

Curso de Endocrinología para Posgraduados

Terapia génica en endocrinología: una aproximación realista

A. ZORZANO

Parc Científic de Barcelona y Departament de Bioquímica i Biología Molecular. Universitat de Barcelona. Barcelona. España.

El número de ensayos clínicos que pretenden demostrar la eficacia de nuevos métodos de tratamiento, curación o prevención de enfermedades mediante la utilización de la terapia génica aumentan año tras año; así, en el año 2002 se registraron en el mundo un total de 636 protocolos clínicos de terapia génica en marcha. En la actualidad, los principales tipos de enfermedades objeto de protocolos clínicos de terapia génica son el cáncer, las enfermedades vasculares, el sida, las enfermedades genéticas monogénicas como la deficiencia en adenosina desaminasa, la hipercolesterolemia familiar o la fibrosis quística.

La terapia génica aplicada a la curación de enfermedades endocrinas representa un potencial nuevo tipo de intervención que podría aplicarse a enfermedades endocrinas de origen monogénico, como la deficiencia de hormona del crecimiento, la diabetes insípida hipotalámica o las enfermedades multifactoriales, como la diabetes, la obesidad o los tumores endocrinos. En esta minirevisión se comentan aspectos generales relativos a la terapia génica y su posible aplicación en el tratamiento, curación o prevención de enfermedades endocrinas en general y de enfermedades multigénicas, como es el caso de la diabetes, en particular.

GENE THERAPY IN ENDOCRINOLOGY: A REALISTIC APPROACH

The number of clinical trials involving methods of gene therapy has progressively increased and 363 gene therapy protocols were registered in 2002. At present, gene therapy protocols are used mainly in cancer, vascular diseases, AIDS, and monogenic diseases such as adenosine deaminase deficiency, familiar hypercholesterolemia, and cystic fibrosis.

Gene therapy aiming to the cure endocrine diseases is a new type of potential intervention that could be applied to monogenic endocrine diseases such as growth hormone deficiency, hypothalamic diabetes insipidus or multifactorial diseases such as diabetes, obesity or endocrine neoplasms. In this review, clinical trials protocols currently underway, the main types of vectors used and the strategies that could be used in multigenic diseases such as diabetes will be discussed.

Key words: Diabetes mellitus. Gene therapy.

SITUACIÓN ACTUAL Y CONCEPTOS BÁSICOS EN TERAPIA GÉNICA

La terapia génica consiste en la administración de material genético con el objeto de modificar o manipular la expresión de un producto génico o de alterar las propiedades biológicas de las células para una utilidad terapéutica. Las células pueden ser modificadas *ex vivo* para su administración posterior, o bien *in vivo* mediante productos de terapia génica administrados directamente a los sujetos. Podemos decir que la terapia génica se encuentra en un estado embrionario y aún no es una realidad en la práctica clínica. No obstante, el número de protocolos de terapia génica que son operativos crece de manera notable cada año. Así, mientras que el número total de protocolos de terapia génica en fase de estudio era de menos de 400 en el año 1999, en el año 2002 este número es de 636¹. En cuanto a la distribución geográfica de los protocolos de terapia génica, la mayor parte se realizan en Norteamérica (81%) y en Europa (16%), y si nos referimos a países, EE.UU., el Reino Unido y Francia lideran la lista con 505, 43 y 15 estudios, respectivamente.

Con respecto a las enfermedades sobre las que se trata de ejercer un efecto terapéutico, los estudios clínicos de terapia génica fun-

Correspondencia. Dr. A. Zorzano.
Avda. Diagonal 645. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: azorzano@bio.ub.es

Manuscrito recibido el 10-1-2003; aceptado para su publicación el 17-4-2003.

