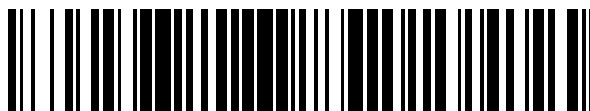


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 099**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02786886 .8**
- 96 Fecha de presentación: **04.12.2002**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1461440**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2004**

54 Título: **Células cultivadas procedentes de islotes pancreáticos**

30 Prioridad:
04.12.2001 US 337205 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
**ORGANOGENESIS INC.
150 DAN ROAD
CANTON, MA 02021, US**

72 Inventor/es:
JIN, Jianjian

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 377 099 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células cultivadas de islotes pancreáticos

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la diabetes y de los islotes pancreáticos y más particularmente se refiere a un método *in vitro* de producción de células progenitoras/precursoras endocrinas de células de islotes pancreáticos que tienen el potencial de diferenciarse en células beta productoras de insulina funcionales.

Antecedentes de la invención

10 La diabetes mellitus es un problema de salud importante, que afecta a aproximadamente 16 millones de personas en los Estados Unidos. La pérdida de suficiente producción de insulina por las células beta de los islotes pancreáticos es una característica tanto de la diabetes del tipo I como de la diabetes tipo II. La reposición de estas células mediante regeneración o trasplante podría ofrecer tratamiento a los diabéticos para toda la vida. Sin embargo, un problema importante en la implementación del tratamiento es la falta de tejido suficiente de células de islotes para trasplante. Se ha informado que en los EE.UU. se dispone solamente de 3.000 donantes humanos de páncreas cada año, sin embargo se diagnostican más de 35.000 nuevos casos de diabetes tipo I cada año. Hay una
15 necesidad continua de un método de tratamiento del paciente diabético mediante el trasplante de células que funcionen de manera similar a las células de los islotes pancreáticos

productoras de insulina.

20 La solicitud internacional de patente WO01/77300 describe el aislamiento de células progenitoras pancreáticas procedentes de páncreas fetal utilizando un medio sin suero. El medio utilizado en WO01/77300 comprende sin embargo un extracto de órgano

Compendio de la invención

25 La invención es un método *in vitro* según la reivindicación 1 para el cultivo de células de los islotes pancreáticos a partir de un páncreas de mamífero, preferentemente de un páncreas humano, y normalmente un páncreas adulto, para producir células precursoras endocrinas que expresan marcadores de progenitores de islotes, pdx1 y nestina. Las células progenitoras / precursoras endocrinas se cultivan en un medio de cultivo definido durante múltiples
30 pases para expandir el número de células. A medida que las células se expanden, se vuelven en más proliferativas y menos diferenciadas. Cuando se obtiene un número suficiente de células, la composición de células producida por el método de la invención que comprende las células progenitoras / precursoras endocrinas, se puede utilizar para hacer implantes de células vivas para el tratamiento de uno o más pacientes con diabetes deficiente en insulina.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la tabla y el gráfico de la duplicación acumulada de la población de células derivadas de islotes humanos H297.

La Figura 2 muestra el análisis de expresión de Pdx1, nestina e insulina por RT-PCR en células derivadas de islotes humanos H297.

Descripción detallada

Una característica de la invención es un método *in vitro* de cultivo de células de islotes pancreáticos de mamífero para producir células precursoras endocrinas que comprende las etapas de:

(a) aislar células de islotes pancreáticos de mamíferos a partir de un páncreas extirpado de un donante;

40 (b) cultivar en serie las células de la etapa (a) en un medio que no contenga suero o extractos de órgano para expandir las células, donde el medio comprende insulina, transferrina, triyodotironina (T3), etanolamina y/o o-fosforil-etanolamina, factor de crecimiento epidérmico, hidrocortisona, selenio, adenina, cloruro de estroncio, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, inhibidor de tripsina de soja (SBTI) y glucosa; y,

(c) continuar con el cultivo de las células para producir células precursoras endocrinas, donde los precursores de células endocrinas expresan los marcadores Pdx1 y nestina.

45 Las células utilizadas para iniciar la composición de células utilizadas en el método de la invención se obtienen a partir de islotes pancreáticos de mamíferos, preferentemente de islotes pancreáticos humanos, y generalmente de células de islotes pancreáticos adultos. Siguiendo los métodos de cultivo descritos en la invención, estas células iniciales de los islotes pancreáticos se cultivan en un medio de cultivo definido y se expanden mediante pases seriados en el medio de cultivo definido, dando como resultado células progenitoras / precursoras endocrinas
50 menos diferenciadas que expresan los marcadores de las células progenitoras de los islotes, PDX-1 y nestina. Las células progenitoras / precursoras endocrinas tienen el potencial de diferenciarse en células beta funcionales que

5 producen insulina. Los términos, "células progenitoras / precursoras endocrinas", "células progenitoras endocrinas", y "células precursoras endocrinas " tal y como se utilizan en la presente invención hacen referencia a células obtenidas a partir de islotes pancreáticos de mamíferos que son capaces de ser cultivadas en pases seriados en el medio de cultivo definido, que son menos diferenciadas que las células iniciales antes del cultivo, y que expresan los marcadores Pdx1 y nestina. En la composición de células producida por el método de la invención, las células progenitoras endocrinas se diferencian convirtiéndose en células beta funcionales productoras de insulina cuando se implantan en un paciente para el tratamiento de diabetes por deficiencia de insulina.

