

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 505**

51 Int. Cl.:
A61K 35/39 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01979134 .2**
96 Fecha de presentación: **16.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1333846**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54 Título: **Preparación y xenotrasplante de islotes de cerdo**

30 Prioridad:
17.10.2000 NZ 50761600
02.11.2000 NZ 50796300

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2012

73 Titular/es:
Diatranz Otsuka Limited
19 Laureston Avenue Papatoetoe
Auckland 2025, NZ

72 Inventor/es:
ELLIOTT, Professor Robert Bartlet;
BASTA, Guiseppo;
LUCA, Giovanni y
CALAFIORE, Riccardo

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 386 505 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

Preparación y xenotrasplante de islotes de cerdo

5 La presente invención se refiere a mejoras en el tratamiento y/o relacionadas con el tratamiento de la diabetes utilizando xenotrasplante. Más en particular, pero no exclusivamente, la presente invención se refiere a la preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables viables y/o al tratamiento de un paciente mamífero (incluyendo seres humanos) que padece diabetes, lo que supone el trasplante al mamífero de islotes de cerdo viables capaces de producir insulina en el hospedador y el uso asociado de células de Sertoli en el procedimiento.

10 **Antecedentes**

15 La diabetes mellitus de tipo 1 (dependiente de insulina) es un trastorno endocrino habitual que produce una morbilidad y una mortalidad sustanciales, y genera costes económicos considerables a pacientes individuales y sistemas de salud pública.

20 El tratamiento con insulina, aunque sirve para salvar vidas, a menudo no proporciona un control suficiente de la glucosa en sangre para evitar las temidas complicaciones de la enfermedad, lo que ha impulsado investigaciones intensivas respecto a mejores métodos para mantener la normoglucemia.

25 Entre las estrategias de tratamiento más recientes que se han propuesto, la que ha recibido una mayor atención a nivel mundial es el trasplante de células de los islotes pancreáticos, obtenidos de otros seres humanos o de animales. Esto es debido a que el trasplante puede restaurar no sólo las unidades secretoras de insulina, sino también el ajuste preciso y fino de la liberación de insulina en respuesta a múltiples señales neurales y humorales que aparecen dentro y fuera de los islotes de Langerhans.

30 El trasplante de células humanas de los islotes está limitado por la escasez de tejido humano de los islotes. Actualmente, el uso de células de los islotes de cerdo se contempla como la alternativa más prometedora puesto que:

- 35 I. el suministro de células de cerdo se puede expandir rápidamente optimizando el suministro de animales donantes;
- II. la insulina de cerdo y la insulina humana presentan enormes similitudes estructurales; y
- III. los niveles fisiológicos de glucosa en cerdos son similares a los de los humanos.

40 La justificación de este enfoque en el tratamiento (denominado "xenotrasplante") es que los islotes de cerdo implantados tienen el potencial de mimetizar la respuesta fisiológica normal de la insulina en diabéticos de tipo 1, de manera que se pueden conseguir niveles de glucosa en sangre cercanos a la normalidad sin la administración de insulina o con un requerimiento reducido. Como consecuencia, se pueden evitar las complicaciones a largo plazo de la diabetes y los pacientes experimentarán una menor hipoglucemia de la que padecen con los regímenes de insulina "intensivos" recomendados actualmente.

45 El aloinjerto (trasplante dentro de la misma especie) de islotes pancreáticos, separados de los órganos de donantes humanos, podría inducir a la remisión completa de la hiperglucemia y a la interrupción del tratamiento con insulina exógena en pacientes con diabetes mellitus de tipo 1. No obstante, el éxito completo de este enfoque aún se ve obstaculizado por varios problemas, y en particular:

- 50 a) la desconexión de los islotes del páncreas nativo interrumpe una vasculatura neuro- y micro-capilar fina, así como una red reguladora humoral que podría provocar isquemia, apoptosis y liberación de mediadores de la reacción inflamatoria;
- b) los islotes aislados son muy vulnerables a condiciones inmunológicas y ambientales adversas.

55 A pesar de que el rechazo inmunitario es un problema importante para el trasplante, problemas con la longevidad del trasplante de los islotes no relacionados con el sistema inmunitario también pueden impedir un trasplante con éxito de células de los islotes. Esto se puede adscribir a condiciones ambientales locales desfavorables debido a la naturaleza heterotópica de la anatomía del sitio del trasplante (normalmente el hígado) que difiere enormemente del páncreas nativo, a mediadores no específicos de la inflamación, apoptosis inducida por células, u otros factores desconocidos. Sin embargo, la renovación celular extremadamente lenta contribuye significativamente a acortar la vida útil funcional de ese tejido diferenciado. Por tanto se deberían llevar a cabo intentos para expandir la masa celular injertada original.

65 Estudios previos que informan sobre la inducción de la liberación de insulina a partir de islotes completos, que habían sido expuestos a hormonas, tales como la prolactina, lactógeno placentario humano, y hormonas del crecimiento, no han conseguido demostrar un incremento significativo en la tasa de replicación celular de los islotes¹,

5 difuminando así la interpretación sobre el origen y los mecanismos de la secreción incrementada de insulina. En estudios posteriores, se demostró que las células de los islotes de seres humanos adultos se expandían durante el mantenimiento de un cultivo *in vitro*, en matrices especiales de tejido artificial, y en presencia de factores de crecimiento². No obstante, en este caso particular, los islotes habían sido dispersados para formar células aisladas y habían sido cultivados como monocapas celulares. Además, no había una correlación significativa entre el aumento del índice mitótico celular y el incremento en la concentración de insulina. Por último, aún resulta impredecible el impacto sobre el trasplante de los agregados de células de los islotes, antes que de los islotes completos, y no se ha seguido investigando.

10 En trabajo previo, particularmente como se detalla en el documento PCT/NZ01/0009 hemos descrito la preparación y uso de islotes de cerdo xenotrasplantables para el tratamiento de la diabetes.

15 Selawry y col. (Cell Transplant; 5: 517-524 (1996)) describe defectos inducidos por células de Sertoli sobre las características funcionales y estructurales de islotes aislados de cerdo neonatal. El documento de EE.UU. 5.849.285 describe el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria con células de Sertoli y el co-cultivo *in vitro* de células de mamífero con células de Sertoli.

Objeto

20 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método mejorado de preparación de islotes de cerdo que produzca islotes viables para el xenotrasplante en un paciente mamífero que sean capaces de producir insulina en el hospedador mamífero, así como la preparación de los islotes así producidos, o independientemente de cómo se hayan obtenido, o de una forma similar.

25 Alternativa o adicionalmente, es otro objeto proporcionar un método mejorado para el tratamiento de un paciente mamífero que padece diabetes lo que supone el xenotrasplante de islotes de cerdo al paciente mamífero.

30 Alternativa o adicionalmente, es otro objeto al menos proporcionar a la comunidad pública o médica un enfoque alternativo útil al tratamiento de la diabetes.

Declaraciones de la invención

35 En un primer aspecto la invención consta de un método para la preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables capaces de producir tras el xenotrasplante insulina de cerdo en un receptor mamífero apropiado, el método que incluye o comprende:

(i) la obtención del páncreas de lechones al final o cerca de su gestación completa, y

40 (ii) la extracción de los islotes procedentes de un cultivo de los páncreas obtenidos utilizando una colagenasa adecuada,

(iii) siendo el cultivo de los páncreas obtenidos:

45 a) de páncreas obtenidos y reducidos mecánicamente, y

b) una albúmina de mamífero de soporte sustancialmente exenta de agentes microbianos no humanos, en donde los páncreas y/o los islotes se someten al agente protector contra traumatismos lignocaina, y donde los islotes se mezclan y/o se co-cultivan con células de Sertoli.

50 Preferentemente, los islotes (al menos en alguna fase durante el desarrollo del método) se exponen a nicotinamida.

Los lechones se encuentran a entre -20 y +20 días de su gestación completa.

55 Preferentemente lechones se encuentran a entre -7 y +10 días de su gestación completa.

Preferentemente, la albúmina de mamífero es seroalbúmina humana (HSA).

Preferentemente, la colagenasa se selecciona entre Liberase® humana y Liberase® porcina.

60 Preferentemente, dicha Liberase® es Liberase® humana.

Preferentemente los islotes se tratan con nicotinamida después de su extracción del páncreas.

65 Preferentemente, el método incluye la etapa adicional de tratar los islotes con IGF-1 o el tripéptido N-terminal del IGF-1 (GPE).

Preferentemente, la preparación o aislamiento de las células de Sertoli incluye el uso o exposición a un tampón para reducir selectivamente las células germinales.

Preferentemente, el tampón es clorhidrato de tris-(hidroximetil)-aminometano.

5 Preferentemente, la relación empleada de células de Sertoli a islotes es sustancialmente de 10-1000 células de Sertoli/islote.

10 En otro aspecto, la invención consta de una preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables preparados según el método anterior.

En el presente documento también se describe un método de preparación de un dispositivo implantable que incluye al menos un islote de cerdo xenotrasplantable capaz de producir tras su xenotrasplante insulina porcina en un mamífero receptor adecuado, dicho método que comprende:

15 (i) la obtención del páncreas de un lechón o lechones a entre -20 y +20 días de su gestación completa,

20 (ii) la reducción mecánica de los páncreas obtenidos en presencia de un agente protector de los islotes contra traumatismos y la producción de un cultivo de los páncreas obtenidos reducidos mecánicamente ayudado con seroalbúmina humana (HSA),

(iii) el aislamiento de las células de los islotes a partir del cultivo del páncreas obtenido y reducido mecánicamente utilizando una colagenasa seleccionada entre Liberase® humana y Liberase® porcina, y

25 (iv) la incorporación de las células de los islotes en un dispositivo adecuado para la implantación en un mamífero receptor,

30 en donde la nicotinamida se introduce en los islotes o las células de los islotes antes de la incorporación en una cualquiera o más fases del procedimiento, y

en donde, al menos en el grado necesario para convertir las células de los islotes que producen insulina no porcina en células de los islotes que producen insulina porcina, en alguna fase del procedimiento con la presentación de los islotes y/o células de los islotes al IGF-1 o el tripéptido N-terminal del IGF-1 (GPE), y

35 en donde (al menos en alguna fase del método) las células de los islotes están asociadas a células de Sertoli.

Preferentemente, las células de Sertoli se utilizan dentro del dispositivo para evitar o reducir sustancialmente el rechazo inmunitario del tejido.

40 Preferentemente, las células de Sertoli se mezclan con los islotes, antes de su inserción en, o dentro, del dispositivo.

Preferentemente, la preparación o aislamiento de las células de Sertoli incluye el uso o exposición a un tampón para reducir selectivamente las células germinales.

45 Preferentemente, el tampón es clorhidrato de tris-(hidroximetil)-aminometano.

Preferentemente, las células de Sertoli se co-cultivan con los islotes antes de su incorporación.

50 Preferentemente, la relación empleada de células de Sertoli a islotes es sustancialmente de 10-1000 células de Sertoli/islote.

Más preferentemente, las células de Sertoli se mezclan con los islotes sustancialmente a una relación de 10-1000 células de Sertoli/islote.

55 Preferentemente, en el aislamiento de las células de los islotes se utiliza un antibiótico.

Preferentemente, el antibiótico es ciproxina.

60 Preferentemente, el agente protector de los islotes contra traumatismos es la lignocaína.

El dispositivo puede ser un tubo de colágeno vascularizado subcutáneo adecuado y una o más células de los islotes se confinan dentro del tubo.

65 El dispositivo puede ser una cápsula formada de un material xenotrasplantable biocompatible que, *in vivo*, es poroso tanto a la glucosa como a la insulina, y una o más células de los islotes se encuentran encapsuladas dentro de la cápsula.

Preferentemente, dicho material biocompatible es un alginato adecuado.

Preferentemente, el alginato está en forma ultrapura.

5 Preferentemente, la encapsulación proporciona un entorno que evita, una vez implantado, el contacto directo del tejido con los islotes.

10 Preferentemente, cada encapsulación supone la presentación de los islotes y una disolución de alginato adecuada en una fuente de cationes compatible para así atrapar los islotes en un gel de cationes-alginato.

Preferentemente, dicho gel de catión-alginato es un gel de calcio-alginato.

15 Preferentemente, dicho alginato utilizado en la disolución es alginato sódico, y los islotes y la disolución de alginato sódico se presentan en forma de gotículas en un baño de cationes adecuados.

Preferentemente, los islotes y la disolución de alginato sódico se encuentran al 1,6% en p/p.

20 Preferentemente, los islotes y la disolución de alginato sódico se presentan en forma de gotícula mediante una aguja generadora de gotículas.

Preferentemente, los cationes adecuados son cationes de cloruro de calcio.

25 Preferentemente, los islotes encerrados en el gel están recubiertos de un material cargado positivamente y posteriormente se suministra un recubrimiento exterior de un alginato adecuado.

Preferentemente, el material de carga positiva es poli-L-ornitina.

30 Preferentemente, el gel que atrapa los islotes dentro del recubrimiento exterior posteriormente se licua.

Preferentemente, la licuefacción supone o sucede por la adición de citrato sódico.

Preferentemente, la encapsulación produce cápsulas.

35 Preferentemente, las cápsulas contienen una pluralidad de células de los islotes.

Preferentemente, las cápsulas contienen sustancialmente tres células de los islotes.

40 Preferentemente, las cápsulas tienen sustancialmente un diámetro de entre 300 y 400 μm aproximadamente.

En otro aspecto la presente invención comprende un dispositivo implantable que comprende la preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables de la presente invención.

45 El dispositivo anterior puede ser un tubo vascularizado subcutáneo que comprende la preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables, que es capaz de producir insulina porcina en respuesta a la glucosa en un mamífero receptor,

- el tubo limita *in vivo* la salida de las células de los islotes y permite un acceso abundante a los vasos sanguíneos,

50 • el tubo también emplea o contiene células de Sertoli para reducir o evitar sustancialmente el rechazo inmunitario de los tejidos en el mamífero receptor.