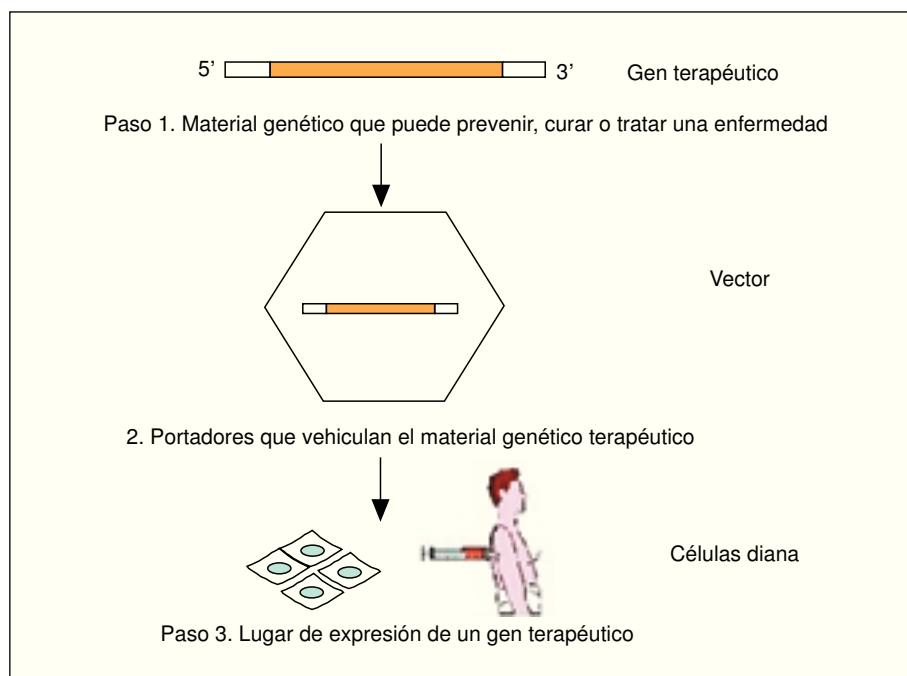


Fig. 1. Estrategia de la terapia génica.

damentalmente se orientan al tratamiento del cáncer, de enfermedades monogénicas, enfermedades vasculares y sida. Otro aspecto de interés es que, mientras la mayoría de los estudios se encuentran en fases clínicas iniciales, en el año 2002 un total de 9 estudios habían alcanzado la fase clínica III. Estos estudios se relacionan con el tratamiento de ciertas formas de cáncer y de las enfermedades cardiovasculares.

De manera esquemática, la estrategia seguida por la terapia génica consiste en una serie de pasos (fig. 1), a saber: *a*) elección del material genético o gen terapéutico que puede permitir prevenir, curar o tratar una enfermedad; *b*) incorporación del gen terapéutico en un vector que permitirá la vehiculación del material genético, y *c*) las células diana en las que queremos que la llegada del vector induzca la expresión del gen terapéutico seleccionado previamente.

La terapia génica se enfrenta a una serie de barreras que hacen difícil su puesta en marcha. Los problemas son de diferente tipo pero, de hecho, el esquema planteado en la figura 1 permite referirse a ellos en las distintas fases antes especificadas. Una primera dificultad consiste en el escaso conocimiento de la función génica. A pesar de que en la actualidad conocemos la práctica totalidad de los genes que componen el genoma humano^{2,3}, desconocemos cuál es la función concreta de la mayoría de ellos. Esto implica, lógicamente, que no podemos utilizar como genes terapéuticos muchos de los genes que constituyen el genoma humano. Por tanto, es necesario progresar en el análisis de la función de estos genes para ampliar las posibilidades de la terapia génica.

Un segundo problema que limita la eficacia de la te-

TABLA 1. Propiedades de un vector ideal

Alta concentración (108 partículas virales por ml), permitiendo la infección de muchas células
Comodidad y reproducibilidad de la producción
Capacidad para transducir células proliferativas y no proliferativas
Capacidad para integrarse en una localización determinada en el cromosoma huésped o mantenerse como episoma estable
Presencia de una unidad transcripcional que responda a la manipulación de sus elementos reguladores
Capacidad para alcanzar a un tipo celular deseado
Ausencia de componentes que produzcan una respuesta inmunitaria

terapia génica tiene que ver con los vectores que permiten la expresión del gen terapéutico en un determinado conjunto de células. En este momento, la mayor parte de los estudios clínicos de terapia génica involucran la utilización de vectores retrovirales, adenovirales o de ADN plasmídico desnudo (tabla 2). El ADN plasmídico desnudo se utiliza en algunos tipos de terapia génica y permite la expresión del gen terapéutico en los músculos esquelético o cardíaco, aunque con una baja eficiencia. La utilización de virus como vehículos de la transferencia de genes tiene como base la idea de reemplazar los genes virales implicados en el desencadenamiento de la enfermedad por el gen terapéutico en cuestión. De esta manera, se puede aprovechar el potencial del virus para obtener grandes cantidades del mismo y utilizar su capacidad de propagación y de infección de células. En teoría, un vector debería poseer una serie de propiedades para poder ser utilizado de manera eficiente en terapia. Estas características se detallan en la tabla 1 y en la figura 2. Cabe destacar la