10 El medio utilizado para el cultivo de las células pancreáticas iniciales y los pases seriados para su transformación en células precursoras endocrinas tiene una constitución química definida, en el sentido de que no contiene suero o extractos de órganos. El medio permite cultivar y mantener las células precursoras endocrinas durante varios pases para expandir el número de células de la población. La capacidad de ampliar el número de células es beneficiosa cuando el tejido pancreático humano es limitado. Un beneficio adicional es que se pueden producir varias composiciones de células terapéuticas a partir de un páncreas único.

15 El medio de cultivo definido se compone de una base de nutrientes que suele completarse además con otros componentes. El experto en la técnica puede determinar la base de nutrientes apropiada según las técnicas de cultivo de células animales, que tenga expectativas razonables de éxito en la producción de la construcción de los tejidos de la invención. Están disponibles en el mercado muchas fuentes de nutrientes útiles para poner en práctica la presente invención. Estas incluyen fuentes de nutrientes disponibles en el mercado que suministran sales inorgánicas, una fuente energía, aminoácidos y vitaminas del grupo B, como son el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM); el Medio Mínimo Esencial (MEM); M199; RPMI 1640; el medio de Dulbecco modificado de Iscove (EDMEM). El medio mínimo esencial (MEM) y M 199 requieren suplementos adicionales con precursores de los fosfolípidos y aminoácidos no esenciales ácidos. En el mercado están disponibles mezclas ricas en vitaminas que proporcionan aminoácidos adicionales, ácidos nucleicos, cofactores de enzimas, precursores de fosfolípidos, y sales inorgánicas como son F-12 de Ham, F-10 de Ham, NCTC 109, y NCTC 135. Aunque en concentraciones diferentes, todos los medios básicos proporcionan una fuente de nutrientes básica para las células en forma de glucosa, aminoácidos, vitaminas e iones inorgánicos, junto con otros componentes básicos de los medios.

20 El medio base preferido de la invención comprende una base de nutrientes del medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM) sin calcio o bajo en calcio, sin glucosa, magnesio, y con L-glutamina 4,0 mM, sin piruvato de sodio, y con F-12 de Ham (con glucosa 5 mM) en una proporción de 3 a 1. La concentración final de glucosa de la base se ajustó entre 2 mM y 8 mM aproximadamente, más preferiblemente entre 3 mM y 7 mM aproximadamente, y más preferiblemente a aproximadamente 5 mM.

25 El medio base se complementa con componentes como aminoácidos, factores de crecimiento y hormonas. El medio de cultivo definido para el cultivo de células según el método de la invención se describe en la Patente de Estados Unidos N ° 5.712.163 de Parenteau y en la publicación internacional PCT WO 95/31473. En la técnica se conocen otros medios, tales como los descritos por Ham y McKeehan, en *Methods in Enzymology*, 58:44-93 (1979), u otros medios adecuados de constitución química definida, descritos por Bottenstein et al., en *Methods in Enzymology*, 58:94-109 (1979).

30 En la realización preferida, el medio base se complementa con los siguientes componentes conocidos por el técnico experto en cultivos de células animales: insulina, transferrina, triyodotironina (T3), etanolamina y/o o-fosforil-etanolamina, factor de crecimiento epidérmico, hidrocortisona, selenio, adenina, cloruro de estroncio, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, inhibidor de tripsina de soja (SBTI), y glucosa. Las concentraciones y sustituciones de los suplementos podrán determinarse por el experto en la materia mediante la realización experimentos de valoración.

35 La insulina es una hormona polipeptídica que promueve la captación de glucosa y aminoácidos para proporcionar beneficios a largo plazo durante múltiples pases. Es necesaria la suplementación con insulina o con el factor de crecimiento insulínico (IGF) para cultivos a largo plazo ya que habrá un agotamiento final de la capacidad de las células para captar glucosa y aminoácidos así como también una posible degradación del fenotipo celular. La complementación con insulina es aconsejable para el cultivo en serie y se proporciona al medio en un intervalo de concentraciones preferentemente comprendido entre aproximadamente 0,5 µg / ml y aproximadamente 50 µg / ml, más preferiblemente entre aproximadamente 5 µg / ml y aproximadamente 15 µg / ml, y más preferiblemente de aproximadamente 10 µg / ml. Las concentraciones adecuadas para la administración de suplementos de factor de crecimiento insulínico tales como IGF-1 o IGF-2, utilizados en lugar de insulina pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica mediante la realización de un experimento simple de valoración de los tipos de células elegidos para el cultivo.

40 La transferrina se encuentra en el medio para regular el transporte de hierro. El hierro es un oligoelemento esencial que se encuentra en el suero. Puesto que el hierro en su forma libre puede ser tóxico para las células, en el suero se suministra a las células unido a la transferrina en un intervalo de concentraciones comprendido preferentemente entre aproximadamente 0,05 µg / ml y aproximadamente 50 µg / ml, más preferiblemente entre aproximadamente 5µg / ml y aproximadamente 15 µg / ml, y más preferiblemente aproximadamente 5 µg / ml.