Preferentemente, las células de Sertoli se mezclan con los islotes antes de su inserción en, o dentro, del tubo.

55 Preferentemente, las células de Sertoli se mezclan con los islotes sustancialmente a una relación de 10-1000 células/islote.

Preferentemente, dicho cultivo procede de tejido pancreático obtenido y reducido mecánicamente, y dicho tejido se ha expuesto a un agente que reduce los traumatismos.

60 Las células de los islotes se pueden haber aislado de un cultivo ayudado por HSA utilizando una Liberase® adecuada y haberse expuesto a nicotinamida antes de la encapsulación.

65 En otro aspecto más de la invención, el dispositivo implantable anterior puede comprender una cápsula xenotrasplantable que comprende la preparación de los islotes de cerdo xenotrasplantables, que es capaz de producir insulina porcina en respuesta a glucosa en un mamífero receptor dentro de su material o materiales de

encapsulamiento biocompatibles, con la cápsula de una forma tal que la encapsulación sirve para evitar el contacto de dicha célula(s) de los islotes con el tejido de un mamífero receptor pero que *in vivo* permitirá la entrada de glucosa en las células de los islotes y la salida de insulina porcina desde dichas células de los islotes; en donde las células de los islotes están asociadas a células de Sertoli.

5 Las células de los islotes se pueden haber aislado de un cultivo ayudado por HSA utilizando una Liberase® adecuada y haberse expuesto a nicotinamida antes de la encapsulación.

10 Preferentemente, el cultivo procede de tejido pancreático obtenido y reducido mecánicamente, y dicho tejido se ha expuesto a un agente que reduce los traumatismos.

Preferentemente, la encapsulación de las células de los islotes se produce en presencia de un antibiótico adecuado.

15 Preferentemente, las células de Sertoli se mezclan con los islotes antes de su encapsulación.

Preferentemente, las células de Sertoli se co-cultivan con las células de los islotes antes de su encapsulación.

Preferentemente, la relación de células de Sertoli:islote es de 10-1000 células:islote.

20 La invención también proporciona un dispositivo implantable de la invención para uso en el tratamiento de un paciente mamífero predispuesto a padecer o que padece diabetes.

25 En el presente documento también se describe un método de tratamiento de un paciente mamífero predispuesto a padecer o que padece diabetes que supone el xenotrasplante a dicho paciente de al menos un tubo, cápsula o implante vascularizado subcutáneo de la presente invención.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para el tratamiento de un paciente mamífero que padece o tiene predisposición a padecer diabetes, dicho método que incluye o comprende las etapas de:

30 (A) (i) la obtención del páncreas de lechones al final o cerca de su gestación completa,

(ii) el cultivo de los páncreas obtenidos en albúmina de mamífero sustancialmente exenta de agentes microbianos no humanos,

35 (iii) simultáneamente a la etapa (ii) y/o después de la etapa (ii), la extracción de los islotes a partir de los páncreas obtenidos utilizando una Liberase® adecuada,

en donde los islotes (al menos en alguna fase durante el desarrollo de (A)) se exponen a nicotinamida;

40 (B) (i) la incorporación de las células de los islotes, junto con las células de Sertoli a un dispositivo o vehículo adecuado para su administración o implantación o xenotrasplante en un mamífero receptor,

(ii) la implantación de los islotes incorporados de esta forma en el mamífero receptor.

45 Preferentemente, las células de Sertoli se mezclan con los islotes, antes de su inserción en, o dentro, del dispositivo.

Preferentemente, las células de Sertoli se mezclan con los islotes sustancialmente a una relación de 10-1000 células/islote.

50 Preferentemente, también se incluye la etapa de administración de nicotinamida al mamífero receptor antes o después de la etapa de implantación.

Preferentemente, el método incluye adicionalmente la etapa de prescripción al paciente, antes o después de la etapa de implantación, de una dieta libre en caseína (como se describe en el presente documento).

55 Preferentemente, el método incluye adicionalmente la etapa de sometimiento al paciente, antes o después de la etapa de implantación, a un régimen farmacológico para reducir el colesterol.

Preferentemente, el fármaco para reducir el colesterol pertenece a la familia de las "estatinas".

60 Preferentemente, el fármaco para reducir el colesterol es Pravastatin® o Simvastatin®.

En una forma preferida el dispositivo de la etapa (B)(i) es un tubo de colágeno vascularizado subcutáneo adecuado.

65 En una forma preferida alternativa el dispositivo de la etapa (B)(i) es una cápsula de un material xenotrasplantable biocompatible que, *in vivo*, es poroso tanto a la glucosa como a la insulina y en la que dentro de la cápsula están

encapsuladas una o más células de los islotes.

Preferentemente, el material biocompatible xenotrasplantable es un alginato adecuado.

5 En el presente documento también se describe un método para la preparación de un implante que incluye al menos un islote de cerdo xenotrasplantable capaz de producir tras su xenotrasplante insulina porcina en un mamífero receptor adecuado que incluye las etapas de:

- preparación de islotes pancreáticos de cerdo,

10

- preparación de células de Sertoli,

- preparación del implante que incorpora células de Sertoli e islotes de cerdo.

15 Preferentemente, la preparación o aislamiento de las células de Sertoli incluye el uso, o exposición, a un tampón para reducir selectivamente las células germinales.

Preferentemente, el tampón es clorhidrato de tris-(hidroximetil)-aminometano.

20 En una forma, el implante es (una o más) cápsulas dentro de las cuales se encapsulan (uno o más) islotes.

Preferentemente, las células de Sertoli se encapsulan con los islotes.

Preferentemente, las células de Sertoli se co-cultivan con los islotes antes de su encapsulación.

25

Preferentemente la relación empleada de células de Sertoli a islotes es sustancialmente de 10-1000 células de Sertoli/islote.

30 Preferentemente, el co-cultivo produce la proliferación inducida o incrementada de células β y el consiguiente aumento de producción de insulina endógena.

Preferentemente, la preparación de islotes de cerdo incluye las etapas de obtención y extracción de los islotes.

35 Preferentemente, los islotes de cerdo se preparan sustancialmente según uno de los métodos de preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables descritos anteriormente.

Preferentemente, el régimen de encapsulación incluye las etapas de encapsulación de los islotes y las células de Sertoli co-cultivados en un material biocompatible xenotrasplantable, el material que es poroso *in vivo* tanto a la glucosa como a la insulina.

40

Preferentemente, la nicotinamida se introduce en los islotes o células de los islotes o se co-cultiva antes de su encapsulación en una cualquiera o más fases del procedimiento.

45 Preferentemente, al menos en el grado necesario para convertir las células de los islotes que producen insulina no porcina en células de los islotes que producen insulina porcina, en alguna fase del procedimiento los islotes y/o células de los islotes se presentan al IGF-1 o el tripéptido N-terminal del IGF-1 (GPE).

Preferentemente, hay un antibiótico asociado a las células de los islotes.

50 Preferentemente, dicho antibiótico es ciproxina.

Preferentemente, dicho agente protector de los islotes contra traumatismos es lignocaína.

Preferentemente, dicho material biocompatible es un alginato adecuado.

55

Preferentemente, el alginato se encuentra en forma ultrapura.

Preferentemente, cada islote o agrupación de islotes está atrapado en un alginato, o un entorno similar al alginato, biocompatible poroso *in vivo* a la insulina y a la glucosa.

60

Preferentemente, la encapsulación proporciona un entorno que evita, una vez implantado, el contacto directo del tejido con los islotes.

65 Preferentemente, cada encapsulación supone la presentación de los islotes y una disolución de alginato adecuada en una fuente de cationes compatible para así atrapar los islotes en un gel de cationes-alginato.

Preferentemente, dicho gel de catión-alginato es un gel de calcio-alginato.

Preferentemente, dicho alginato utilizado en la disolución es alginato sódico, y los islotes y la disolución de alginato sódico se presentan en forma de gotículas en un baño de cationes adecuados.

5 Preferentemente, los islotes y la disolución de alginato sódico se encuentran al 1,6% en p/p.

Preferentemente, los islotes y la disolución de alginato sódico se presentan en forma de gotícula mediante una aguja generadora de gotículas.

10 Preferentemente, los cationes adecuados son cationes de cloruro de calcio.

Preferentemente, los islotes encerrados en el gel están recubiertos de un material cargado positivamente y posteriormente se suministra un recubrimiento exterior de un alginato adecuado.

15 Preferentemente, el material de carga positiva es poli-L-ornitina.

Preferentemente, el gel que atrapa los islotes dentro del recubrimiento exterior posteriormente se licua.

20 Preferentemente, la licuefacción supone o sucede por la adición de citrato sódico.

Preferentemente, la encapsulación produce cápsulas.

Preferentemente, las cápsulas contienen una pluralidad de células de los islotes.

25 Preferentemente, las cápsulas contienen sustancialmente tres células de los islotes.

Preferentemente, las cápsulas tienen sustancialmente un diámetro de entre 300 y 400 μm aproximadamente.

30 En una segunda forma, el implante es un tubo vascularizado subcutáneo dentro del cual están contenidos (uno o más) islotes.

Preferentemente, las células de Sertoli están contenidas con los islotes.

35 Preferentemente, las células de Sertoli se co-cultivan con los islotes antes de su encapsulación.

Preferentemente, la relación empleada de células de Sertoli a islotes es sustancialmente de 10-1000 células de Sertoli/islote.

40 Preferentemente, el co-cultivo produce la proliferación inducida o incrementada de células β y el consiguiente aumento de producción de insulina endógena.

Definiciones

45 Como se utiliza en el presente documento:

- "Administración" incluye la autoadministración;

50 - "Libre en caseína" cuando se refiere a la leche como se utiliza en el presente documento se refiere a leche que no contenga un factor diabetogénico, en particular a leche que no contenga ninguna variante de la caseína que estimula la actividad diabetogénica en seres humanos. Con referencia a la solicitud PCT internacional WO 96/14577, una variante no diabetogénica puede ser, por ejemplo, la variante A2 de la β -caseína. El contenido completo de los documentos PCT/NZ95/00114 (WO 96/14577) y PCT/NZ96/00039 (WO 96/36239) es relevante a modo de referencia.

55 - "Libre en caseína" como se utiliza en el presente documento con respecto a consideraciones dietéticas significa al menos una evitación sustancial (preferentemente una evitación total) de dicha leche que contiene o de la que derivan factores diabetogénicos.

60 - El tripéptido N-terminal del IGF-1 o "GPE" es el tripéptido amino-terminal glicina-prolina-glutamato del IGF-1.

- "Albúmina de mamífero" como se utiliza en el presente documento significa seroalbúmina humana.

- "Colagenasa apropiada" o "Liberase®" significa preferentemente Liberase H®.

65 - "Reducido mecánicamente" como se utiliza en el presente documento incluye cualquier proceso en el que el tejido

pancreático aumente su área superficial, por ejemplo, mediante trituración, molienda, picado mecánico o con un chorro de agua, etc.

- "Células de Sertoli" Las células de Sertoli proceden de los testículos de lechones macho donantes.

5 - Esta clase de células segregan sustancias que producen tolerancia inmunitaria. Se desconoce el mecanismo exacto, pero se ha sugerido que factores de crecimiento tales como el factor de transformación tisular pueden ser responsables del efecto deseado.

10 De forma general también se puede decir que esta invención consta de partes, elementos y características mencionados o indicados en la memoria descriptiva de la solicitud, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de cualesquiera de dos o más de dichas partes, elementos o características, y en donde se mencionan números específicos en el presente documento que tienen equivalentes conocidos en la materia con la cual está relacionada esta invención, dichos equivalentes conocidos que se consideran incorporados en el presente documento como si se expusieran individualmente.

15 La invención consiste en lo anterior y también contempla construcciones de las cuales se da ejemplo a continuación.

20 Descripción de los dibujos

Ahora se describirán formas preferidas de la presente invención con referencia a los dibujos acompañantes en los que:

25 La figura 1 muestra un procedimiento preferido para la obtención, aislamiento y preparación de células de los islotes (ya sea mediante confinamiento o encapsulación) y el régimen de tratamiento asociado para un paciente humano diabético con el fin de que reciba los beneficios en curso del xenotrasplante,

30 la figura 2 muestra el efecto de la colagenasa procedente de diversas fuentes sobre el rendimiento y la función de los islotes,

la figura 3 muestra el índice de estimulación de la Liberase® contra la colagenasa que muestra claramente que las preparaciones de Liberase® (tanto humanas como de cerdo a concentraciones adecuadas) proporcionan rendimientos y un funcionamiento superiores *in vitro* que una concentración optimizada de Colagenasa P,

35 la figura 4 muestra el índice de estimulación de islotes libres cuando se compara el uso de ciproxina contra una mezcla de penicilina/estreptomina y contra un control sin antibióticos,

40 la figura 5 muestra una gráfica de islotes confinados de lechones (por ejemplo; utilizando un tubo de colágeno vascularizado subcutáneo) y la relación después del trasplante de la glucosa en sangre frente al requerimiento de insulina en un paciente humano diabético dependiente de insulina de 15 años de edad, y

la figura 6 muestra una gráfica del péptido C de cerdo en respuesta a glucosa IV en el sujeto de la figura 5.

45 La figura 7 muestra los resultados de la exposición de islotes de cerdo neonatal en cultivo con GPE en comparación con células control.

