

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 457**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 5/09</b>	(2010.01)
<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/569</b>	(2006.01)
<b>A01K 67/027</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2012 PCT/EP2012/070612**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057164**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2012 E 12781298 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2768948**

54 Título: **Producción de una línea de células beta humanas a partir de un páncreas postnatal temprano**

30 Prioridad:

**18.10.2011 US 201161548526 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.09.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERCELL BIOSOLUTIONS (33.3%)**  
**1 place Pierre POTIER**  
**Toulouse, FR;**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA**  
**RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CZERNICHOW, PAUL;**  
**RAVASSARD, PHILIPPE y**  
**SCHARFMANN, RAPHAEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 634 457 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

Producción de una línea de células beta humanas a partir de un páncreas postnatal temprano

La presente invención se refiere a un método para preparar células beta humanas in vitro a partir de tejido pancreático. Particularmente se preocupar de obtener células que secretan insulina a partir de un páncreas obtenido durante un periodo postnatal temprano. También se refiere a métodos de diagnóstico de la diabetes empleando tumores de células beta o células derivadas de los mismos.

**Antecedentes de la invención**

La diabetes es una enfermedad crónica que afecta a 200 millones de personas en el mundo. La diabetes tipo 1 resulta de la destrucción autoinmune de células beta, mientras que la diabetes tipo 2 se causa por una combinación de resistencia a la insulina, y una inadecuada secreción de insulina. Por tanto, tanto en la diabetes tipo 1 como en la de tipo 2, la masa celular beta funcional no es suficiente para controlar la glucemia.

El páncreas maduro contiene dos tipos de tejido: tejido exocrino, compuesto de células acinares que producen enzimas (por ejemplo, carboxipeptidasa-A) secretadas a través de los conductos pancreáticos en el intestino, y de islotes endocrinos compuestos de células que producen hormonas, tales como, insulina (células beta), glucagón (células alfa), somatostatina (células delta) y polipéptido pancreático (células PP). Durante las últimas décadas la investigación en el campo de células beta se ha beneficiado de la creación de líneas de células que secretan insulina, tales como, células RIN y INS1, derivadas de un insulinoma de rata inducido por rayos x (Asfari et al., 1992; Gazdar et al., 1980) células HIT generadas por transformación de células islote de hámster mediante células SV40 (Santerre et al., 1981) y células beta TC y células Min6 derivadas de ratones transgénicos que expresan el antígeno T SV40 bajo el control del promotor de insulina (Efrat et al., 1995; Efrat et al., 1993; Efrat et al., 1988; Hanahan, 1985; Knaack et al., 1994; Miyazaki et al., 1990). Tales líneas celulares fueron útiles para un mejor entendimiento de la biología de células beta y se podrían utilizar para el cribado del fármaco.

La generación de células beta pancreáticas en gran cantidad representa un importante objetivo, porque tales células beta se podrían emplear para la terapia celular de la diabetes. Además, tales células beta pancreáticas serían también útiles para el cribado de nuevos fármacos que pudieran modular la función de células beta. Con este fin, se han desarrollado anteriormente diferentes planteamientos para generar células beta pancreáticas en gran cantidad.

El primero consistía en emplear como material de inicio células madre embrionarias inmaduras (células ES) para producir células beta humanas o de ratón. La principal ventaja es que las células ES se auto-renuevan indefinidamente en cultivo, y tienen la capacidad de diferenciarse a múltiples tipos de células, y por tanto, a células beta pancreáticas. Aunque han aparecido una gran cantidad de publicaciones en los últimos años sobre la producción de células beta a partir de células ES (Assady et al., 2001; Blyszczuk et al., 2003; Brolen et al., 2005; Hori et al., 2002; Lumelsky et al., 2001; Soria et al., 2000), otras publicaciones describieron inconvenientes en tales trabajos, cuestionaron las interpretaciones y demostraron que los protocolos reproducibles no eran disponibles aún para producir células beta a partir de células ES (Hansson et al., 2004; Rajagopal et al., 2003).

Por lo tanto, en este punto no se han generado aún células beta funcionales en grandes cantidades a partir de células ES, con la excepción de una publicación reciente donde se desarrollaron células beta a partir de células hES (D'Amour et al., 2006). Sin embargo, tales células no secretaban insulina tras la estimulación de glucosa.