La triyodotironina (T3) es un componente básico y es la forma activa de la hormona tiroidea que se incluye en el medio para mantener las tasas de metabolismo celular. La triyodotironina se añade al medio en un intervalo de concentraciones comprendido entre aproximadamente 0 y aproximadamente 400 pM, más preferiblemente entre aproximadamente 2 pM y aproximadamente 200 pM, y más preferiblemente aproximadamente 20 pM.

5 Se añaden etanolamina y/o o-fosforil-etanolamina, fosfolípidos cuya función es la de importantes precursores en la ruta del inositol y en el metabolismo de los ácidos grasos. El suplemento con lípidos que se encuentran normalmente en el suero es necesario en un medio libre de suero. La etanolamina y/o o-fosforil-etanolamina se añaden al medio a una concentración comprendida entre 10^{-6} M aproximadamente y 10^{-2} M aproximadamente, más preferiblemente a aproximadamente 1×10^{-4} M.

10 Se ha demostrado que la hidrocortisona es beneficiosa en el cultivo de otros tipos de células epiteliales, para promover el fenotipo y por lo tanto mejorar las características diferenciadoras (Rubin et al., J. Cell Physiol., 138:208-214(1986)). La hidrocortisona se puede añadir en un intervalo de concentraciones comprendido entre aproximadamente 0,04 μ / ml y aproximadamente 4,0 μ g / ml, preferentemente 0,4 μ g / ml aproximadamente.

15 Se añade selenio al medio sin suero para volver a suplementar los oligoelementos de selenio que se encuentran normalmente en el suero. El selenio se pueden suministrar en un intervalo de concentraciones comprendido entre aproximadamente 10^{-9} M y aproximadamente 10^{-7} M, más preferiblemente $5,3 \times 10^{-8}$ M aproximadamente.

20 El aminoácido L-glutamina está presente en algunos medios base de nutrientes y se puede añadir en los casos en que no está presente o lo está en cantidades que son insuficientes. La L-glutamina se puede proporcionar también en forma estable, tal y como la que se comercializa con la marca, Glutamax-1™ (Gibco BRL, Grand Island, NY). Glutamax-1™ es la forma estable del dipéptido L-alanil-L-glutamina y se puede usar indistintamente con la L-glutamina y se presenta en concentraciones equimolares como sustituto de la L-glutamina. El dipéptido ofrece estabilidad de L-glutamina, la protege de la degradación durante el tiempo de almacenamiento y durante la incubación, lo que puede llevar a una incertidumbre acerca de la concentración efectiva de L-glutamina en el medio. Por lo general, el medio base se complementa con glutamina en un intervalo de concentraciones de L-glutamina comprendido preferentemente entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, más preferentemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 8 mM, y más preferiblemente con glutamina 6 mM.

25 Los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) también se pueden añadir al medio para ayudar en el establecimiento de los cultivos por medio del incremento celular y de la siembra. Se puede utilizar EGF en forma nativa o en forma recombinante. Es preferible el uso de las formas humanas, nativas o recombinantes de EGF en el medio cuando se prepara un análogo de piel que no contenga componentes biológicos no humanos. EGF es un componente opcional y se podría proporcionar a una concentración comprendida entre aproximadamente 1 y 15 ng / ml, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y 10 ng / ml.

30 Normalmente el medio definido anteriormente se prepara como se indica más abajo. Sin embargo, debe entenderse que los componentes del medio definido se pueden preparar y mezclar utilizando cualquier metodología convencional existente compatible con sus propiedades físicas. Es bien conocido que se pueden sustituir determinados componentes con un análogo apropiado o con un agente que actúe como un equivalente funcional por motivos de disponibilidad o económicos y llegar a un resultado similar. Se pueden sustituir los factores de crecimiento naturales por factores de crecimiento recombinantes o sintéticos que tengan cualidades y resultados similares cuando se utilizan en el cultivo. La concentración óptima de los suplementos puede tener que ajustarse ligeramente ya que las células derivadas de diferentes especies de mamíferos y las líneas celulares de distintos donantes variaran su rendimiento en función de su edad, tamaño, y la salud. Los experimentos de valoración se realizan con diferentes concentraciones de un componente hasta llegar a la concentración óptima para ese componente.

35 Los medios utilizados según el método de la presente invención son estériles. Los componentes estériles se adquieren o se esterilizan por procedimientos convencionales, tales como la filtración, después de su preparación. En los ejemplos siguientes se utilizaron los procedimientos asépticos adecuados. Se combina DMEM y F-12, y a continuación se añaden los componentes individuales para completar el medio. Se pueden almacenar disoluciones de reserva de todos los componentes a -20° C, con la excepción de la fuente de nutrientes que se pueden almacenar a 4° C. Todas las disoluciones de reserva se preparan a unas concentraciones finales de 500 veces las mencionadas anteriormente. Se prepara una disolución de reserva de insulina, transferrina, y triyodotironina (todas de Sigma) de la siguiente manera: la triyodotironina disuelta inicialmente en etanol absoluto se disuelve en ácido clorhídrico 1N (HCl) en una proporción de 2:1. La insulina se disuelve en HCl diluido (aproximadamente 0,1 N) y la transferrina se disuelve en agua. Posteriormente se mezclan los tres y se diluyen en agua a una concentración de 500 veces. La etanolamina y el o-fosforil-etanolamina se disuelven en agua a una concentración de 500 veces y se esterilizan por filtrado. La hidrocortisona se disuelve en etanol absoluto y se diluye en una disolución salina amortiguada con fosfato (PBS). El selenio se disuelve en agua a una concentración de 500 veces y se esteriliza por filtrado. El EGF estéril se adquiere y se disuelve en PBS. La adenina es difícil de disolver, pero puede disolverse por cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se puede añadir albúmina de suero humano (HSA) o albúmina de suero bovino (BSA) para mantener la actividad de las disoluciones de reserva EGF durante un almacenamiento prolongado. El medio puede ser utilizado inmediatamente después de la preparación o

almacenarse a 4 ° C. Si se almacena, el EGF no debe añadirse hasta el momento del uso.