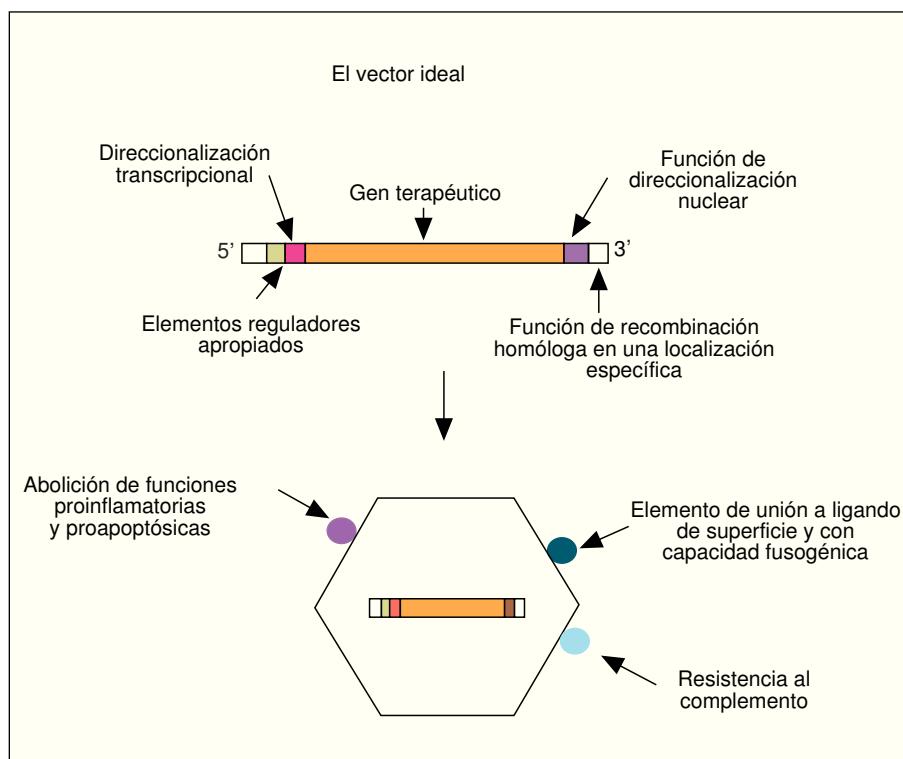


Fig. 2. El vector ideal.

importancia de que un vector pueda transducir tanto células proliferativas como no proliferativas, y la habilidad de los vectores para poder integrarse en lugares específicos del cromosoma de la célula huésped o, alternativamente, mantenerse de manera estable como episomas. También es altamente relevante que un vector pueda transducir un tipo celular específico y que el nivel de expresión del gen terapéutico pueda ser regulado. Asimismo, es importante que el vector no provoque una respuesta inmunitaria u otras respuestas deleterias en el paciente (tabla 2; fig. 2).

A pesar de lo comentado anteriormente, los vectores de los que se dispone en la actualidad distan de reunir los requerimientos ideales antes mencionados. Los vectores más utilizados en los protocolos de terapia génica operativos en este momento se detallan en la tabla 2. Así, la utilización de retrovirus (el vector más empleado) permite la integración en el ADN de la célula huésped, aunque su punto de integración no es controlable; en cambio, no permite la transducción de células quiescentes (con la excepción de un subtipo de retrovirus, los denominados lentivirus). Los adenovi-

rus, que constituyen otro vector muy utilizado en los protocolos de terapia génica, sí permiten la transducción de células no proliferativas; en cambio, no se integran en el ADN de las células huésped y generan una respuesta inmunitaria cuando administrados *in vivo*. Se ha desarrollado una nueva generación de vectores adenovirales que están completamente exentos de las secuencias que codifican para proteínas virales. Estos adenovirus sin estómago, o *gutless*, presentan una menor inmunogenicidad y dan lugar a una expresión prolongada del gen terapéutico⁴.

APLICACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA EN LAS ENFERMEDADES ENDOCRINAS

Las enfermedades endocrinas pueden dividirse en diferentes categorías, que incluyen una reducida producción de hormona, una sobreproducción de hormona, la producción de hormonas alteradas, la resistencia a la acción de la hormona, anormalidades del transporte o metabolismo de la hormona, y otras anormali-

TABLA 2. Características principales de los vectores más frecuentes

	Retrovirus	Adenovirus	HSV	AAV	Liposomas	ADN desnudo
Tamaño del inserto	8 kb	35 kb	> 20 kb	< 4 kb	> 20 kb	> 20 kb
Título funcional (UFC/ml)	10 ⁷	10 ¹¹	10 ¹⁰	10 ⁹	No definido	No definido
Integración	Sí	No	No	Inciso	No	No
Expresión sostenida	Variable	Transitoria	Transitoria	Variable	Transitoria	Transitoria
Distribución <i>in vivo</i>	Baja	Alta	Alta	Alta	Variable	Músculo
Células quiescentes	Sólo lentivirus	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

UFC: unidades formadoras de colonias; HSV: virus herpes simple; AAV: vector viral adenoasociado.

TABLA 3. Terapia génica en enfermedades endocrinas

Hiperfunción endocrina
Suplementación génica
Interferencia de ARN
Oligonucleótidos antisentido
Ribozimas
Hipofunción endocrina
Suplementación génica
Corrección génica
Tumores endocrinos
Terapia génica correctiva
Terapia génica antiangiogénica
Genes suicidas
Inmunoterapia
Alteraciones autoinmunes
Inmunomodulación

dades hormonales, entre las que se encuentran el desarrollo de tumores endocrinos. Estas alteraciones pueden dar lugar a hiperfunción o hipofunción endocrinas.

La terapéutica convencional ha permitido la mejora de los síntomas de las enfermedades, aunque ello no comporta necesariamente la curación de las mismas. La necesidad de una terapia distinta de la convencional, que puede estar representada por la terapia génica, se encuentra apoyada por el hecho de que la terapia mediante la administración de la hormona no siempre consigue reproducir las concentraciones fisiológicas de hormona en el plasma o en los tejidos. Además, la terapia génica representa una estrategia que puede ser útil en el tratamiento de tumores endocrinos o en alteraciones endocrinas de origen inmunitario que no responden a los tratamientos convencionales⁵.

La terapia génica puede establecer diferentes estrategias en función del tipo de alteración endocrina (tabla 3). Así, en el caso de la hiperfunción endocrina puede requerir la transferencia de un gen con efectos mejoradores del estado del paciente, o la inhibición de un gen asociado con la hipersecreción hormonal mediante la utilización de ribozimas o estrategias de bloqueo de la expresión génica, como la del método de interferencia de ARN (ARNi) o el uso de oligonucleótidos antisentido. Por el contrario, en el caso de la hipofunción endocrina se requiere la presentación del gen que codifica para la hormona. En el caso de tumores endocrinos, pueden aprovecharse distintas estrategias, como la expresión de genes supresores, inhibidores de oncogenes, antiangiogénicos o terapia de inmunomodulación. Finalmente, en alteraciones endocrinas de origen inmunitario se puede plantear la terapia génica de inmunomodulación.

A pesar de todas estas posibilidades teóricas en relación con la aplicación de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades endocrinas, ésta se halla en una fase de desarrollo muy incipiente. En este momento, fundamentalmente se centra en el estudio del tratamiento en animales experimentales, con el objeto de demostrar que la terapia génica puede aplicarse para tratar determinadas alteraciones hormonales.