50 Figura 8. Obtención de imágenes de inmunofluorescencia con marcaje doble mediante microscopía confocal. Para esta serie de experimentos utilizamos pilas de 6 secciones ópticas obtenidas en el plano ecuatorial de islotes pancreáticos. A-B: detección de la insulina sola (las sombras más claras); en B todas las células se tiñeron con una intensidad de fluorescencia brillante, mientras que en A (islotes no cultivados en presencia de SC) sólo unas pocas células eran brillantes y la mayoría de ellas estaban poco o nada teñidas. C: imagen de doble fluorescencia para la insulina (las sombras en el rango intermedio) y BrdU (la sombra más clara). Este marcaje se puede detectar en las áreas correspondientes a la región nuclear sin teñir por la insulina. D: para una mejor identificación la fluorescencia por BrdU se presentó sola. Se muestran seis núcleos BrdU positivos. E-F: detalle de C, correspondiente al área central del islote con un par de células teñidas por BrdU. En E se muestran ambas fluorescencias, con el marcaje de BrdU que corresponde a 2 áreas nucleares. En F, se obtuvo la imagen de la inmunofluorescencia de la insulina sola y las áreas negativas correspondientes a los núcleos eran claramente distinguibles. El cuadrado blanqueado en el centro del islote (B-C) correspondía al área de barrido del detalle mostrado en E y F, que se había obtenido en primer lugar y al que posteriormente le siguió el barrido del islote completo. Barra para A-D: 10 µm. Barra para E-F: 2 µm.

60 Figura 9. Liberación de insulina con incubación estática con glucosa el día 3 (a) y el día 9 (b). En ambos casos la liberación de insulina fue significativamente superior (*p<0,05) sólo en el grupo en el que los islotes se co-cultivaron con 400.000 SC.

65 La figura 10 muestra dos vistas del dispositivo subcutáneo en una forma preferida de la invención.

Descripción detallada de la invención

1. GENERAL

La presente invención reconoce la capacidad para obtener islotes adecuados procedentes de lechones que tengan similitudes estructurales con la insulina humana, y niveles de glucosa fisiológicos similares a los de los seres humanos. Los lechones utilizados que se encuentran al final o cerca de su gestación completa. Los islotes se convierten en una fuente xenotrasplantable adecuada de islotes viables en seres humanos siguiendo ciertos procedimientos con respecto a la obtención y extracción de los islotes, el tratamiento de los islotes antes del xenotrasplante y los regímenes de uso de dichos islotes.

La ventaja principal del trasplante de células de los islotes de cerdo sobre el trasplante de células humanas de los islotes es que la fuente de células de los islotes se puede expandir fácilmente, y la bioseguridad de las células se puede explorar en profundidad antes del trasplante. Desde un punto de vista práctico, la extracción del páncreas y el aislamiento de las células de los islotes se pueden llevar a cabo rápidamente en un entorno ideal.

Consideraciones importantes relevantes para el uso de células de los islotes de cerdo en una aproximación del trasplante para diabetes de tipo 1 incluyen las siguientes:

- Las similitudes estructurales y biológicas de la insulina de cerdo y humana
- El hecho de que la insulina de cerdo se haya utilizado para tratar la diabetes durante varias décadas (y sólo haya sido sustituida por la insulina con la secuencia humana de forma relativamente reciente); y
- La similitud de los niveles de glucosa fisiológicos en cerdos y en seres humanos. (Weir & Bonner-Weir 1997). Efectivamente esto significa que se puede esperar que las células de los islotes de cerdo reaccionen de manera similar a sus homólogas humanas en el mantenimiento de unas concentraciones de glucosa en sangre equivalentes.

2. LA NATURALEZA DE LA ENFERMEDAD QUE PROVOCA LA DIABETES

El alotrasplante con éxito a largo plazo de islotes humanos se puede conseguir en más del 80% de los pacientes cuando la enfermedad está provocada por procesos no inmunitarios. En contraste, incluso los islotes obtenidos de un gemelo no diabético son incapaces de revertir la diabetes autoinmunitaria a largo plazo en el gemelo diabético. Esto acentúa el papel crítico de la autoinmunidad en el fracaso del trasplante de los islotes. Esta observación ha sido validada en alotrasplante de roedores con diabetes provocada por autoinmunidad en comparación con diabetes debida a pancreatectomía o destrucción química de las células. No existe un modelo de diabetes autoinmunitaria en animales mayores. Es posible que el uso de islotes procedentes de diferentes especies (xenotrasplante) pueda evitar la destrucción autoinmunitaria de los islotes trasplantados, puesto que el proceso inmunitario del rechazo del xenotrasplante es diferente del proceso de rechazo del alotrasplante, pero en seres humanos esto es completamente hipotético.

3. AISLAMIENTO Y PREPARACIÓN DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES DE CERDO PARA XENOTRASPLANTE

3a. Fuente animal y transporte

Todos los animales destinados a ser fuente de tejido pancreático para xenotrasplante se obtienen de una instalación de cría de cerdos específicos exentos de patógenos (SPF) que se mantiene de acuerdo con la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). La instalación mantiene una colonia con unas condiciones sanitarias elevadas y unas normas de calidad zootécnicas excelentes, y desarrolla un sistema de registro fácilmente accesible y que se archiva de forma permanente. Las cerdas y los sementales donantes se seleccionan con el objetivo subyacente de producir una fuerte heterosis en las camadas donantes.

3b. Aislamiento y purificación de las células de los islotes

Después de la extracción quirúrgica, los páncreas de los donantes se transfieren a una sala blanca para su subsiguiente procesamiento en un contenedor de plástico frío en tubos de 50 ml que contienen disolución salina balanceada de Hank (HBSS) en frío con

- la adición de seroalbúmina humana (HSA) al 0,2%. Las muestras de sangre procedentes de cada donante se envían para la realización de pruebas de virología y
- la serología del toxoplasma. Las muestras de cada órgano se mantienen en un congelador al -80°C para futuros ensayos si fueran necesarios.

3c. Digestión

Las células de los islotes se aíslan mediante digestión estándar con colagenasa de los páncreas troceados mediante el procedimiento documentado por Ricordi y col. (1990), aunque con algunas modificaciones. Utilizando una técnica aséptica, las glándulas se distienden con Liberase® (1,5 mg/ml), se recorta el exceso de grasa, los vasos sanguíneos y el tejido conectivo, se pica, y se digiere a 37°C en un baño de agua en agitación durante 15 minutos a 120 rpm. La digestión se consigue utilizando lignocaína mezclada con la disolución de Liberase® para evitar el daño celular durante la digestión. Después del proceso de digestión, las células se pasan a través de una red estéril de 400 mm a un vaso de precipitados estéril. Se utiliza un segundo proceso de gestión para cualquier resto de tejido sin digerir.

Hemos determinado que se pueden obtener unos rendimientos muy superiores por páncreas de cerdo neonatal utilizando Liberase® (por ejemplo; obtenida en Nueva Zelanda de Roche) en lugar de colagenasa. Aunque existe una descripción en "Improved Pig Islet Yield and Post-Culture Recovery Using Liberase P1 Purified Enzyme Blend", T J Cavanagh y col. Transplantation Proceedings 30, 367 (1998) y en "Significant Progress In Porcine Islets Mass Isolation Utilizing Liberase® HI For Enzymatic Low-Temperature Pancreas Digestion", H. Brandhorst y col. Transplantation Vol 68, 355-361 No. 3, 15 de Agos. 1999, los rendimientos allí encontrados son bajos en comparación con lo descubierto por nosotros. Si, por ejemplo, siguiendo el procedimiento de Brandhorst y col. hay un incremento en el rendimiento de los islotes sobre la colagenasa desde 400 a digamos 800 con el procedimiento que utiliza Liberase® humana (es decir; Liberase® HI), como en el procedimiento de Brandhorst y col., pero confinado a islotes de cerdos neonatales de manera que 7 días después de la administración son posibles rendimientos extraordinariamente superiores, a saber, el equivalente a partir de 400, que sería el caso con la colagenasa en bruto, a 30.000, que como se puede observar es muchísimo mayor que el que cabría esperar en caso de seguir el procedimiento de Brandhorst y col. con los cerdos.

3d. Lavado y cultivo

El tejido digerido se lava tres veces, y se siembra en un medio de cultivo celular RPMI 1640 al que se le añade seroalbúmina humana (HSA) al 2%, 10 mmol/l de nicotinamida, y antibiótico (Ciproxina).

3e. Procedimientos de control de calidad

Para eliminar toda contaminación del tejido, se llevaron a cabo procedimientos de control de calidad sobre las muestras de cultivos celulares después del aislamiento y antes de la encapsulación (en SOP P101 se proporcionan detalles adicionales). Tres días después del aislamiento, el cultivo celular se sometió a ensayo para contaminación microbiológica en laboratorios acreditados. Las pruebas para el retrovirus endógeno porcino (PERV) se llevaron a cabo en el laboratorio. El rendimiento de los islotes se determina mediante la tinción de las células con ditizona (DTZ), según se especifica en SOP Q200. La ditizona es un agente quelante de cinc y una tinción supravital que tiñe selectivamente el cinc en los islotes de Langerhans, produciendo una apariencia roja distintiva.

La viabilidad de las células de los islotes se determina utilizando naranja de acridina y yoduro de propidio, como se especifica en SOP Q201. El naranja de acridina es una tinción fluorescente que atraviesa fácilmente todas las membranas celulares para teñir el citoplasma y el núcleo. Un verde fluorescente brillante tanto en el núcleo como en el citoplasma durante la exposición a luz ultravioleta (UV) denota células vivas intactas. Por el contrario, el yoduro de propidio es una tinción fluorescente que no puede atravesar una membrana intacta. Emite una fluorescencia rojo brillante cuando se expone a luz UV, y la presencia de yoduro de propidio en el núcleo de una célula indica un daño severo o la muerte de la célula.

3f. Determinación de la capacidad secretora de la insulina *in vitro*

La estimulación estática de la glucosa (SGS) se utiliza para valorar la función *in vitro* de los islotes de cerdos exponiéndolos a bajas y altas concentraciones de glucosa y teofilina. La determinación de la capacidad secretora de la insulina *in vitro* se lleva a cabo tanto sobre islotes libres (tras 3 días en cultivo) como después de su posterior encapsulación o confinamiento.

4. XENOTRASPLANTE

4a. La viabilidad de los islotes para el xenotrasplante

Los métodos mediante los cuales se purifican los islotes antes de su trasplante son traumáticos para estos tejidos altamente especializados. Estos traumatismos pueden inducir necrosis o apoptosis - esta última que se produce con bastante retraso.

Se pueden producir traumatismos adicionales debido a la encapsulación. Los métodos utilizados por nosotros tanto en la preparación de los islotes como para su encapsulación se han optimizado para garantizar el mínimo daño a los islotes. Tales procedimientos han asegurado isquemia caliente en cero (comparado con horas con la mayoría de preparaciones de islotes humanos), han supuesto el uso de nicotinamida para aumentar el éxito de la explicación *in*

vitro, han supuesto un tiempo de incubación mínimo con colagenasa o liberasa, han involucrado tecnología de encapsulación no traumática rápida, han involucrado el uso de IGF-1 (o su tripéptido GPE), el uso de un anestésico como lignocaína, y el uso de un antibiótico como ciproxina, etc.

- 5 La preparación preferida preferentemente utiliza islotes neonatales (7 días de edad) que son cruciales tanto para limitar el traumatismo de los islotes durante la purificación, como para asegurar una maduración suficiente de los islotes para la producción estimulada de insulina.

10 El IGF-1 (factor de crecimiento I similar a la insulina humana) se utiliza con el fin de inducir la maduración de los islotes de cerdo inmaduros hacia su forma productora de insulina. El IGF-1 es un potente factor de crecimiento mitógeno que media en las actividades de la hormona del crecimiento que promueven el crecimiento después del nacimiento. Tanto IGF-1 como IGF-2 se expresan en muchos tipos celulares y pueden tener funciones endocrinas, autocrinas y paracrinas. Hemos encontrado que la forma preferida de IGF-1 es el tripéptido amino-terminal glicina-prolina-glutamato del IGF-1 (GPE).

15 4b. Procedimiento con un tubo de colágeno vascularizado subcutáneo

20 Los islotes se pueden implantar en un tubo de colágeno subcutáneo convenientemente vascularizado utilizando células de Sertoli como método para prevenir el rechazo inmunitario del tejido.

La figura 10 ilustra la vista de este dispositivo.

25 Resumiendo, un tubo con los extremos cerrados de una red de acero inoxidable que contiene una barra de teflón que entra de manera holgada se inserta subcutáneamente en receptor previsto para el injerto. Seis semanas después la barra se extrae - dejando un tubo de colágeno altamente vascularizado. Se prepara una mezcla de islotes como anteriormente junto con células de Sertoli preparadas mediante el método de Rajotte procedentes de los testículos de los mismos lechones de los cuales se obtuvieron los islotes. Las células de Sertoli se mezclan con los islotes en una relación de 10 a 1000 células/islote aproximadamente y se insertan en el tubo vascular, que a continuación se sella con un tapón de teflón.

30 El efecto de dicho dispositivo que contiene los islotes de los lechones (300.000 aproximadamente) + células de Sertoli sobre el requerimiento de insulina en un sujeto diabético humano de 15 años de edad dependiente de la insulina se muestra en la figura 5.

35 La secreción del péptido C porcino en respuesta a glucosa IV en el sujeto 4 semanas después del trasplante se muestra en la figura 6 a continuación.

4c. Procedimiento de encapsulación con alginato

40 El alginato sódico utilizado para este procedimiento se extrajo de fuentes de materias primas (algas) y se preparó en forma pulverizada ultrapura. A continuación la disolución de alginato sódico estéril (1,6%) se utilizó en el Centro de trasplante de islotes de Diatranz para preparar los islotes encapsulados. El procedimiento de encapsulación (Universidad de Perugia) supone la extrusión de una mezcla de islotes y una disolución de alginato sódico (1,6%) a través de una aguja que genera gotículas en un baño de cationes gelificantes (cloruro cálcico). Los islotes atrapados en el gel de calcio y alginato a continuación se recubren con poli-L-ornitina cargada positivamente seguido de un recubrimiento exterior de alginato (0,05%). A continuación el núcleo central de alginato se licua con la adición de citrato sódico. La mayoría de las cápsulas contienen 3 células de los islotes y tienen un diámetro de 300 a 400 µm.

50 Los islotes encapsulados se mantienen en un cultivo celular, y a continuación se comprueba la ausencia de contaminación, la liberación de insulina y la viabilidad antes del trasplante. Sólo se permite su uso para trasplante si todas las pruebas de control de calidad son negativas.