Una formulación del medio de cultivo preferida para el cultivo en serie de las células precursoras endocrinas de acuerdo con el método de la invención comprende: una mezcla base 3:1 del medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (sin glucosa, sin calcio, con 4 mM de L-glutamina) y del medio F-12 de Hams, y la base se complementa con los siguientes componentes a la concentración final de cada componente que se indica: L-glutamina 6 mM (o equivalente), 10 ng / ml de factor de crecimiento epidérmico, 0,4 µg / ml de hidrocortisona, etanolamina 1 x 10⁻⁴ M, o-fosforil-etanolamina 1 x 10⁻⁴ M, 5 µg / ml de insulina, 5 µg / ml de transferrina, triyodotironina 20 pM, 6,78 µg / ml de selenio, 24,4 µg / ml de adenina, 266,6 µg / ml de cloruro de estroncio, piruvato de sodio 100 mM, 10 mM de aminoácidos no esenciales, 12,5 mg / ml de inhibidor de tripsina de soja (SBTI), y glucosa 5 mM.

Las células precursoras endocrinas se cultivan en un recipiente adecuado para el cultivo de células animales o de tejidos, tales como placas de cultivo, un matraz, o botellas de cultivo rotatorio, que permiten la formación de una estructura tridimensional similar a un tejido. Las superficies adecuadas para el crecimiento celular sobre las que las células pueden crecer pueden ser de cualquier material compatible biológicamente al cual las células se puedan adherir y que proporcionen un medio de anclaje para formar la construcción de la matriz celular. Se pueden usar como superficies para el crecimiento de las células, materiales tales como vidrio, acero inoxidable, polímeros, incluyendo el policarbonato, poliestireno, cloruro de polivinilo, polivinilideno, polidimetilsiloxano, fluoropolímeros y propileno etileno fluorado; y sustratos de silicio, incluyendo cristales de silicio fundido, de polisilicio, o de silicio. El material de la superficie para el crecimiento celular puede estar tratado o modificado químicamente o, cargado electrostáticamente, o recubierto con sustancias biológicas tales como péptidos. Un ejemplo de un recubrimiento con péptidos es el péptido RGD.

Las células se pueden cultivar en una superficie para crecimiento celular sólida o en una superficie para crecimiento celular con poros, como una membrana porosa, que comunica la superficie superior e inferior de la membrana para permitir el contacto bilateral del medio con el cultivo. El contacto bilateral permite al medio ponerse en contacto con ambas superficies superior e inferior del cultivo para una máxima superficie de exposición con los nutrientes contenidos en el medio. Los poros de la superficie de crecimiento permiten el paso del medio de cultivo para suministrar a la parte inferior del cultivo a través de la membrana, lo que permite que las células se alimenten de forma bilateral. Los recipientes de cultivo que incorporan una membrana porosa conocidos en la técnica son los preferidos para llevar a cabo la invención y se describen en varias patentes de Estados Unidos del sector, algunos de los cuales están disponibles comercialmente, como por ejemplo: EE.UU. n° 576.6937, EE.UU. n° 5.466.602, EE.UU. n° 5.366.893, EE.UU. n° 5.358.871, EE.UU. n° 5.215.920, EE.UU. n° 5.026.649, EE.UU. n° 4871674, EE.UU. n° 4608342. El tamaño de poro preferido es aquel que es lo suficientemente pequeño como para no permitir el crecimiento de células a través de la membrana, pero lo suficientemente grande como para permitir el paso libre de los nutrientes contenidos en el medio de cultivo a la superficie inferior del cultivo de células, por ejemplo por capilaridad. El tamaño preferido de los poros es inferior a aproximadamente 3 micras, pero se emplean poros cuyo tamaño oscila entre aproximadamente 0,1 micras y aproximadamente 3 micras, más preferiblemente entre aproximadamente 0,2 micras y aproximadamente 1 micra y más preferiblemente entre aproximadamente 0,4 micras y aproximadamente 0,6 micras.

Los cultivos se mantienen en una incubadora para garantizar las condiciones ambientales suficientes de temperatura controlada, humedad, y mezcla de gases para el cultivo de las células. Las condiciones preferidas se encuentran entre aproximadamente 34 ° C y aproximadamente 38 ° C, más preferentemente 37± 1°C. con una atmosfera que contiene entre 5-10±1% de CO₂ aproximadamente y una humedad relativa (Rh) del 80-90% aproximadamente.