Un ejemplo lo constituye la búsqueda de un protocolo de terapia génica para el tratamiento de los adenomas pituitarios, que constituyen la enfermedad neuroendocrina más frecuente en humanos^{6,7}. En la actualidad, esta alteración se trata en función de los síntomas clínicos y del tamaño del tumor, y el tratamiento incluye terapia con agonistas dopamínergicos, cirugía y radioterapia. El éxito de estas terapéuticas varía de acuerdo con la naturaleza y el tamaño del tumor. Recientemente se ha demostrado que la inyección en la glándula pituitaria de adenovirus que expresan el gen suicida timidinacina del virus herpes simple (HSV-I) conduce a la reducción de la masa de la pituitaria y de los valores circulantes de prolactina en ratas con prolactinoma inducido por estrógenos⁷.

La deficiencia en hormona del crecimiento (GH) es otra alteración candidata para llevar a cabo terapia génica. Esto es debido a que el tratamiento convencional con GH requiere administraciones frecuentes de hormona y, con el tiempo, este tratamiento se asocia con una disminución de la efectividad. En esta área se ha desarrollado una intensa actividad que ha dado como fruto la consecución de una serie de jalones, como: *a*) la generación de mioblastos modificados genéticamente que expresan GH tras transducción con retrovirus; *b*) inyección intramuscular con mioblastos que expresan GH; *c*) implantación de microcápsulas que contienen mioblastos que expresan GH, y *d*) transferencia génica intramuscular. Especialmente importante ha sido la observación de que es posible realizar transferencia génica muscular de GH, de manera que resulte en la liberación regulable de GH⁸. Se espera que estos pasos y otros futuros permitan el salto a la puesta en marcha de ensayos clínicos.

APLICACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA EN LA DIABETES

La diabetes mellitus es la enfermedad endocrina más frecuente y agrupa a un conjunto de alteraciones de diferente base genética. Así, por ejemplo, mientras que la MODY (*maturity onset diabetes of the young*) es una forma monogénica de diabetes con herencia autosómica dominante, la diabetes tipo 1 y 2 son enfermedades poligénicas en las que, además, el ambiente desempeña un importante papel en su desarrollo.

A pesar de que existe un elevado arsenal terapéutico que permite una adecuada atención del paciente diabético, los fármacos actualmente existentes se muestran incapaces de prevenir las graves complicaciones crónicas asociadas a esta enfermedad, como nefropatía, retinopatía o la enfermedad vascular y cardíaca. En este sentido, se ha propuesto que la terapia génica podría ser de utilidad en el tratamiento, la curación o la prevención de la diabetes⁹⁻¹¹. Las principales terapias que se han propuesto en este sentido son fundamentalmente de tres tipos: *a*) orientadas a retrasar o prevenir el inicio de la diabetes; *b*) terapias dirigidas a corregir

TABLA 4. Utilidades potenciales de la terapia génica en la diabetes

Retraso y/o prevención del inicio de la diabetes
Ingeniería de células del sistema inmunitario o de células beta pancreáticas para prevenir la destrucción autoinmune
Modificación de la célula beta pancreática para prevenir la destrucción apoptótica
Terapias dirigidas a corregir la deficiencia relativa de insulina
Aumento de la neogénesis y/o regeneración de la célula beta
Ingeniería genética de secreción de insulina regulable por glucosa en células no beta
Ingeniería genética de células beta alogénicas o xenogénicas
Modificación de tejidos para mejorar la sensibilidad a la insulina
Terapias dirigidas a prevenir el daño causado por la hiperglucemia prolongada
Ingeniería de órganos para reducir complicaciones (p. ej., estrategias de antiangiogénesis para prevenir la neovascularización)

la deficiencia absoluta o relativa de insulina, y *c*) las terapias dirigidas a prevenir el daño tisular causado por la exposición crónica a hiperglucemia (tabla 4).

Con el objeto de prevenir o retrasar el inicio de la diabetes se está trabajando activamente en distintos aspectos, como la generación de células modificadas del sistema inmunitario, así como la modificación de células beta pancreáticas que impidan la destrucción de las células beta del páncreas.