4d. Fármacos utilizados en el receptor

55 El trasplante no requiere y evita la necesidad de agentes citotóxicos para suprimir la respuesta del sistema inmunitario. Dichos agentes son capaces de penetrar en las microcápsulas de alginato y provocar toxicidad en los islotes, así como generar una toxicidad sistémica. En lugar de eso, se utiliza nicotinamida y una dieta especial.

60 Los procedimientos de trasplante de la memoria descriptiva de patente anterior tienen la capacidad de proporcionar insulina porcina durante un periodo de tiempo antes del rechazo. En este aspecto, se llevaron a cabo ensayos clínicos.

65 Cuatro adolescentes con diabetes de tipo 1 recibieron 10.000 islotes libres/kg de peso corporal mediante inyección intraperitoneal. Los islotes se obtuvieron de lechones que habían alcanzado la gestación completa utilizando las técnicas de digestión estándar con colagenasa, purificación y cultivo descritas en la sección 3.2. Los cuatro receptores recibieron nicotinamida por vía oral (1,5 g/día) y una dieta libre en caseína como se define en el presente

documento tanto antes como después de trasplante. Se observó una reducción rápida en los requerimientos de insulina, que no estaba claramente relacionada con la dosis, la primera semana después de trasplante. La reducción en la dosificación de la insulina abarca desde el 21 al 32%, y la respuesta duró hasta 14 semanas. No obstante, posteriormente las dosis de insulina volvieron a sus niveles previos.

5 La razón más probable para el fracaso del trasplante en estos pacientes fue el rechazo crónico. No obstante, no se observaron efectos adversos.

10 Hemos mostrado que la encapsulación con alginato es un método adecuado para limitar dicho rechazo crónico. Hemos mostrado que los trasplantes de células de los islotes de cerdo encapsuladas con alginato en dos pacientes diabéticos humanos prolongó el funcionamiento de los trasplantes. Los islotes se trasplantaron mediante inyección intraperitoneal, en donde un paciente recibió 15.000 IEQ/kg (total 1.300.000 islotes) y el otro 10.000 IEQ/kg (total 930.000 islotes). Ambos pacientes se trataron antes y después del trasplante con nicotinamida por vía oral y una dieta basada en soja libre en caseína como se define en el presente documento.

15 Para la preparación se utilizó el procedimiento preferido que se muestra en la figura 1, siendo la encapsulación como se ha mencionado anteriormente. Se utilizaron células de los islotes que se encuentran a entre -7 y +10 días de su gestación completa.

20 4e. Uso de células de Sertoli

La presente invención está dirigida a abordar el problema masivo del trasplante de islotes. Las células de los islotes proceden originalmente tanto de la diferenciación de las células madre del conducto exocrino pancreático, como de la replicación de células previamente existentes ya diferenciadas. La actividad de proliferación celular varía con la edad (desde el 10% en el periodo fetal al 3% en la edad adulta), a pesar de que factores o condiciones específicos pueden influir y/o promover el crecimiento de estas células en cualquier momento, y en particular:

1) la glucosa;

30 2) la gestación;

3) hormonas, tales como la prolactina y la hormona del crecimiento;

35 4) factores de crecimiento tales como la celulina, el factor de crecimiento vasculo-endotelial, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y los factores de crecimiento I y II similar a la insulina (IGF I, II).

40 Sin embargo, es bastante improbable que, en el marco de un trasplante, en condiciones ambientales putativas desfavorables, las células experimenten una replicación significativa. Esto último se ha observado en islotes microencapsulados en alginato, a pesar de que la tasa de muerte sobrepasaba claramente la tasa mitótica de las células de los islotes, dando lugar así a una pérdida progresiva de la masa celular trasplantada original.

45 Para abordar este problema, células "asistentes" anciliares, asociadas a la capacidad de inducción de crecimiento celular podrían producir la prolongación de la supervivencia de las células de los islotes y de su competencia funcional.

50 En la presente invención, se han empleado células de Sertoli como sistema celular "asistente" auxiliar para los islotes. Las propiedades funcionales de las células de Sertoli, y en particular la síntesis de factores de crecimiento tales como el IGF-1, el factor de crecimiento transformante, el factor de crecimiento endotelial, y la clusterina, favorecen la expansión celular, mientras que en la vertiente inmunitaria, la expresión de Fas-L proporciona inmunoprotección a los islotes trasplantados.

55 De acuerdo con la invención, se han examinado células de Sertoli, que tras su co-cultivo *in vitro* con islotes pancreáticos enteros homólogos y aislados de rata, podrían alterar el bajo ciclo de proliferación celular, revirtiendo los elementos adultos a un estado similar al fetal. Esto coincidiría con una mitogenicidad de las células significativamente incrementada.

En el caso específico de las células de Sertoli, la producción de varios factores de crecimiento diferentes está acoplada a la expresión de moléculas, tales como Fas-L, que están asociadas a propiedades inmunológicas.

60 Teóricamente, el Fas-L derivado de las células de Sertoli podría inducir la destrucción apoptótica de poblaciones Tc CD4+ y CD8+ dirigidas contra el tejido trasplantado. Además, las células de Sertoli en su localización anatómica original, son parte de la denominada "barrera hemato-testicular". Por tanto, los privilegios inmunológicos relacionados con las células de Sertoli posiblemente se podrían transferir al sistema celular de los islotes. La capacidad de inducción de crecimiento celular relacionado con las células de Sertoli, junto con la actividad inmunomoduladora, han demostrado tener éxito en estudios experimentales preliminares. Injertos cerebrales de células de Sertoli aliviaron los síntomas en ratas con hemiparkinsonismo inducido farmacológicamente. Además, el

aloinjerto de células de Sertoli sin purificar en combinación con los islotes, bajo la cápsula renal de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, prolongó significativamente la normoglucemia adquirida, en comparación con controles que sólo habían recibido el trasplante de islotes.

5 Estudios han demostrado que las células de Sertoli, en las concentraciones adecuadas, son capaces de promover una replicación celular significativa cuando se co-incuban con islotes homólogos. Además, el incremento de la actividad mitótica celular da como resultado un incremento significativo asociado en la producción de insulina endógena, tanto en condiciones de cultivo estándar, como en estimulación con glucosa, en comparación con células de los islotes control exentas de células de Sertoli.

10

Estudios han demostrado que:

a) *in vitro*, la proliferación celular inducida dio como resultado un incremento en la producción de insulina endógena, tanto en condiciones basales como después de la estimulación con glucosa.

15

b) la transferencia de los resultados *in vitro* a un sistema de trasplante *in vivo*, en donde la reversión de hiperglucemia conseguida, en ratones con diabetes inducida por STZ, se ha prolongado mediante microcápsulas que contenían (islotes + células de Sertoli) en comparación con (islotes) solos. La optimización de la relación de masa ideal de células de Sertoli:islote maximizaría los efectos beneficiosos de las células de Sertoli sobre los islotes.

20

5. EJEMPLOS

5a. Ejemplos de referencia del uso del IGF-1

25 Islotes de cerdo en cultivo que se habían expuesto al IGF-1, incrementaron su respuesta insulínica a la glucosa, con un aumento de hasta 3 veces.

	Incubado 24 horas con 0,1 µg/ml de IGF-1 después del aislamiento	CONTROL sin IGF-1
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 3 días	236 µU/hr/100IEQ	75,2 µU/hr/100IEQ

30 Una concentración de 0,1 µg/ml de IGF-1 en cultivo es suficiente para producir una secreción óptima de insulina durante la exposición a glucosa. No se consiguió ningún beneficio adicional aumentando la concentración de IGF-1.

	Incubado 24 horas con 0,1 µg/ml	Incubado 24 horas con 0,1 µg/ml de IGF-1
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 3 días	58 µU/hr/100IEQ	56,8 µU/hr/100IEQ

35 Se intentaron variaciones en la duración de la exposición a IGF-1 sobre las células de los islotes de cerdo. No obstante no se encontraron beneficios adicionales en el cultivo de los islotes con IGF-1 más allá de un período de 24 horas, después del aislamiento.

	Incubado 7 días con 0,1 µg/ml de IGF-1	Incubado 24 horas con 0,1 µg/ml de IGF-1
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM 7 días después del aislamiento	58 µU/hr/100IEQ	57,5 µU/hr/100IEQ

40 Esta producción incrementada de insulina persistió hasta 14 días después de la exposición a IGF-1. Aún se deben investigar duraciones más prolongadas.

	14 días después de la exposición a IGF-1	3 días después de la exposición a IGF-1
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM	Incremento de 1,3 veces en comparación con el control	Incremento de 1,5 veces en comparación con el control

La retirada de la nicotinamida del medio de cultivo eliminó el beneficio del IGF-1 sobre la producción de insulina de los islotes.

	Incubado 3 días con 0,1 µg/ml de IGF-1 sin nicotinamida	Incubado 3 días con medio de cultivo sin nicotinamida
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 3 días de cultivo tras el aislamiento	47,6 µU/hr/100IEQ	55,9 µU/hr/100IEQ

- 5 Una concentración de 0,1 µg/ml de IGF-2 durante el cultivo pareció incrementar la producción de insulina de las células de los islotes de cerdo, después de una exposición inicial de 24 horas. No obstante, este incremento fue transitorio hasta 3 días después de la exposición.

	Incubado 24 horas con 0,1 µg/ml de IGF-2 el día 1	Control
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 3 días de cultivo tras el aislamiento	105,8 µU/hr/100IEQ	75,2 µU/hr/100IEQ

	Incubado 24 horas con 0,1 µg/ml de IGF-2 el día 1	Control
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 3 días de cultivo tras el aislamiento	32 µU/hr/100IEQ	39,8 µU/hr/100IEQ

- 10 Una exposición prolongada a IGF-2 más allá de las 24 horas, no consigue incrementar la producción de insulina de las células de los islotes en respuesta a la glucosa.

	Incubado 24 horas con 0,1 µg/ml de IGF-2 el día 1	Control
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 3 días de cultivo tras el aislamiento	105,8 µU/hr/100IEQ	75,2 µU/hr/100IEQ

	Incubado 7 días con 0,1 µg/ml de IGF-2	Control
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 7 días de cultivo tras el aislamiento	38,4 µU/hr/100IEQ	39,8 µU/hr/100IEQ

- 15 5b. Ejemplo de referencia: Efecto del tripéptido (GPE) N-terminal del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) sobre la función de las células de los islotes de cerdo neonatal

20 El GPE es un tripéptido (gly-pro-glu) derivado del IGF-1. Es un nuevo péptido neuroactivo con un potente efecto sobre la liberación de acetilcolina y dopamina en segmentos corticales. Los estudios realizados utilizando GPE apoyan el concepto de que los productos proteolíticos del precursor del IGF-1 desempeñan un papel en la regulación de las funciones cerebrales.

25 El objetivo de este ejemplo era presentar el efecto de GPE sobre la función de islotes de cerdo aislados *in vitro*.

Método

- aislamiento de las células de los islotes con 2 páncreas;
- 30 - aislamiento siguiendo el protocolo descrito previamente;
- medio RPMI al que se le añade ciproxina, nicotinamida, seroalbúmina humana;

- IGF-1 - Long R 3 IGF-1 Media Grade (AU100), disolución madre de 100 µg/ml (en HCl 10 mM): diluir adicionalmente en medio RPMI a concentraciones finales: 1 µg/ml (1:100), 0,5 µg/ml (1:200) y 0,1 µg/ml (1:1000).

5 - GPE, IGF1 (1-3), Bachem AG, Lot No. 0538925, disolución madre de 100 µg/ml (en agua): diluir adicionalmente en medio RPMI a concentraciones finales: 1 µg/ml (1:100), 0,1 µg/ml (1:1000) y 0,01 µg/ml (1:10.000).

1. IGF-1 0,1 µg/ml

10 2. IGF-1 0,5 µg/ml

3. IGF-1 1,0 µg/ml

4. GPE 0,01 µg/ml

15 5. GPE 0,1 µg/ml

6. GPE 1,0 µg/ml

20 Mantener las células 3 días en cultivo antes de la estimulación estática con glucosa (SGS). La SGS supone la exposición de las células a una baja y alta concentración de glucosa para comprobar la producción de insulina. Utilizando una concentración de 0,1 µg/ml, añadir IGF1 y GPE a dos placas 24 horas antes de la SGS (día 2 después del aislamiento).

25 *Resultados*

La exposición de islotes de cerdo neonatal en cultivo a GPE incrementó la respuesta insulínica a la glucosa en hasta 11,5 veces en comparación con las células control. (Índice de estimulación del control de 13,3, en comparación con los 24,8 cuando se utilizó GPE). La viabilidad de las células fue del >85% DTZ, tinción con AO/PI).

30 Una concentración de 0,01 µg/ml de GPE en cultivo es suficiente para producir una respuesta óptima durante la exposición a glucosa. No se consiguieron beneficios adicionales incrementando la concentración de GPE en cultivo. Véase la figura a continuación.

35 Los resultados sugieren que el GPE se podría utilizar durante el cultivo de células de los islotes de cerdo para mejorar la calidad y la función de las células antes del trasplante. Además, el GPE es un nuevo péptido neuroactivo encontrado en el cerebro humano.

40 5c. Ejemplos del efecto de la lidocaína cuando se utiliza durante la digestión del páncreas de cerdo sobre el rendimiento y la viabilidad de los islotes

La lidocaína es un estabilizador de membrana y un inhibidor de la fosfolipasa A2. Cuando se utiliza a una concentración de 1 mM durante la digestión de páncreas de cerdo de 7 días de edad con colagenasa, se produce un aumento de 2x en el rendimiento de los islotes.

45 La función endocrina de los islotes se valoró después de 3 días en cultivo mediante la estimulación estática con glucosa. Los islotes aislados con lidocaína durante la digestión produjeron un incremento de 3 veces en la secreción de insulina en respuesta a la exposición a glucosa.