El medio de cultivo definido permite el establecimiento de cultivos primarios y de pases seriados de los cultivos, proporcionando así un mayor número de células expandidas para uso en ensayos o terapias. Uno de los obstáculos en el cultivo de las células de los islotes humanos es la proliferación excesiva de fibroblastos que podría eclipsar el crecimiento de las células epiteliales diana, una sub-población con características de células progenitoras/ precursoras de los islotes. El cultivo de las células con el medio definido ha superado este problema. Las células que crecen a partir de islotes humanos utilizando este medio definido han mostrado una morfología predominantemente similar a la epitelioide y expresan el marcador epitelial citoqueratina.

En cada pase las células continúan mostrando los marcadores específicos para las células progenitoras y para las células precursoras endocrinas, incluyendo pdx1 y nestina. Las células cultivadas muestran una disminución en la expresión de marcadores de células de los islotes lo que indica que las células pueden indiferenciarse con cada pase; sin embargo, las células mantienen el fenotipo progenitoras a lo largo de cada pase.

Pdx1, un factor de transcripción conocido también como IDX-1, es un conocido marcador de diferenciación pancreática y un regulador del desarrollo pancreático. (Jonsson et al. Nature 371:606 (1994) y Offield et al. Development 122:983 (1996)).

La nestina es un marcador celular del desarrollo de las células de los islotes pancreáticos. (Lendahl, et al. Cell 60:585-595 (1990) y Zulewski et al. Diabetes. 2001 Mar; 50 (3):521-33.)

La diferenciación de las células precursoras endocrinas se puede inducir utilizando medios químicos o físicos, tal como completando el medio de cultivo con un agente que promueve la diferenciación de células beta productoras de insulina o por medio de la formación de grupos de células en una matriz, como una matriz extracelular. La diferenciación de las células inducida por un implante (*in vivo*) en el entorno adecuado inducirá la diferenciación de las células. Las células se pueden implantar por vía subcutánea, en la submucosa del intestino delgado, o bajo la cápsula renal.

Los siguientes ejemplos proporcionan una mejor explicación de la práctica de la presente invención y no deben interpretarse en ningún caso como una limitación del alcance de la presente invención. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden hacer diversas modificaciones en los métodos descritos en este documento sin apartarse del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de Células Pequeñas Pancreáticas a partir de páncreas de cadáveres humanos.

Se realizó el aislamiento de islotes pancreáticos humanos por el método semi-automatizado propuesto originalmente por Ricordi (Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, et al. Método automatizado para el aislamiento de islotes pancreáticos humanos. *Diabetes* 1988 37:413-420). Los páncreas obtenidos se dilataron por infusión intraductal de HI Liberase (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) o de colagenasa Serva (Crescent Chemical, Brooklyn, NY) (Linetsky E, Bottino R, Ehmann R, et al. Aislamiento mejorado de islotes humanos con un nueva mezcla de enzimas, Liberase. *Diabetes* 1997 46:1120-1123), y luego se disociaron utilizando el método automático (Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, et al. Método automático para el aislamiento de islotes pancreáticos humanos. *Diabetes* 1988 37:413-420). La separación se produce durante un proceso de digestión continua con una duración aproximada de 12-30 minutos, tras lo cual el circuito de digestión se enfrió y el tejido se recogió en 8 litros aproximadamente de disolución fría de Hanks y se lavó. Los islotes liberados fueron separados de los de tejidos no-islotes en un gradiente continuo de Euroficoll en un separador celular COBE 2991.

Las preparaciones de islotes purificados parcialmente procedentes del separador celular Cobe se hicieron pasar a través de una serie de pantallas de malla de acero de diferentes tamaños (poros de 100 a 25 μ), y el tejido que se recuperó se puso a cultivar directamente sobre plástico en el medio de cultivo y se permitió su extensión.

Ejemplo 2: El aislamiento de Células de los Islotes Porcinos

Las células de los islotes pancreáticos se aislaron de un donante porcino

y se colocaron utilizando el medio definido para obtener un cultivo con un fenotipo similar al del epitelio. El procedimiento de aislamiento de las células de los islotes porcinos es el siguiente. Se dispusieron en un autoclave dos recipientes Nalgene, varios tubos de centrifugado de fondo redondo de 50 ml, bandejas, y las pantallas. Se prepararon dos disoluciones, la disolución de conservación de órganos UW -D y tres concentraciones de la disolución de FICOLL, 27%, 24,6% y 11%.

La disolución de conservación de órganos UW -D se preparó de acuerdo a las especificaciones dadas por Sumitomo et al (1989 *Transplantation* Julio, 48 (1): 1-5). Un litro de disolución de conservación de órganos 1X UW-D consiste en 35,83 g de ácido lactobiónico (Aldrich, Milwaukee, WI), 17,83 g de rafinosa (Sigma, St. Louis, MO), 1,23 g de MgSO₄ (Sigma, St. Louis, MO), 0,92 g de glutatión (Sigma, St. Louis, MO), 0,136 g de alopurinol (Sigma, St. Louis, MO), y 3,40 g de fosfato de potasio monobásico (Sigma, St. Louis, MO) y agua doblemente destilada. Posteriormente esta disolución se filtró y esterilizó utilizando un filtro de 0,2 μ y se almacenó a 4 ° C hasta su utilización.