Con respecto a las terapias dirigidas a corregir la deficiencia absoluta o relativa de insulina del paciente diabético, se han propuesto diferentes estrategias, de las cuales cabe comentar el aumento de la neogénesis o de la regeneración de células beta pancreáticas, la generación mediante ingeniería genética de células no beta pancreáticas que segreguen insulina de manera regulada por la glucosa, la generación por ingeniería genética de células beta pancreáticas y la modificación de tejidos que permitan mejorar la sensibilidad a la insulina.

Finalmente, entre las terapias que se han propuesto para prevenir el daño tisular asociado a la hiperglucemia crónica se han propuesto estrategias antiangiogénicas para prevenir la neovascularización que conduce a la aparición de retinopatía diabética.

En la actualidad se han llevado a cabo diferentes pruebas de concepto que demuestran que es posible mejorar la glucemia de animales diabéticos mediante diversos protocolos de terapia génica. En este sentido, un elevado número de estudios se han centrado en la posibilidad de expresar insulina o derivados de la insulina en células no beta pancreáticas, como hepatocitos o fibras del músculo esquelético. No obstante, este objetivo no es sencillo de llevar a cabo. Un problema importante relativo a la producción de insulina en células no beta pancreáticas procede de la estructura particular de esta molécula. La insulina está constituida por 2 cadenas, denominadas A y B, que se encuentran unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios y un puente disulfuro intracatenario. La molécula de insulina se produce a partir de la proteína precursora

preproinsulina, y esta molécula, por digestión de un fragmento de 24 residuos aminoácidos del extremo N-terminal, genera la molécula de proinsulina. La proinsulina es un péptido de 81 residuos aminoácidos y representaría a las cadenas A y B de la insulina separadas por el llamado péptido C. En la célula beta del páncreas, la proinsulina se almacena en gránulos de secreción donde, por acción de PC2 y PC3, dos miembros de la familia de las proteasas dependientes de calcio parecidas a la subtilisina, se genera la molécula de insulina¹⁰. Las proteasas PC2 y PC3 no se expresan en la mayor parte de las células no beta pancreáticas.

Con el objeto de resolver la generación de insulina en células no beta se han intentado varias estrategias. Un intento enormemente interesante ha consistido en generar una molécula de insulina modificada constituida por la cadena A y la cadena B separadas por un heptápéptido Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg (en lugar del fragmento de 35 aminoácidos que supone el péptido C). Esta molécula modificada de la insulina de cadena sencilla presenta una considerable actividad biológica, tanto de unión al receptor como de estimulación de la captación de glucosa¹²; no obstante, la actividad de la insulina de cadena sencilla es menor que la de la insulina.

Un segundo problema relativo a la producción de insulina en células no beta, consiste en cómo conseguir que la secreción de insulina obtenida en una célula no beta pancreática sea regulable de manera aguda por glucosa. Éste tampoco es un punto fácil de superar, dado que el mecanismo por el cual la glucosa estimula la secreción de insulina en las células beta pancreáticas es dependiente de moléculas tales como el transportador de glucosa GLUT2, la glucocinasa, un canal de K⁺ inhibible por ATP y canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje; asimismo, se requiere una compleja maquinaria de secreción en la que se produce la exocitosis de gránulos de secreción, y que no es ubicua en todos los tipos celulares. En este sentido, se ha descrito que las células K podrían representar un excelente modelo sobre el que instaurar la secreción regulable de insulina. Las células K se localizan en el estómago, el duodeno y el yeyuno, y son responsables de la secreción del péptido insulíntrópico dependiente de glucosa o GIP, que potencia la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Las células K expresan glucocinasa, uno de los sensores de la glucosa en las células beta pancreáticas, así como las proteasas PC2 y PC3. Además, se ha demostrado que las células K transfectadas con el gen de la insulina segregan insulina de manera dependiente de glucosa, y ratones transgénicos que expresan el gen de la insulina bajo el control del promotor de GIP expresan insulina en las células K y son resistentes a desarrollar diabetes tras la destrucción de las células beta del páncreas inducida por estreptozotocina¹³. Estos resultados indican que las células K, cuando expresan insulina por técnicas de ingeniería genética, tienen la capacidad de normali-

TABLA 5. Barreras en el desarrollo y la aplicación de la terapia génica

Comprensión de la función génica
Herramientas en la distribución de los genes
Especificidad celular
Expresión regulada o permanente
Efectos deletéreos
Enfermedades multigénicas
Coste elevado

zar la homeostasis glucídica en ausencia de actividad de las células beta pancreáticas, es decir, en condiciones que suponen el desarrollo de diabetes.

