, R., Aguilar-Cordova, E., et al. 1999. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12816-12821.
  17. Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. 2004. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78:6381-6388.
  18. Mingozzi, F., and High, K.A. 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12:341-355.
  19. Ayuso, E., Mingozzi, F., and Bosch, F. 2010. Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* 10:423-436.
  20. Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdhary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. 2011. Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med*:in press.
  21. Lindley, S., Dayan, C.M., Bishop, A., Roep, B.O., Peakman, M., and Tree, T.I. 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54:92-99.
  22. Vives-Pi, M. 2010. Visió global de la l'autoimmunitat a la diabetis tipus 1: l'escenari pancreàtic. *Diabetis Avui. Associació Catalana de Diabetis*.
  23. Slifman, N.R., Gershon, S.K., Lee, J.H., Edwards, E.T., and Braun, M.M. 2003. Listeria monocytogenes infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum* 48:319-324.
  24. Wang, Z., Zhu, T., Rehman, K.K., Bertera, S., Zhang, J., Chen, C., Papworth, G., Watkins, S., Trucco, M., Robbins, P.D., et al. 2006. Widespread and stable pancreatic gene transfer by adeno-associated virus vectors via different routes. *Diabetes* 55:875-884.
  25. Jimenez, V., Ayuso, E., Mallol, C., Agudo, J., Casellas, A., Obach, M., Munoz, S., Salavert, A., and Bosch, F. 2011. In vivo genetic engineering of



- murine pancreatic beta cells mediated by single-stranded adeno-associated viral vectors of serotypes 6, 8 and 9. *Diabetologia* 54:1075-1086.
26. Rehman, K.K., Trucco, M., Wang, Z., Xiao, X., and Robbins, P.D. 2008. AAV8-mediated gene transfer of interleukin-4 to endogenous beta-cells prevents the onset of diabetes in NOD mice. *Mol Ther* 16:1409-1416.
  27. Montane, J., Bischoff, L., Soukhatcheva, G., Dai, D.L., Hardenberg, G., Levings, M.K., Orban, P.C., Kieffer, T.J., Tan, R., and Verchere, C.B. 2011. Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J Clin Invest* 121:3024-3028.
  28. Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Ghivizzani, S.C., Gambotto, A., Ricordi, C., Trucco, M., and Robbins, P.D. 1999. Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes* 48:1730-1736.
  29. Crispe, I.N. 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27:147-163.
  30. Ko, K.S., Lee, M., Koh, J.J., and Kim, S.W. 2001. Combined administration of plasmids encoding IL-4 and IL-10 prevents the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Mol Ther* 4:313-316.
  31. Luo, X., Yang, H., Kim, I.S., Saint-Hilaire, F., Thomas, D.A., De, B.P., Ozkaynak, E., Muthukumar, T., Hancock, W.W., Crystal, R.G., et al. 2005. Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation* 79:1091-1096.
  32. Yang, Z., Chen, M., Wu, R., Fialkow, L.B., Bromberg, J.S., McDuffie, M., Naji, A., and Nadler, J.L. 2002. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol* 168:6479-6485.
  33. Prud'homme, G.J., Draghia-Akli, R., and Wang, Q. 2007. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther* 14:553-564.
  34. Han, G., Li, Y., Wang, J., Wang, R., Chen, G., Song, L., Xu, R., Yu, M., Wu, X., Qian, J., et al. 2005. Active tolerance induction and prevention of autoimmune diabetes by immunogene therapy using recombinant adenoassociated virus expressing glutamic acid decarboxylase 65 peptide GAD(500-585). *J Immunol* 174:4516-4524.
  35. Anguela, X., Tafuro, S., Roca, C., Callejas, D., Agudo, J., Obach, M., Ribera, A., Ruzo, A., Mann, C., Casellas, A., et al. 2012. Non-viral-mediated hepatic expression of IGF-I increases Treg levels and suppresses autoimmune diabetes in mice. *Diabetes*. In press
  36. Lee, H.C., Kim, S.J., Kim, K.S., Shin, H.C., and Yoon, J.W. 2000. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408:483-488.
  37. Thule, P.M., and Liu, J.M. 2000. Regulated hepatic insulin gene therapy of STZ-diabetic rats. *Gene Ther* 7:1744-1752.
  38. Park, Y.M., Woo, S., Lee, G.T., Ko, J.Y., Lee, Y., Zhao, Z.S., Kim, H.J., Ahn, C.W., Cha, B.S., Kim, K.S., et al. 2005. Safety and efficacy of adeno-associated viral vector-mediated insulin gene transfer via portal vein to the livers of streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *J Gene Med* 7:621-629.
  39. Elsner, M., Jorns, A., and Lenzen, S. 2008. Diabetes therapy by lentiviral hepatic insulin gene expression without transformation of liver. *Diabetologia* 51:694-695; author reply 696.