Las disoluciones FICOLL se prepararon a partir de una base Eurocollins. La disolución base Eurocollins (pH 7,3), consiste en 4,1 g de fosfato de potasio monobásico (Sigma, St. Louis, MO), 14,8 g de fosfato de potasio dibásico (Sigma, St. Louis, MO), 2,24 g de cloruro de potasio (Sigma, St. Louis, MO), 1,68 g de bicarbonato sódico (Sigma, St. Louis, MO), 70 g -D-Glucosa (Sigma, St. Louis, MO) y una cantidad adecuada de agua doblemente destilada para completar hasta 2 litros. Se añadió un litro de disolución base de Eurocollins a 500 g de FICOLL (Sigma, St. Louis, MO). La disolución FICOLL fue incorporada a la disolución, un proceso de dilución que duró aproximadamente 2 horas. Se añadieron otros 500 ml de Eurocollins. La disolución se analizó por BRIX e intervalos de índice refractario, 28-28,4 y 1,3774 1,3779_{n₀}, respectivamente. Se añadió la base Eurocollins adicional, según fue necesaria. Luego la disolución de FICOLL se esterilizó por filtración utilizando un MILLIPORE-MILLIPACK (Millipore, Bedford, MA) y se distribuyó en botellas estériles de 1 litro. Para preparar una disolución de 24,6% de FICOLL se diluyeron 456 ml de la reserva de FICOLL diluida (27%) con 44 ml de disolución Eurocollins. Para crear una disolución de 11% de FICOLL se diluyeron 204 ml de FICOLL de reserva con 296 ml Eurocollins. Las disoluciones de FICOLL se almacenaron a 5 ° C hasta su utilización.

El páncreas se obtuvo de una raza mixta cerdos con un peso superior a 40 libras (20 kg aproximadamente). El cerdo había sido alimentado con una dieta normal y estuvo en ayunas durante 24 horas antes de la cirugía. Para la recogida y transporte del páncreas se utilizó un refrigerador con hielo, 500 ml de disolución UW fría, jeringas de 10 y 30 c.c. y angiocatéteres de calibre 20. Una vez que el páncreas fue extirpado, fue perfundido con una disolución fría

de UW hasta que se hinchó. Después se colocó en un recipiente Nalgene de 250 ml y se colocó en hielo.

Durante la recogida del páncreas, se calentó un baño de agua a 41 ° C y se preparó una disolución de Liberase PI (Roche Molecular Biochemists, Indianapolis, IN) esterilizada por filtración. A fin de facilitar la infusión de Liberasa en el páncreas, se colocaron las bandejas de disección, pinzas grandes y pequeñas, angiocatéteres extra, jeringas de 5 30 y 60 c.c. y los recipientes Nalgene, en el campo estéril de las cabinas de seguridad biológicas. Posteriormente el órgano se retiró del hielo y se colocó en la bandeja de disección. Se realizó una perfusión de liberasa PI en el órgano. Este paso se realizó lentamente para no alterar las cánulas colocadas allí durante la cirugía y también para evitar el reflujo. Una vez que el órgano estuvo relleno, se dispuso en otro recipiente con Nalgene y con algo de disolución Liberase adicional. El contenedor fue sellado y colocado en un baño de agua a 41° C para su incubación.

10 Se llevó a cabo la digestión del páncreas hasta que parecía que empezaba a separarse, un proceso que duró entre 15-30 minutos. Antes de devolver el órgano a la cabina de seguridad biológica estéril, el contenedor Nalgene se roció con alcohol etílico para asegurar la esterilidad. Posteriormente el órgano se colocó en la pantalla de separación y se raspó suavemente con rascadores de células durante 5-10 minutos. El medio de lavado se añadió frecuentemente para facilitar la disociación de los tejidos. El medio de lavado consistía en una disolución de Hank modificada equilibrada con una disolución salina (HBSS) (con calcio y magnesio, sin rojo fenol) (JRH Biosciences, Lenexa, KS), suero de caballo (JRH Biosciences, Lenexa, KS), estreptomycin 10.000 ug / ml (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), sulfato de gentamicina 50 mg / mL (OIP / N 100-50), fungizone 250 mg / ml (Invitrogen Life Technologies Carlsbad, CA), Anfotericina B (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), y desoxicolato sodio 205 mg / ml (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad,CA).

20 La parte inferior de la pantalla se raspó para asegurar que no se dejaban células de los islotes. La disolución de lavado / células se colocó en frascos grandes de centrifuga y se centrifugó a 700 revoluciones por minuto durante un minuto y medio. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente. El contenido de cada botella se volvió a suspender utilizando el medio de lavado que había se consolidado en la botella centrifuga. Se añadió medio de lavado hasta que la botella estuvo llena y luego se centrifugó otra vez. Posteriormente el sobrenadante se aspiró y se determinó el volumen de tejido.

30 Para iniciar la separación por densidad, se añadieron 5 ml de 24,6 % de FICOLL por cada ml de tejido. Después la suspensión se mezcló bien y se agregó a un tubo de fondo redondo de 50 ml. En cada tubo, no debería haber más de 12 ml de esta suspensión. Se añadió una segunda capa de 27% de FICOLL en la parte superior de la suspensión. Una tercera capa de 11% de FICOLL se añadió a la parte superior del gradiente. Se tuvo un cuidado especial para asegurarse que las capas no se mezclasen. Posteriormente los tubos se cargaron en una centrifugadora y se centrifugaron a 1700 rpm durante 18 minutos. A fin de mantener el gradiente, la aceleración de la centrifuga se ralentizó y se desconectó el freno.