	Colagenasa sola	Colagenasa + Lidocaína 1mM
Rendimiento medio de los islotes	40.960 IEQ/g	88.183 IEQ/g

	Colagenasa sola	Colagenasa + Lidocaína 1mM
Secreción de insulina en respuesta a Glucosa 19,4 mM + Teofilina 10 mM después de 3 días de cultivo tras el aislamiento	46,4 µU/hr/100IEQ	163,8 µU/hr/100IEQ

50 Conclusión: El uso de lidocaína durante la digestión pancreática incrementa la producción de insulina/g de páncreas en 6 veces.

55 5d. Ejemplos de referencia de los efectos de la ciproxina sobre la función de los islotes valorada mediante la estimulación estática con glucosa

Mediante el procedimiento de aislamiento habitual se prepararon islotes de cerdos neonatales recién preparados y

se cultivaron durante dos días en medio RPMI con adiciones estándar.

Se incluyó estreptomycin (100 mg/ml) y penicilina (100 U/ml) en un matraz y ciproxina (3 mg/ml) en otro.

5 Los islotes se recogieron y una alícuota se sometió a estimulación con teofilina y una concentración elevada de glucosa.

En la figura 4 a continuación se muestra la liberación comparada de insulina procedente de los islotes - una medida de la viabilidad.

10 5e. Ejemplos de referencia de los efectos de la colagenasa procedentes de diversas fuentes sobre el rendimiento y la función de los islotes

15 Se obtuvieron los páncreas de lechones neonatales de 7 días de edad como se ha explicado anteriormente y los islotes se extrajeron mediante el mismo método, variando solamente la fuente y la cantidad de colagenasa. El rendimiento/gramo de páncreas se muestra en la figura.

Los islotes extraídos utilizando estas variaciones en la fuente y cantidad de colagenasa se valoraron para su viabilidad utilizando yoduro de propidio y ditizona para el contenido en insulina.

20 Tinción con DTZ > 85%

AO/PI > 85%

25 A continuación los islotes se sometieron a valoración para su funcionalidad mediante estimulación estática con glucosa como anteriormente. Los resultados se muestran en la figura a continuación.

Es evidente que las preparaciones de Liberase® a concentraciones adecuadas proporcionaban unos rendimientos y un funcionamiento superiores *in vitro* que la concentración de Colagenasa P previamente optimizada.

30 5f. Ejemplos de referencia de la eficacia comparativa de los islotes preparados con Liberase P o H *in vivo*

35 Islotes preparados con la mejor concentración de Liberase P o H de esta forma se inyectaron intraperitonealmente en ratones CD1 convertidos en diabéticos mediante estreptozotocina intravenosa. La dosis utilizada fue de 10 islotes/g de peso corporal del ratón. 10 días después de dicho tratamiento se evaluó el número de ratones que ya no padecían diabetes.

40 1/7 de los ratones tratados con los islotes aislados con Liberase P y 4/7 de los ratones aislados con Liberase H ya no eran diabéticos.

Se llevaron a cabo experimentos similares utilizando ratones NOD diabéticos de forma espontánea. De los ratones supervivientes 10 días después del trasplante, 3/7 de los islotes aislados tratados con Liberase P y 3/3 de los islotes aislados tratados con Liberase H ya no eran diabéticos.

45 5g. Ejemplo de referencia del procedimiento de encapsulación de los islotes

El procedimiento de encapsulación ha sido desarrollado por el doctor R. Calafiore, en la Universidad de Perugia. Las nuevas microcápsulas de tamaño medio (300-400 µm MSM) se prepararon atomizando la suspensión de islotes-alginato a través de un generador especial de microgotículas.

50 El alginato sódico utilizado para este procedimiento se extrajo de fuentes de materias primas (algas) y se preparó en forma ultrapura pulverizada (Keltone LVCR).

55 El procedimiento de encapsulación supone la extrusión de una mezcla de islotes y una disolución de alginato sódico (1,6%) a través de una aguja que genera gotículas en un baño de cationes gelificantes (cloruro cálcico). Los islotes atrapados en el gel de calcio y alginato a continuación se recubren con poli-L-ornitina cargada positivamente seguido de un recubrimiento exterior de alginato (0,05%). A continuación el núcleo central del alginato se licua con la adición de citrato sódico. La mayoría de las cápsulas contienen 3 células de los islotes y tienen un diámetro de 300 a 400 µm.

60 Los islotes encapsulados se mantienen en un cultivo celular, y a continuación se comprueba la ausencia de contaminación, la liberación de insulina y la viabilidad antes del trasplante.

65 5h. Ejemplo de referencia de co-cultivo de células de Sertoli

Los siguientes ejemplos resumen materiales, métodos y procedimientos que se han empleado. Como sabrán los

expertos en la materia, se pueden utilizar otras técnicas o materiales adecuados, o variaciones de las siguientes técnicas o materiales.

A) METODOLOGÍAS BÁSICAS

5

1) Fuente de los islotes pancreáticos y procedimiento de aislamiento

Los islotes se aislaron y se purificaron de ratas adultas macho Sprague Dawley, de un peso de 150 g aproximadamente, según el siguiente método:

10

Tras la laparotomía, el conducto biliar se canuló mediante un catéter de polietileno, y se ligó a su unión en el intestino delgado. Se administró manualmente en el conducto una disolución de colagenasa para así inducir la distensión retrógrada del páncreas. El páncreas distendido se separó con cuidado del intestino grueso y delgado, y por último del estómago, para así evitar toda discontinuación de la cápsula del órgano, que provocaría la filtración de colagenasa y la deflación del páncreas, comprometiendo el proceso de digestión. Tras la extracción del bazo y de los nódulos linfáticos, el páncreas se colocó en un baño a 37°C, y se agitó (130-140 ciclos/min) hasta que el tejido se deshizo en partes muy finas. El tejido digerido, tras lavarlo en disolución salina balanceada de Hank (HBSS) se centrifugó contra gradientes de densidad Eurocollins + Ficoll, a 400 g durante 25 minutos a 4°C. Se detectó una banda pura de células de los islotes y se recuperó en la interfaz de densidad 1,096/1,060. El rendimiento absoluto medio en equivalentes de islotes (IEQ, islotes expresados como si todos tuvieran un diámetro de 150 µm) por páncreas fue de 600.

15

20

2) Fuente de las células de Sertoli y procedimiento de recuperación

25

Las células de Sertoli se separaron de los testículos de ratas SD pre-púberes (15 días de edad), según la siguiente adaptación de los métodos de la técnica anterior.

30

Cada par de testículos se conservó, poco después de su recuperación, en Eurocollins frío durante 30 minutos. En condiciones estériles, los testículos se picaron a un tamaño muy fino hasta que se obtuvo un tejido fino y homogéneo. El tejido se sometió a múltiples etapas de digestión enzimática mediante colagenasa P, tripsina, y DNAasa. La digestión, después de varios lavados en TCM 199, se resuspendió en HAM F12 suplementado con nicotinamida, 3-isobutil-1-metilxantina, seroalbúmina y penicilina-estreptomocina. Por último la suspensión tisular se filtró a través de una red de acero inoxidable con un tamaño de poro de 500 µm, se cultivó en placas Petri de 100 × 15 mm y el cultivo se mantuvo a 37°C en aire/CO₂ al 5% durante 48 horas (HAM F-10, suplementado con nicotinamida, IBMX, suero fetal bovino al 10%, 110 mg/dl de glucosa).

35

40

Por último, el tejido se trató con tampón de clorhidrato de tris-(hidroximetil)-aminometano 20 mM para eliminar toda célula germinal residual. El rendimiento final del procedimiento fue de 60 millones de células de Sertoli puras en un 90% por testículo. La caracterización e identificación morfológica de las células de Sertoli se llevó a cabo tiñendo la preparación con Sudán III, y MoAb dirigido contra vimentina, mientras que la viabilidad celular se documentó mediante tinción de exclusión con Azul de Trypan (las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, en presencia de Azul de Trypan al 0,2% en HBSS). Adicionalmente, la viabilidad celular también se valoró tiñendo con bromuro de etidio y acetato de fluoresceína, en microscopio de fluorescencia. Sólo las preparaciones de células de Sertoli que alcanzaron una puntuación de viabilidad por encima del 90% entraron en los protocolos de estudio. Al final del proceso de separación, para detectar una eventual contaminación con células de Leydig, la suspensión tisular se tiñó cito-enzimáticamente para valorar la actividad de la 3-hidroxi-esteroidodeshidrogenasa (tinción con Nitro-Blue Tetrazolium), una enzima que se asocia específicamente a este tipo celular. La presencia de células de Leydig era despreciable y desaparecieron completamente al mantener el cultivo durante 48 horas. Por último, se demostró la competencia funcional de las células de Sertoli mediante la capacidad *in vitro* de estas células para convertir el enantato de testosterona en 17-estradiol en presencia de la hormona estimuladora de los folículos: la especificidad del ensayo se garantizó mediante el hecho de que los receptores de la FSH se expresaba selectivamente por las células de Sertoli. Todas las hormonas se midieron mediante R.I.A. (c.v. del intra-ensayo = 3,2-4,5%; c.v. del inter-ensayo = 4-8%).

50

55

B) ESTUDIOS IN VITRO

1) Co-incubación de los islotes-células de Sertoli

60

Lotes de 20 islotes se incubaron con 200.000 células de Sertoli (islotes + 200.000 células de Sertoli) o 400.000 células de Sertoli (islotes + 400.000 células de Sertoli), en HAM F-12, por cuadruplicado. Los lotes de islotes aislados o de células de Sertoli sirvieron como controles. El medio de cultivo tisular se cambió cada 3 días y el sobrenadante se almacenó a -20°C. A los 11 días del co-cultivo, se concluyó el estudio, y las muestras se procesaron para su examen en microscopía de barrido de láser confocal (CLSM). Los niveles de insulina (IRI) se determinaron mediante RIA (c.v. del intra-ensayo < 5,5%; c.v. del inter-ensayo = 9,0%). Para evaluar el comportamiento funcional de los islotes, los lotes se expusieron secuencialmente a glucosa a diferentes concentraciones (50-300-50 mg/dl) en un sistema de incubación estático durante 2 horas.

65

2) Estudios microscópicos

a) *Procesamiento de la muestra*

5

Las preparaciones celulares se trataron siguiendo adaptaciones de procedimientos de la técnica anterior.

Al medio de cultivo se le añadió bromo-desoxiuridina (BrdU) hasta una concentración final de 10 μ M, para 24 horas de cultivo. Posteriormente, los islotes se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Los islotes marcados con BrdU, tras la desnaturalización del ADN mediante hidrólisis ácida (HCl 2M), y después de lavar, se incubaron con una dilución 1:25 de MoAb de ratón anti-BrdU (MoAb de ratón dirigido contra BrdU) en PBS con Triton X-100 al 0,3% (PBS/T) durante 18 h sobre una placa rotatoria a temperatura ambiente. Después de lavar, los islotes se incubaron con una dilución 1:25 de inmunoglobulina G de cabra dirigida contra ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en PBS/T durante 18 h sobre una placa rotatoria. Después de lavar, los islotes se almacenaron en PBS/T y a continuación se prepararon (medio de montaje acuoso, medio de montaje inmuno-Fluore) para su examen mediante CLSM. Para los experimentos de doble marcaje los islotes se incubaron por último con anticuerpo de ratón dirigido contra insulina durante 18 h a 4°C y con anticuerpo dirigido contra ratón-TRITC, durante 18 horas a 4°C, como anticuerpo secundario.

20

b) *Examen por microscopía de láser confocal (CLSM)*

Las imágenes de las muestras se obtuvieron en un microscopio LSM410. Este sistema confocal estaba acoplado a un láser de iones de argón multilínea de 25 mW y un láser de iones de HeNe de 1 mW como fuentes de luz, utilizados para obtener las señales de FITC a una longitud de onda de 488 nm y la señal de TRITC a una longitud de onda de 543 nm, respectivamente. Las muestras se examinaron con la lente de un objetivo PlanNeofluar x100 con una apertura numérica de 1,3. Las imágenes se obtuvieron, fotograma a fotograma, en un formato de barrido de 512 \times 512 píxeles. El láser de HeNe, que produce una línea principal a 543 nm, se utilizó para los experimentos de marcaje doble. Con este fin, las señales de FITC y TRITC se separaron con un espejo dicróico secundario (565 nm) y se detectaron simultáneamente mediante dos tubos fotomultiplicadores. Se colocó un filtro pasa banda (520 \pm 15 nm para FITC) y un filtro de barrera (590 nm para TRITC) delante de los dos tubos fotomultiplicadores para evitar el solapamiento entre las dos señales, como se describe en la técnica anterior.

30

c) *Análisis de procesamiento de la imagen*

35

Las secciones ópticas digitalizadas, es decir, la serie Z de los datos confocales ("pilas") se transfirieron desde el CLSM a la estación gráfica de trabajo Indigo Irix XS24 y se almacenaron en la estación gráfica de trabajo en un formato de barrido de 512 \times 512 píxeles y 2567 niveles de grises. El procesamiento de la imagen se llevó a cabo utilizando el *software* ImageSpace (Molecular Dynamics), como se ha descrito previamente.

40

Para reducir el ruido de fondo no deseado generado por la amplificación de la señal del fotomultiplicador, todas las pilas de imágenes se trataron con un filtro tridimensional (filtrado gaussiano) que se realizó sobre cada vóxel, con una máscara de 3 píxeles en las direcciones x, y y z (3 \times 3 \times 3). Las señales de FITC y TRITC o PI se elaboraron para optimizar el contraste, el brillo y la intensidad de las imágenes.