Además de los esfuerzos encaminados a conseguir la expresión de insulina y su secreción regulada en células no beta pancreáticas, diferentes laboratorios buscan estrategias alternativas para tratar, curar o prevenir la diabetes. En este sentido, y a título de ejemplo, cabe mencionar que la administración de un vector adenoviral que codifica para la proteína reguladora de la glucocinasa reduce la glucemia y aumenta la tolerancia a la glucosa en ratones C57BL/6J en los que previamente se había inducido diabetes mediante la administración de una dieta rica en grasas¹⁴. Así pues, es más que probable que, una vez que se consigan mejores vectores para la terapia génica, sea posible utilizar diferentes genes terapéuticos con el objeto de tratar, curar o prevenir distintos tipos de diabetes.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Como hemos mencionado anteriormente, la terapia génica aún está en una fase embrionaria y existe una serie de barreras que suponen un freno en su desarrollo y posterior aplicación (tabla 5). El escaso conocimiento existente sobre la función de los genes que constituyen el genoma humano representa una limitación importante. No obstante, las limitaciones por el tipo de vectores operativos hasta el momento constituyen la principal barrera a superar, y la especificidad celular, la regulación de la expresión en el tiempo y la eliminación de los posibles efectos deletéreos asociados a la utilización de los vectores son cuestiones cruciales que deben resolverse. En este momento se espera una pronta utilización de la terapia génica en el tratamiento de distintas formas de cáncer y en el tratamiento de enfermedades vasculares. No obstante, hará falta esperar más tiempo para poder utilizar la terapia génica en el tratamiento de enfermedades monogénicas. Probablemente, será necesario resolver problemas relativos a la seguridad del tratamiento para poder incluir la terapia génica en el tratamiento o curación de enfermedades multigénicas, como la diabetes. Para

ello, teniendo en cuenta que la terapia convencional existente en la diabetes no se asocia con riesgos notables, será necesario demostrar que los beneficios que ofrece la terapia génica están exentos de riesgos potenciales.

AGRADECIMIENTO

El autor es beneficiario de proyectos de investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2002-02125, GEN2001-4758-C07-01), de la Generalitat de Catalunya (SGR01-118), de la Comunidad Europea (Quality of Life, QLG-CT-1999-00295), de la Fundació Marató de TV3 (300720), y del Instituto de Salud Carlos III (G03/028, G03/212, C03/08).

BIBLIOGRAFÍA

1. www.wiley.co.uk/genmed
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
3. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
4. Morsy MA, Caskey CT. Expanded-capacity adenoviral vectors-the helper-dependent vectors. *Mol Med Today* 1999;5: 18-24.
5. Barzon L, Bonaguro R, Palu G, Boscaro M. New perspectives for gene therapy in endocrinology. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 447-66.
6. Goya RG, Bolognani F, Hereñú CB, Rimoldi OJ. Neuroendocrinology of aging: the potential of gene therapy as an interventive strategy. *Gerontology* 2001;47:168-73.
7. Windeatt J, Southgate TD, Dewey RA, Bolognani F, Perone MJ, Larregina AT, et al. Adenovirus-mediated herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene therapy suppresses oestrogen-induced pituitary prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1296-305.
8. Rivera VM, Ye X, Courage NL, Sachar J, Cerasoli FJR, Wilson JM, et al. Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8657-62.
9. Levine F, Leibowitz G. Towards gene therapy of diabetes mellitus. *Mol Med Today* 1999;5:165-71.
10. Yoon JW, Jun HS. Recent advances in insulin gene therapy for type 1 diabetes. *Trends Mol Medicine* 2002;8:62-8.
11. Yamaoka T. Regeneration therapy of pancreatic β cells: towards a cure for diabetes? *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:1039-43.
12. Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 2000;408:483-8.
13. Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbutt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, et al. Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 2000;290:1959-62.
14. Slosberg ED, Desai UJ, Fanelli B, Denny I, Connelly S, Kaledko M, et al. Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 2001;50:1813-20.