35 Para recoger las células de los islotes, se eliminó la capa interfaz de 11 a 24,6%. Se añadieron las células de los islotes y el medio de lavado a un tubo de lavado y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y las células de los islotes se resuspendieron en el medio de lavado. Esta resuspensión y centrifugación se repitió tres veces. Entonces las células de los islotes se resuspendieron con el medios de cultivo y se sembraron.

Ejemplo 3: Cultivo de las células de los islotes

40 A continuación las células de los islotes obtenidas por el método del ejemplo 1 se sembraron con cultivo de tejidos hasta 60 mm en placas de cultivo tratadas. En el medio utilizado en este ejemplo incluye: una mezcla 3:1 de medio base Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (sin glucosa, sin calcio, con 4 mM de L-glutamina) y medio F-12 de Hams, y la base se complementa con los siguientes componentes a la concentración final de cada componente que se indica: L-glutamina (o equivalente) 2 mM, 10 ng / ml de factor de crecimiento epidérmico, 0,4 µg / ml de hidrocortisona, etanolamina 1 x 10⁴ M, o-fosforil-etanolamina 1 x 10⁴ M, 5µg / ml de insulina, de 5 µg / ml de transferrina, 20 pM triyodotironina, 6,78 ng / ml de selenio, el 24,4 µg / ml de adenina, 266,6 µg / ml de cloruro de estroncio, piruvato de sodio 100 mM, 10 aminoácidos no esenciales mM, 12,5 mg / ml de inhibidor tripsina de soja (SBTI), y glucosa 5 mM.

50 Las células de los islotes humanos se cultivaron a partir de cultivos primarios derivados de tejido pancreático como se describe en el Ejemplo 1 y se mantuvieron hasta el pase 8 en el medio de cultivo definido (identificado como "H297" en las figuras). La Figura 1 muestra la duplicación de la población acumulada para cada pase.

55 Las células de los islotes humanos se sembraron en placas de cultivo (previamente recubiertas con 0,05 mg / ml de colágeno durante 30 minutos) y se propagaron a partir de los grupos de islotes desde el primer día después de la siembra, y crecieron lentamente durante la primera semana. Alrededor del día 10, comenzaron a surgir células pequeñas con actividad mitótica y a formar colonias. Estas colonias se expandieron rápidamente y con el tiempo se fusionaron para formar una población con morfología de epitelio a los 3-4 días. Después de separar las células del cultivo y pasarlas a nuevas placas de cultivo, las células sub-cultivadas proliferaron muy rápido con un tiempo de duplicación aproximado de 30 horas. Estas células mantuvieron la capacidad proliferativa durante 7 pases por lo menos, y la duplicación total de la población alcanzó un máximo de 9.

Ejemplo 4: Estudios de Caracterización

5 Para caracterizar la población de células expandidas, se examinó la expresión de los marcadores Pdx1 y nestina por los islotes madre / progenitores, también se examinó por RT-PCR la hormona insulina de los islotes, como se muestra en la Figura 2. Las células H297 de los pases 0, 2, 4, y 8 resultaron todas positivas para la expresión de Pdx1. El nivel de expresión de Pdx1 parece mantenerse relativamente constante durante todo el período de cultivo. También se detectó un patrón de expresión para la nestina similar en las células de todos estos pases. La expresión continuada de Pdx1 y de nestina en las células expandidas sugiere la posible existencia de células madre / progenitoras de los islotes en el medio de cultivo, e indica el potencial de la estrategia de expansión para terapia con base celular. La expresión de la insulina, como se esperaba, sólo puede detectarse en las células de los primeros 10 pases. En el pase 4, prácticamente no puede detectarse ninguna señal de mRNA de insulina. Este resultado concuerda con el resultado de la inmunofluorescencia en él se observaron algunas células positivas para insulina en el pase 4 (datos no mostrados). La disminución de la señal de insulina sugiere que las células expandidas son más proliferativas y menos diferenciadas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cultivo *in vitro* de células de islotes pancreáticos de mamíferos para producir células precursoras endocrinas, que comprende las etapas:

- 5 (A) aislar las células de los islotes pancreáticos de mamíferos a partir de un páncreas extirpado de un donante;
- (B) cultivar en serie las células de la etapa (a) en un medio que no contiene suero o extractos de órganos para expandir las células, en donde el medio comprende insulina, transferrina, triyodotironina (T3), etanolamina y/o o-fosforil-etanolamina, factor de crecimiento epidérmico, hidrocortisona, selenio, adenina, cloruro de estroncio, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, inhibidor de tripsina de soja (SBTI) y glucosa; y,
- 10 (C) continuar con el cultivo de las células para producir células precursoras endocrinas, donde células precursoras endocrinas expresan los marcadores pdx 1 y nestina.