45

Para analizar la colocalización de la BrdU y la insulina, se utilizó una herramienta del *software* ImageSpace que crea un diagrama de dispersión bidimensional. Presenta en un tercer color cómo están distribuidos o co-localizados espacialmente los marcadores duales. En la gráfica de dispersión de la colocalización se ha detectado una agrupación que corresponde a las áreas del espécimen registrado por ambos detectores. Dentro de esta agrupación hemos seleccionado el área con los valores de píxel más elevados, para evitar la interferencia de fondo. La imagen resultante se podría sobreponer tanto sobre imágenes de fluorescencia como de luz transmitida (contraste de fases). Para una mejor visualización hemos utilizado una imagen de contraste de fases para mostrar la topografía celular y los sitios de colocalización en verde. Las fotografías se tomaron con una cámara de vídeo digital Focus ImageCoder Plus utilizando una película en blanco y negro 100 ASA Tmax o una película 100 ASA Kodacolor Gold.

55

Para valorar la positividad de los núcleos marcados con BrdU, se contaron al menos 40 puntos fluorescentes brillantes que corresponden a agrupaciones de replicones de ADN, independientemente de la morfología de la fluorescencia exhibida. Para valorar el porcentaje de células en replicación, se contaron todas las células marcadas con insulina, ensamblando las secciones ópticas procedentes del análisis de microscopía confocal, a lo largo de todos los islotes. Por último, las células marcadas con BrdU estaban relacionadas con las células de los islotes a las que pertenecían. El análisis de microscopía con láser confocal descartó que ninguna célula se contase más de una vez.

60

C) *ESTUDIOS IN VIVO*

65

Los mismos lotes de células de Sertoli y de tejido de los islotes empleados para los estudios *in vitro* se utilizaron

para inyectar ratones CD-1, con un peso de 25 g aproximadamente, que se habían hecho diabéticos con múltiples inyecciones de estreptozotocina a bajas dosis (STZ), a 40 mg/kg/d, durante cinco días.

5 Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 10 días de la última inyección de STZ, en condiciones post-absortivas. Sólo los ratones que tenían asociados valores de glucosa en sangre superiores a 400 mg/dl durante al menos 3 mediciones consecutivas se incluyeron en el estudio. La "supervivencia del trasplante" estaba asociada a la inversa de la hiperglucemia y al mantenimiento de la glucosa en sangre por debajo de 150 mg/dl. Se asumió el fracaso en los animales que retornaron a hiperglucemia después de la remisión inicial. 10 ratones diabéticos se dividieron en dos grupos:

10 1) n = 5 ratones que recibieron un trasplante intraperitoneal de una dosis unitaria de 1000 islotes + 10.000 células de Sertoli que contienen microcápsulas de alginato/poli-L-ornitina (AG/PLO);

15 2) n = 5 ratones control que recibieron un trasplante intraperitoneal de solo 1000 islotes, que contienen microcápsulas de AG/PLO.

La glucosa en sangre se midió con un reflectómetro a los 3 y 7 días del trasplante, y posteriormente una vez a la semana durante todo el estudio.

20 Las microcápsulas se prepararon según el método en el que cuentas de gel de AG que contienen los islotes se recubrieron con PLO y una capa exterior de AG, para así proporcionar un escudo inmunoaislante a los islotes.

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

25 Estudios con microscopía confocal

Los datos eran la media de tres experimentos diferentes y se expresan como media \pm DE. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,01$) en una prueba t de Student pareada. Se encontró que todas las demás diferencias no eran significativas con una $p > 0,01$.

30 Estudios metabólicos *in vitro*

i) Liberación de insulina durante la incubación estática con glucosa: los datos se analizaron por mediciones repetidas del análisis de la varianza (ANOVA) seguido por una prueba post-hoc (procedimiento de Bonferroni). Los datos eran la media \pm DE y $p < 0,05$ era significativo.

ii) Conversión de testosterona en estradiol: los datos se expresaron como media \pm DE. El asterisco indica diferencias significativas en una prueba t de Student pareada.

40 E. RESULTADOS

1) Valoración de la actividad mitótica celular tras el co-cultivo con células de Sertoli

45 Con referencia a las figuras 8A y 8B, cuando los islotes se cultivaron en solitario, sólo unas pocas células mostraron un patrón de fluorescencia brillante (las áreas más claras de la figura 8A) correspondiente al inmunomarcaje de la insulina, mientras que la mayoría de las células estaban poco o nada teñidas. Por el contrario, todas las células de los islotes que pertenecen a los grupos de co-cultivo de islotes/células de Sertoli se tiñeron positivamente para la insulina como demuestran los patrones de fluorescencia muy brillantes (las áreas más claras de la figura 8B).

50 La presencia de células en replicación dentro de los islotes con una elevada expresión de insulina se examinó utilizando experimentos de doble marcaje con CLSM para obtener en el mismo plano focal, dentro de la misma célula, la fluorescencia procedente de la insulina y de la BrdU.

55 Como se ilustra en la figura 8C, en la región ecuatorial del islote se detectaron algunas células positivas para BrdU, cuyos citoplasmas estaban todos intensamente teñidos con el anticuerpo dirigido contra insulina. Cuando se juntaron las dos imágenes, estas áreas coincidían con la región nuclear (figura 8, C-E), que parecía una región oscura y sin teñir cuando se presentaba la insulina sola (figura 8, B-F).

60 2) Cuantificación del número de células mitóticas

Para evaluar el porcentaje de células pancreáticas que entran en la fase S del ciclo celular tras el co-cultivo con células de Sertoli, utilizamos el marcaje con 5'-BrdU, seguido de inmunotinción fluorescente. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 1.

65 Tabla 1

Porcentaje de células que eran positivas a la inmunotinción para 5'-BrdU, con o sin incubación con SC, a los 12 días del cultivo *in vitro*. Para cada experimento, se contaron 300 células. Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos por separado. Los valores de * $p < 0,01$ eran significativos.

5 INMUNOTINCIÓN CON BrdU

Células de Sertoli	% de células viables (SC)	BrdU-positivos
Ninguna	91 \pm 5	1 \pm 1
200.000	93 \pm 3	5,8 \pm 1,3*
400.000	92 \pm 4	8,1 \pm 1*

10 La proliferación celular se valoró 24 horas después de la estimulación mitógena, puesto que previamente se había informado de que este es el momento en el que, después del estímulo mitógeno, se detecta el mayor número de células que han entrado en la fase S. Aunque en las condiciones control se puso en evidencia que daban positivo no más del 1% de las células 5'-BrdU, el porcentaje de los números relacionados con las células mitóticas se incrementó significativamente desde el 1% al 8,1% tras la co-incubación con las células de los islotes/células de Sertoli.

15 3) Datos metabólicos *in vitro*

20 Consistente con los anteriores hallazgos morfológicos publicados, hemos observado un incremento significativo en la producción de insulina endógena procedente de los islotes que se habían co-cultivado con células de Sertoli, en comparación con islotes solos o células de Sertoli solas, a lo largo del periodo de mantenimiento del cultivo *in vitro* (niveles de IRI totales entre 90 \pm 10 μ U/ml -islotes solos- y 127,5 \pm 12 μ U/ml -islotes + células de Sertoli, $p < 0,05$). La significación estadística del aumento de secreción de insulina, que deriva de los complejos de islotes-células de Sertoli, en comparación con los islotes solos, en estimulación estática con glucosa, tanto el día 3 (figura 9a) como el día 9 (figura 9b) del mantenimiento del cultivo, sólo se alcanzó con la combinación de islotes + 400.000 células de Sertoli.

25 4) Datos del trasplante *in vivo*

30 Se consiguió la reversión completa de la hiperglucemia en los dos grupos experimentales y se mantuvo en el 100% de los receptores, 45 días después del trasplante, mientras que a los 52 días del injerto, falló en uno de los animales del grupo (islotes), frente a ninguno de los animales del grupo (islotes + células de Sertoli). El primer animal que pertenece al grupo (islotes + células de Sertoli) mostró recurrencia de la hiperglucemia 75 días después del trasplante. En ese momento, habían fallado 3/5 animales del grupo (islotes). 100 días después del trasplante, tres animales del grupo (islotes + células de Sertoli) aún eran euglucémicos frente a uno del grupo (islotes).

35 **Referencias**

40 1. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG y Sorenson RL. Effect of homologous placental lactogens, prolactins and growth hormones on islets - cells division and insulin secretion in rat, and human islets: implications for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 1993; 132: 879-887.

2. Hayek A, Beattie GM, Cirulli V, Lopez AD, Ricordi C y Rubin JS. Growth Factor/Matrix-Induced Proliferation of Human Adult -Cells. *Diabetes* 1995; 44: 1458-1460.

45 3. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, y Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nature Med*, 2000; 6, 3: 278-282.

50 4. Huotari, MA, Palgi J, Otonkoski T. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of -cellulin as a novel -cell mitogen *Endocrinology* 1998; 139:1494-1499.

55 5. Sharpe RM. Intratesticular control of steroidogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990; 33,787-807.

6. Buch JP, Lamb DJ, Lipshultz LI y Smith RG. Partial characterization of a unique growth factor secreted by human Sertoli cells. *Fertil Steril* 1988; 49: 658-665

7. Jègou B. The Sertoli cell. *Bailliere's Clinical and Metabolism* 1992; 6, 273-311.

8. Saporta S, Cameron DF, Borlongan CV y Sanberg PR. Survival of rat and porcine Sertoli cell transplant in the rat striatum without cyclosporine-A immunosuppression. *Exp Neurol* 1997;146, 299-304.

9. Sanberg PR, Borlongan CV, Othberg AI, Saporta S, Freeman TB y Cameron DF. Testisderived Sertoli cells have a trophic effect on dopamine neurons and alleviate hemiparkinsonism. *Nat Med* 1997; 3: 1129-1132.
- 5 10. Korbitt GS, Elliott JF y Rajotte RV. Cotransplantation of Allogeneic Islets With Allogeneic Testicular Cell Aggregates allows Long-Term Graft Survival Without Systemic Immunosuppression. *Diabetes* 1997; 46, 317-322.
11. Mather JP y Philips DM. Primary culture of testicular somatic cells. In: *Methods for Serum Free Culture of Cells of the Endocrine System*, DW Barnes, editors. Nueva York; Liss, 1984.p. 24-25.
- 10 12. Le Magueresse B y Jègou B. In vitro effect of germ cells on the secretory activity of Sertoli cells recovered from rats of different ages. *Endocrinology* 1988; 22: 1672-1680.
- 15 13. Galdieri M, Ziparo E, Palombi F, Russo MA y Stefanini MJ. Pure Sertoli cell cultures: a new model for the study of somatic-germ cell interaction. *J Androl* 1981; 5: 249-259.
14. Brelje TC, Sorenson RL. Role of prolactin versus growth hormone on islets -cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology* 1991; 128: 45-57.
- 20 15. Neri LM, Raymond Y, Giordano A, Capitani S y Martelli AM. Lamin a is a part of the internal nucleoskeleton of human erythroleukemia cells. *J Cell Physiol* 1999; 178: 284-295.
16. Neri LM, Martelli AM y Maraldi NM. Redistribution of DNA topoisomerase II after in vitro stabilization of human erythroleukemic nuclei by heat or Cu⁺⁺ revealed by confocal microscopy. *Mic Res Techn* 1999; 36: 179-187.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables, capaces de producir tras el xenotrasplante insulina de cerdo en un receptor mamífero apropiado, incluyendo o comprendiendo el método:
- 5 (i) la obtención del páncreas de lechones que se encuentran a entre -20 y +20 días de su gestación completa, y
- (ii) la extracción de islotes procedentes de un cultivo de los páncreas obtenidos utilizando una colagenasa adecuada,
- 10 siendo el cultivo de los páncreas obtenidos:
- a) de páncreas obtenidos y reducidos mecánicamente, y
- b) una albúmina de mamífero de soporte sustancialmente exenta de agentes microbianos no humanos,
- 15 en el que los páncreas y/o los islotes se someten al agente protector contra traumatismos lignocáina, y en el que los islotes se mezclan y/o se co-cultivan con células de Sertoli.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que:
- 20 (a) los islotes (al menos en alguna fase durante el desarrollo del método) se exponen a nicotinamida;
- (b) la albúmina de mamífero es seroalbúmina humana (HSA); y/o
- 25 (c) la colagenasa se selecciona entre Liberase® humana y Liberase® porcina.
3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que los lechones se encuentran a entre -7 y +10 días de su gestación completa.
- 30 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha Liberase® es Liberase® humana.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los islotes se tratan con nicotinamida después de su extracción del páncreas.
- 35 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método incluye una etapa adicional de tratar los islotes con IGF-1 o el tripéptido N-terminal del IGF-1 (GPE).
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la preparación o el aislamiento de las células de Sertoli incluye el uso de, o la exposición a, un tampón para reducir selectivamente las células germinales.
- 40 8. Un método según la reivindicación 7, en el que el tampón es clorhidrato de tris-(hidroximetil)-aminometano.
- 45 9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación empleada de células de Sertoli a islotes es sustancialmente de 10-1000 células de Sertoli/islote.
10. Una preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables preparados según el método de una o más de las reivindicaciones 1 a 9.
- 50 11. Un dispositivo implantable que comprende la preparación de islotes de cerdo según la reivindicación 10.
12. Un dispositivo implantable según la reivindicación 11, en el que el dispositivo es un tubo vascularizado subcutáneo que comprende la preparación de islotes de cerdo xenotrasplantables, que es capaz de producir insulina de cerdo en respuesta a glucosa en un mamífero receptor, limitando el tubo *in vivo* la salida de las células de los islotes y permitiendo un acceso abundante a los vasos sanguíneos, empleando o conteniendo también el tubo células de Sertoli para reducir o evitar sustancialmente el rechazo inmunitario de los tejidos en el mamífero receptor.
- 55 13. Un dispositivo implantable según la reivindicación 12, en el que las células de los islotes se han aislado de un cultivo ayudado por HSA utilizando una colagenasa adecuada y se han expuesto a nicotinamida antes de la encapsulación en el tubo.
- 60 14. Un dispositivo implantable según la reivindicación 12 ó 13, en el que las células de Sertoli se mezclan con los islotes antes de su inserción en, o dentro de, el tubo.
- 65 15. Un dispositivo implantable según la reivindicación 12 a 14, en el que las células de Sertoli se mezclan con los

islotos sustancialmente en una relación de 10-1000 células de Sertoli/islote.