40. Elsner, M., Terbish, T., Jorns, A., Naujok, O., Wedekind, D., Hedrich, H.J., and Lenzen, S. 2012. Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. *Mol Ther* 20:918-926.
41. He, C.X., Shi, D., Wu, W.J., Ding, Y.F., Feng, D.M., Lu, B., Chen, H.M., Yao, J.H., Shen, Q., Lu, D.R., et al. 2004. Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration. *World J Gastroenterol* 10:567-572.
42. Mann, C.J., Ayuso, E., Anguela, X.M., and Bosch, F. 2010. Skeletal muscle metabolism in the pathology and treatment of type 1 diabetes. *Curr Pharm Des* 16:1002-1020.
43. Prud'homme, G.J., Glinka, Y., Khan, A.S., and Draghia-Akli, R. 2006. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr Gene Ther* 6:243-273.
44. Oh, T.K., Li, M.Z., and Kim, S.T. 2006. Gene therapy for diabetes mellitus in rats by intramuscular injection of lentivirus containing insulin gene. *Diabetes Res Clin Pract* 71:233-240.
45. Mas, A., Montane, J., Anguela, X.M., Munoz, S., Douar, A.M., Riu, E., Otaegui, P., and Bosch, F. 2006. Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55:1546-1553.
46. Thule, P.M., Liu, J., and Phillips, L.S. 2000. Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes. *Gene Ther* 7:205-214.
47. Kozłowski, M., Olson, D.E., Rubin, J., Lyszkowicz, D., Campbell, A., and Thule, P.M. 2007. Adeno-associated viral delivery of a metabolically regulated insulin transgene to hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 273:6-15.
48. Printz, R.L., Magnuson, M.A., and Granner, D.K. 1993. Mammalian glucokinase. *Annu.Rev.Nutr.* 13:463-496.
49. Tellez, N. 2011. La plasticitat cel.lular com a possible diana terapèutica de la diabetes. *Diabetes Avui. Associació Catalana de diabetis.*
50. Yechoor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A., Oka, K., Kojima, H., and Chan, L. 2009. Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes. *Dev Cell* 16:358-373.
51. Kojima, H., Fujimiya, M., Matsumura, K., Younan, P., Imaeda, H., Maeda, M., and Chan, L. 2003. NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9:596-603.
52. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455:627-632.
53. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., and Melton, D.A. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-46.
54. George, M., Ayuso, E., Casellas, A., Costa, C., Devedjian, J.C., and Bosch, F. 2002. Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J.Clin.Invest* 109:1153-1163.
55. Nir, T., Melton, D.A., and Dor, Y. 2007. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest* 117:2553-2561.
56. Riedel, M.J., Gaddy, D.F., Asadi, A., Robbins, P.D., and Kieffer, T.J. 2010. DsAAV8-mediated expression of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Gene Ther* 17:171-180.
57. Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bennicelli, J.L., Ying, G.S., Rossi, S., et al. 2009. Age-

- dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374:1597-1605.
58. Stoes, E.S., Nierman, M.C., Meulenberg, J.J., Franssen, R., Twisk, J., Henny, C.P., Maas, M.M., Zwinderman, A.H., Ross, C., Aronica, E., et al. 2008. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2303-2304.