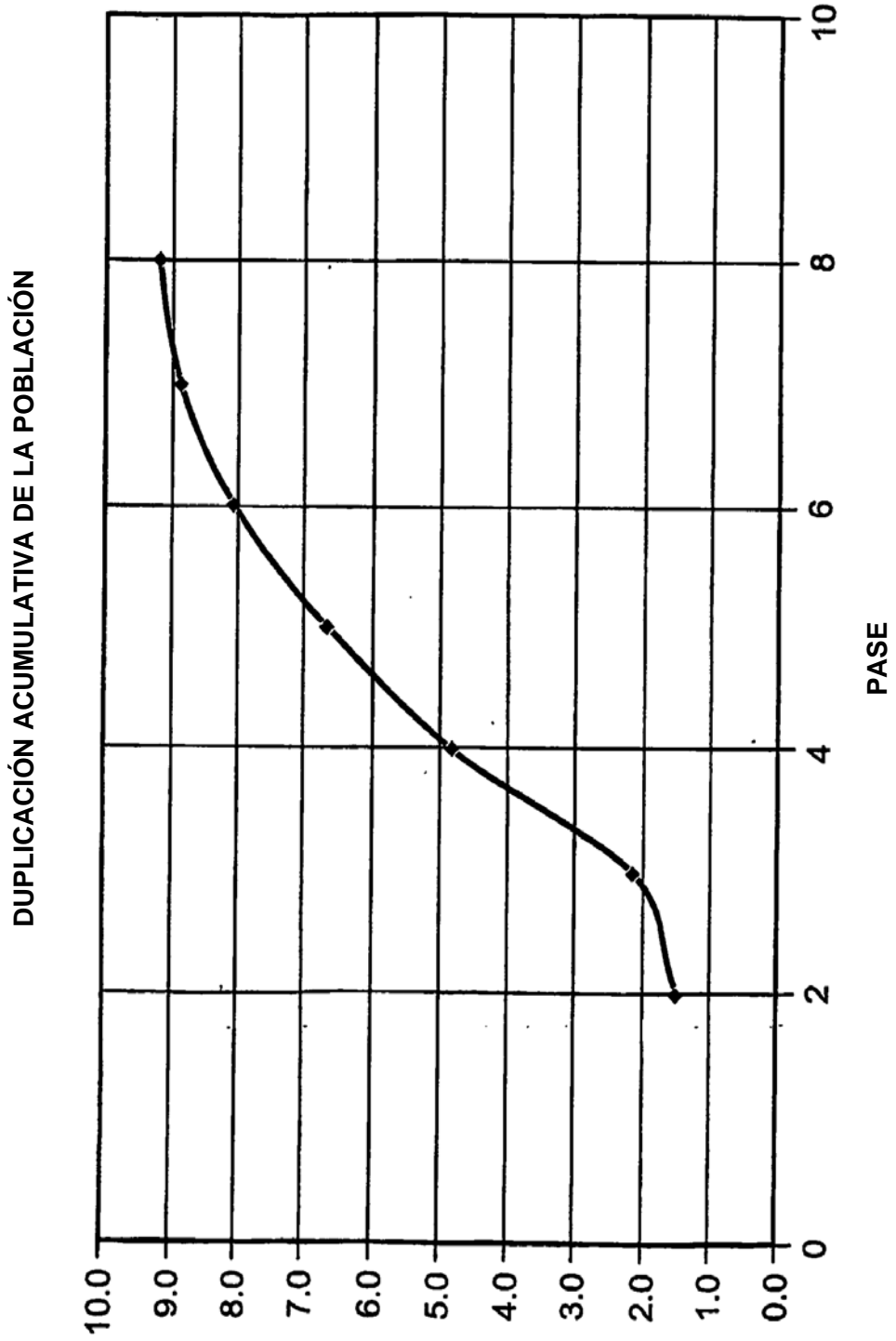


FIG. 1

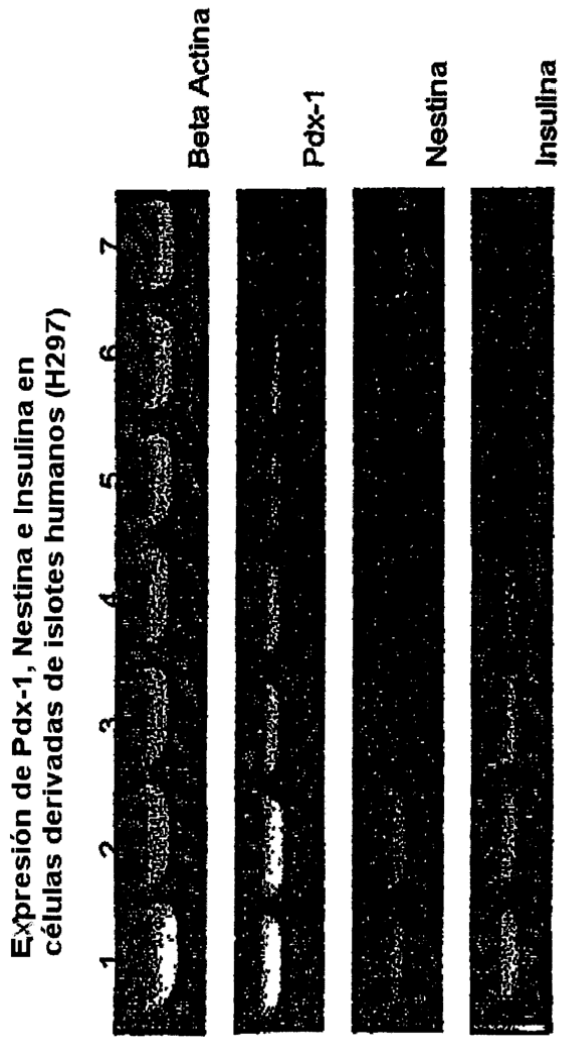


FIG. 2