5 16. Un dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que dicho cultivo procede de tejido pancreático obtenido y reducido mecánicamente, habiendo sido expuesto tal tejido a un agente de reducción de traumatismos.

10 17. Un dispositivo implantable según la reivindicación 11, en el que el dispositivo es una cápsula xenotrasplantable que comprende la preparación de los islotes de cerdo xenotrasplantables, que es capaz de producir insulina porcina en respuesta a glucosa en un mamífero receptor dentro de su material o materiales de encapsulamiento biocompatibles, siendo tal la cápsula que la encapsulación es tal como para impedir que el contacto de dicha o dichas células de los islotes con el tejido de un mamífero receptor todavía *in vivo* permita la entrada de glucosa en las células de los islotes y la salida de insulina porcina desde dichas células de los islotes, en el que las células de los islotes están asociadas a células de Sertoli.

15 18. Un dispositivo implantable según la reivindicación 17, en el que las células de los islotes se han aislado de un cultivo ayudado por HSA utilizando una colagenasa adecuada y se han expuesto a nicotinamida antes de la encapsulación.

20 19. Un dispositivo implantable según la reivindicación 17 ó 18, en el que dicho cultivo procede de tejido pancreático obtenido y reducido mecánicamente, y dicho tejido que se ha expuesto a un agente de reducción de traumatismos.

20. Un dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que dicha encapsulación ha sido de células de los islotes en presencia de un antibiótico adecuado.

25 21. Un dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que las células de Sertoli se mezclan con los islotes antes de su encapsulación.

30 22. Un dispositivo implantable según las reivindicaciones 17 a 21, en el que las células de Sertoli se co-cultivan con las células de los islotes antes de su encapsulación.

23. Un dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que la relación de células de Sertoli:islote es de 10-1000 células:islote.

35 24. Un dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que el material biocompatible adecuado es un alginato adecuado.

25. Un dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 24, para uso en el tratamiento de un paciente mamífero predispuesto a la diabetes o que padece de diabetes.

40 26. Un dispositivo implantable para uso según la reivindicación 25, en el que también se incluye la etapa de administrar nicotinamida al mamífero receptor antes o después de la etapa de implantación.

45 27. Un dispositivo implantable para uso según la reivindicación 25 o la reivindicación 26, en el que el método incluye adicionalmente la etapa de prescribir al paciente, antes o después de la etapa de implantación, una dieta libre en caseína.

28. Un dispositivo implantable para uso según la reivindicación 25 o la reivindicación 26, en el que el método incluye adicionalmente la etapa de someter al paciente, antes o después de la etapa de implantación, a un régimen farmacológico para reducir el colesterol.

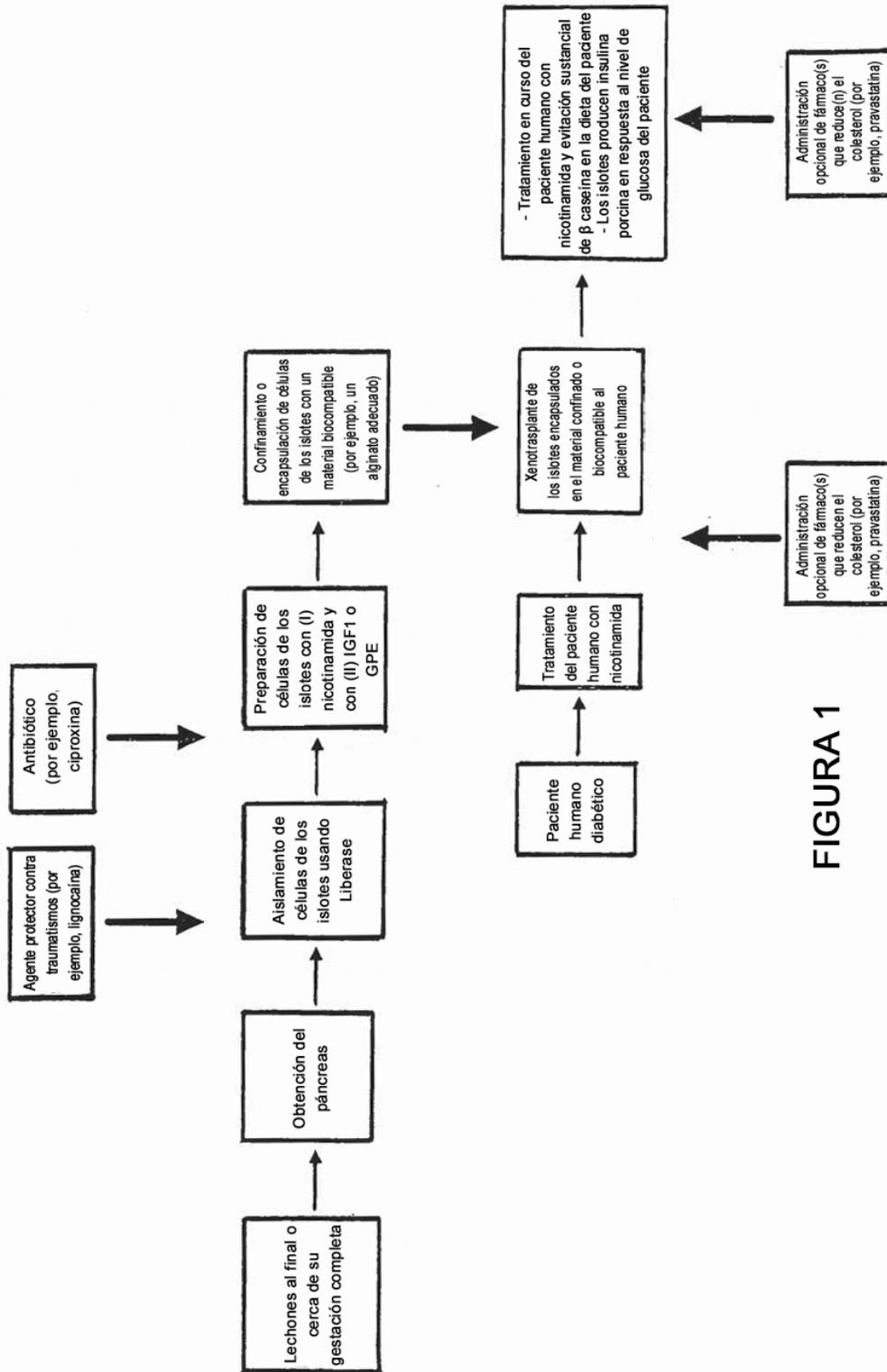


FIGURA 1

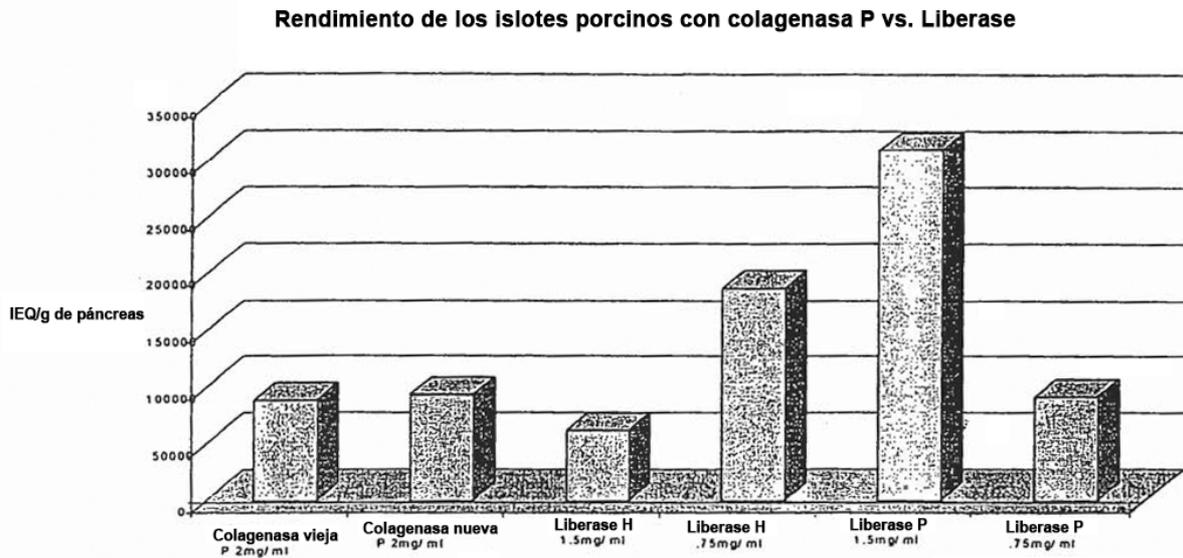


FIGURA 2

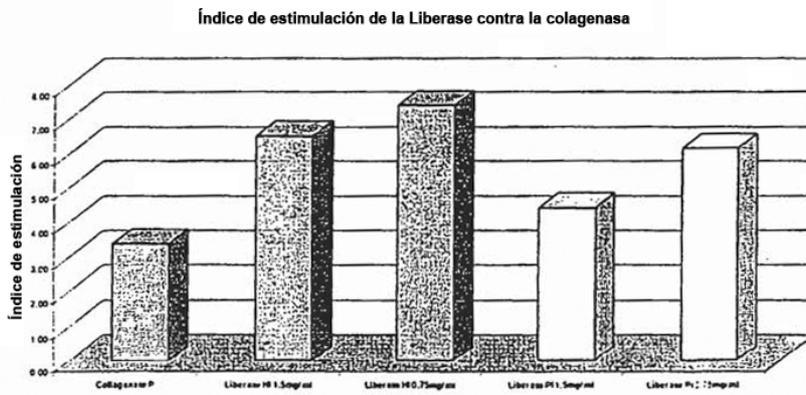


FIGURA 3

FIGURA 4

Índice de estimulación de islotes libres en un estudio con ciproxina

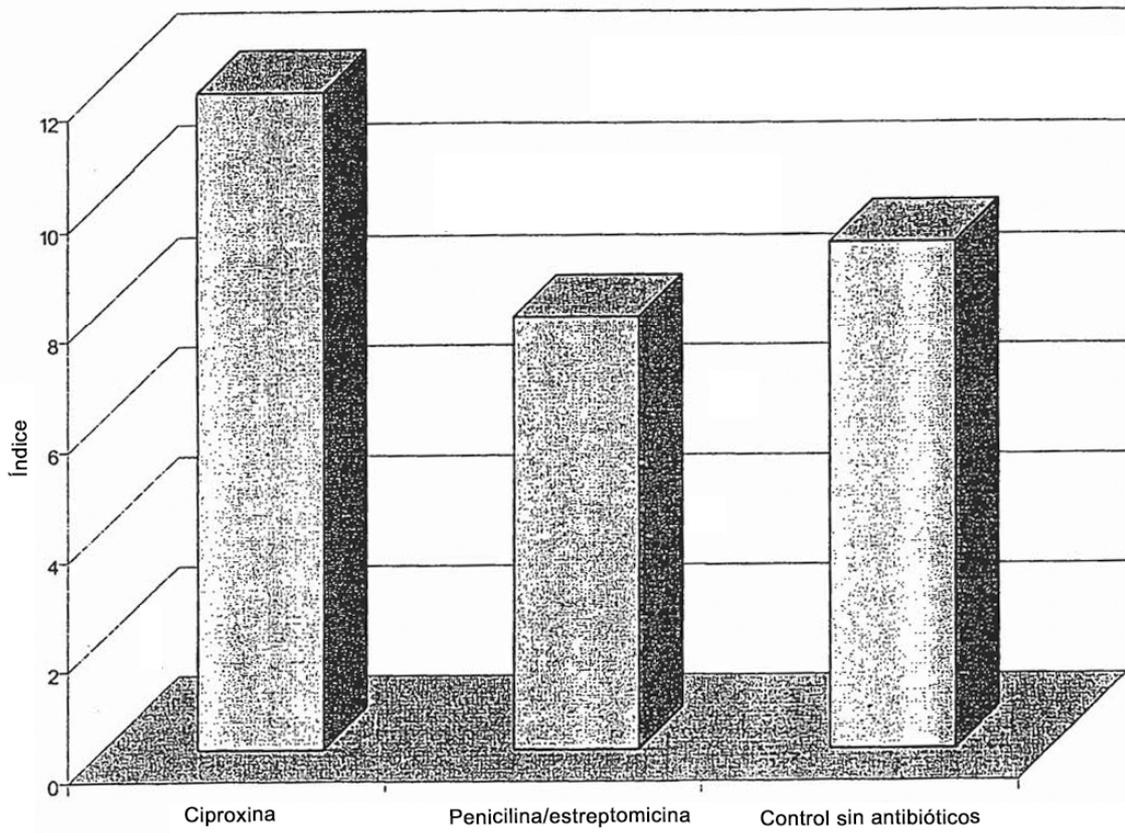
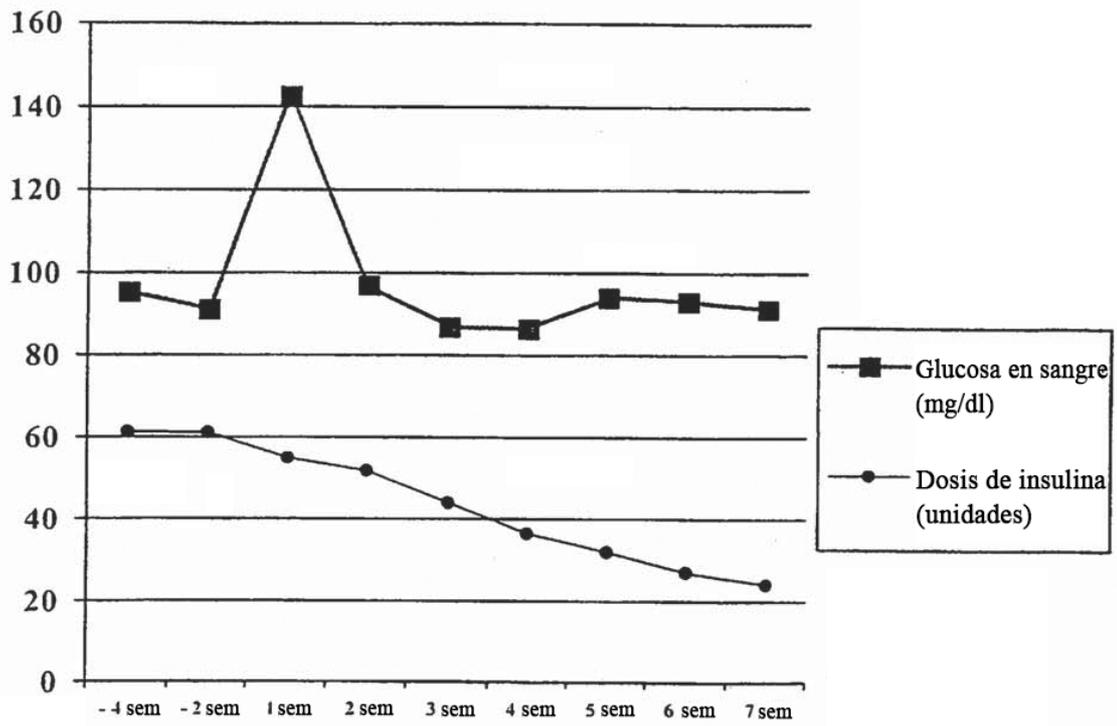


FIGURA 5



Péptido C de cerdo (ng/ml)

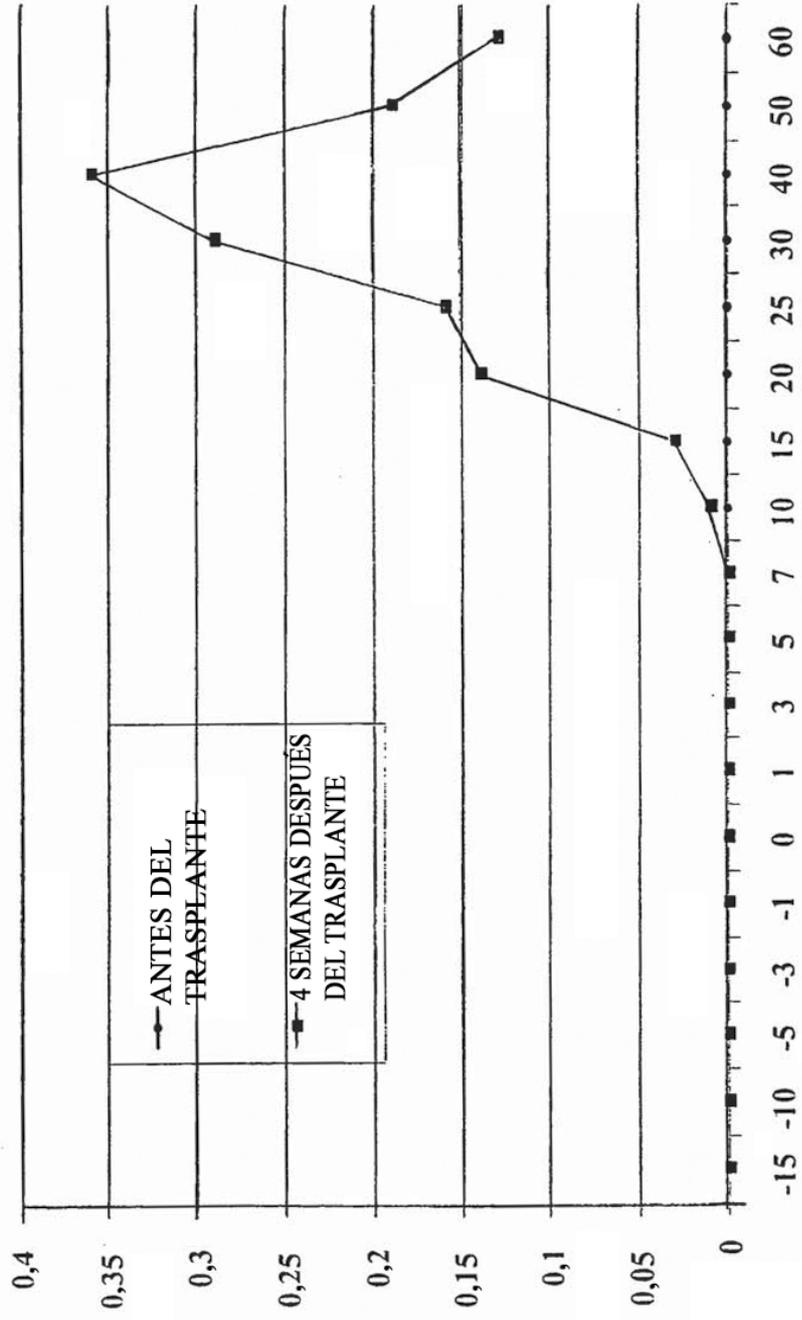


FIGURA 6

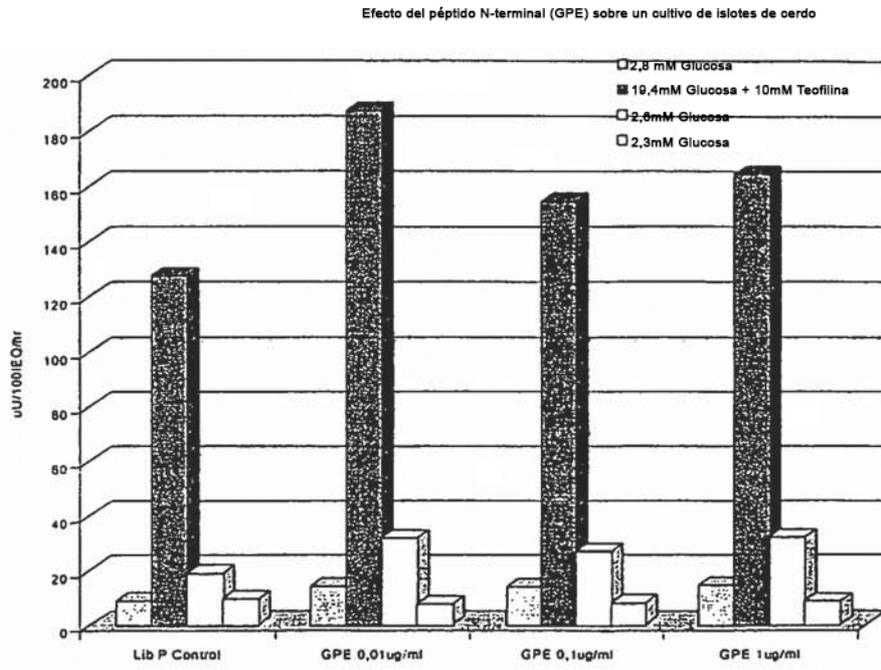


FIGURA 7

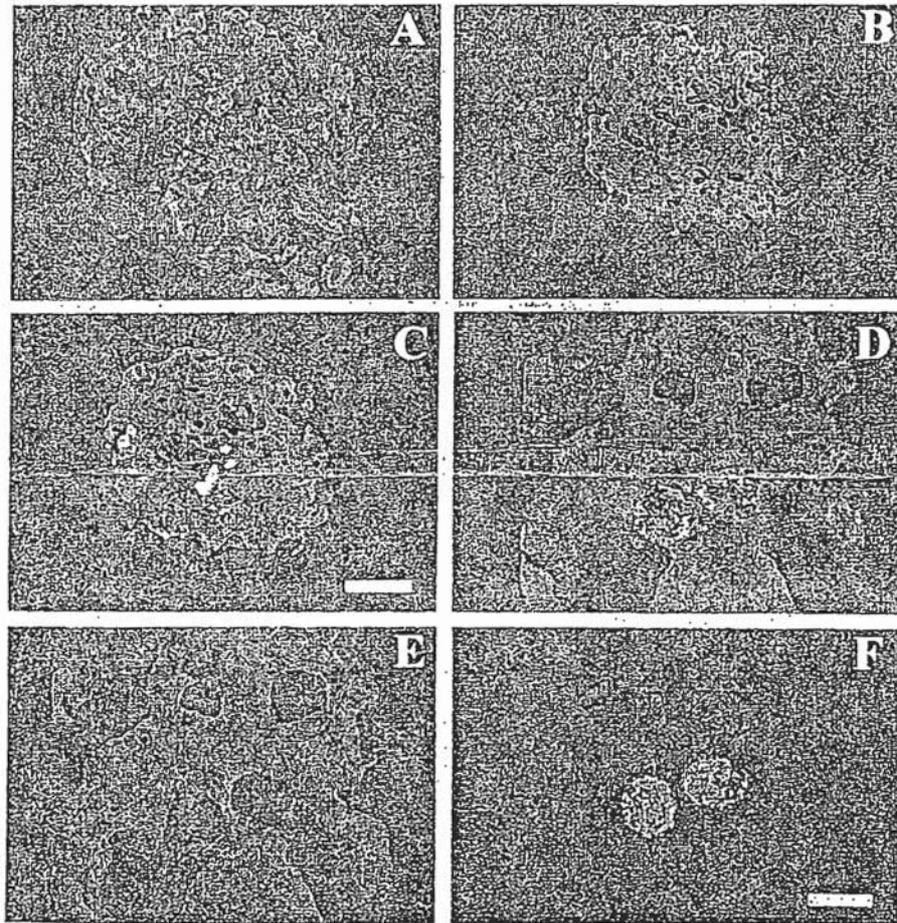


FIGURA 8

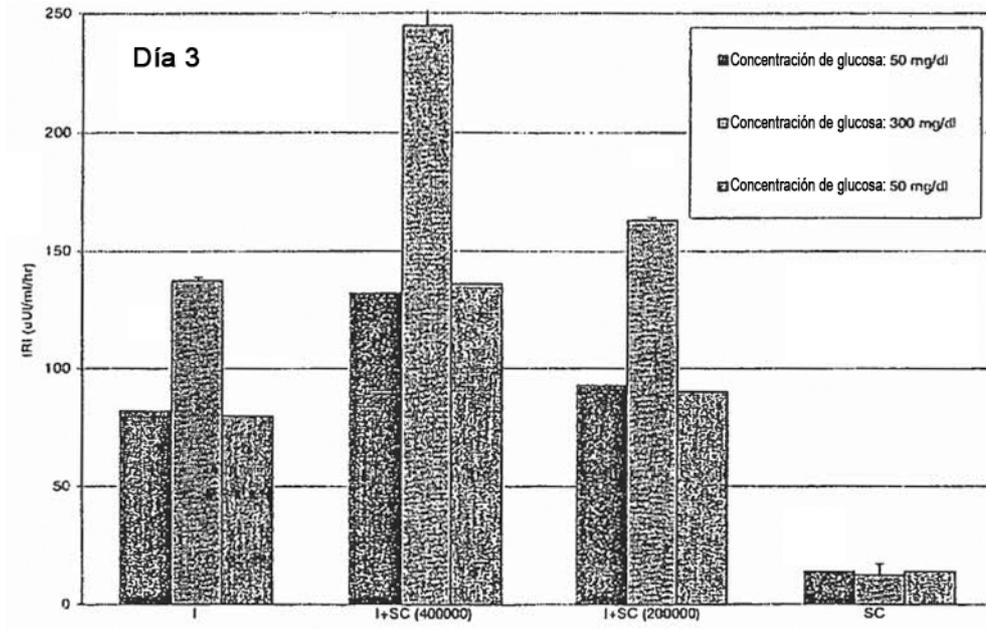


FIGURA 9A

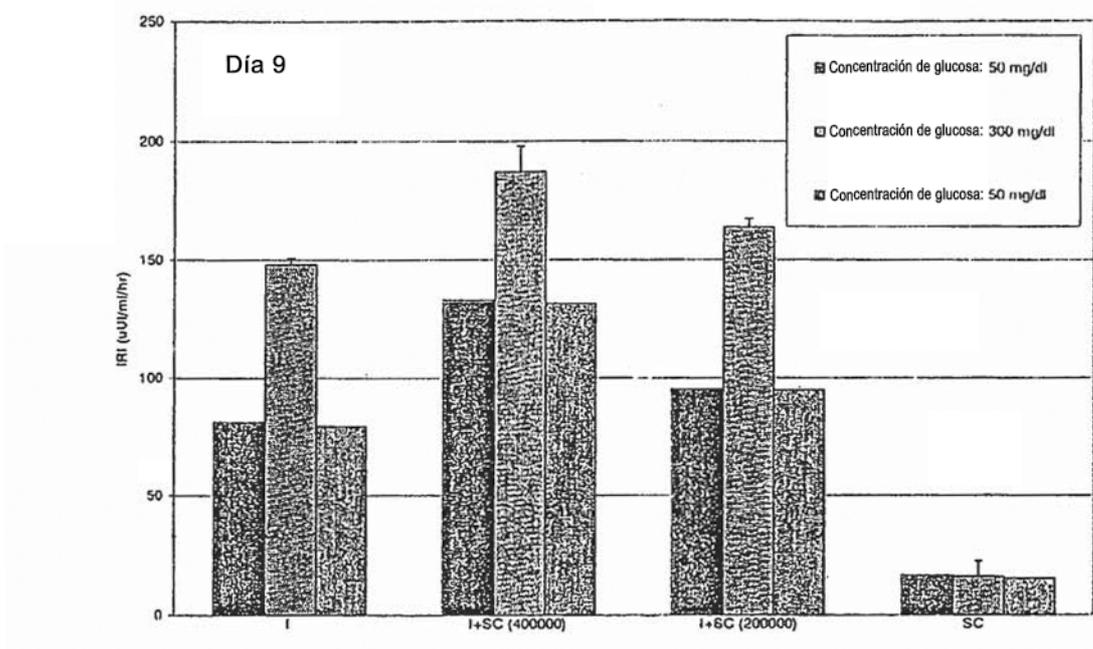


FIGURA 9B