Un segundo planteamiento era derivar líneas celulares beta a partir de tumores de células beta derivadas de ratones transgénicos que expresan el antígeno T SV40 bajo el control del promotor de insulina (Efrat et al., 1995; Efrat et al., 1993; Efrat et al., 1988; Hanahan, 1985; Knaack et al., 1994; Miyazaki et al., 1990). Estas líneas celulares han sido extremadamente útiles para el estudio detallado de células beta de roedores. Sin embargo, como existen muchas diferencias entre las células beta humanas y de roedores, estas células beta no se pueden emplear para el diagnóstico o terapia en el ser humano. También, ya que estas líneas celulares beta se obtuvieron mediante transferencia genética en óvulos fertilizados, tal método es restrictivo para modelos animales, sin ninguna transferencia posible al ser humano.

Un tercer planteamiento ha sido llevado a cabo por Ravassard et al. (2011). Estos autores describieron la obtención de una línea de células beta humana funcional estable, diseñaron EndoC-βH1, con secreción de insulina inducible por glucosa mediante el empleo de células pancreáticas fetales humanas transducidas con vectores lentivirales que expresan SV40LT bajo el control del promotor de insulina. En este planteamiento las células pancreáticas transducidas se injertaron en ratones con SCID (síndrome de inmunodeficiencia combinada severa) para que pudieran desarrollarse dentro del tejido pancreático. Las células beta humanas diferenciadas, expresaron SV40LT simultáneamente con insulina, proliferaron, y formaron insulinomas. Estos insulinomas se transdujeron a continuación con un vector lentiviral que expresó hTERT (telomerasa transcriptasa inversa), y las células de insulinomas que transdujeron hTERT se reinjertaron dentro de otros ratones con SCID para amplificar además la proliferación de células beta. Después de eliminar el tejido transplantado de estos ratones con SCID, las células se disociaron y se expandieron entonces en un cultivo como líneas celulares. Las células EndoC-βH1 resultantes contenían 0,48 µg de insulina por millón de células, eran estables al menos durante 80 etapas, y expresaron muchos marcadores celulares beta específicos, sin ninguna expresión sustancial de los marcadores de otros tipos de células

pancreáticas. Las células EndoC- $\beta$ H1 secretan insulina en respuesta a la estimulación de glucosa, y la secreción de insulina se mejora mediante secretagogos conocidos tales como exendina-4, glibenclamida, y leucina. Finalmente, el trasplante de células EndoC- $\beta$ H1 en ratones con DM inducida químicamente normaliza su glucemia.

5 Sin embargo es de interés obtener células beta generadas a partir de un páncreas post-natal más maduro. En particular, sólo se pueden obtener células pancreáticas embrionarias después de la finalización de la gestación, lo cual puede plantear cuestiones éticas o legales en un gran número de países. Por tanto, sería preferible emplear material no embrionario para generar líneas de células beta pancreáticas humanas.

10 Se han realizado varios intentos para generar líneas de células beta humanas a partir de muchas fuentes pancreáticas humanas, tales como, islotes o insulinomas de adultos. Sin embargo, la producción de insulina mediante estas células era extremadamente baja o estas células eran capaces de producir insulina sólo durante unas pocas etapas (de la Tour et al., 2001; Demeterco et al., 2002; Gueli et al., 1987; Ju et al., 1998; Levine et al., 1995; Soldevila et al., 1991). En 2005, Narushima et al (Narushima et al., 2005) presentaron que establecieron con éxito una línea de células beta humanas funcionales (NAKT-15) a partir de células del islote pancreático adulto aisladas en fresco transducidas con un retrovirus Moloney que expresa el antígeno T SV40 Grande. Sin embargo, se han planteado serias dudas respecto a este trabajo. En particular, la transferencia genética mediante tales vectores retrovirales ocurre únicamente en células que se replican activamente al tiempo de la infección (Miller DG et al., 1990), mientras que las células pancreáticas adultas son muy pobres mitóticamente (véase Chen et al., 2011 y Kohler et al., 2010). Por lo tanto, es probable que la línea celular NAKT-15 no sea una línea de células beta humanas funcionales, como se reivindica, y que el método descrito en Narushima et al., no permita al experto en la técnica obtener tal línea de células beta funcionales humanas. De hecho, el trabajo de Narushima et al., no se ha reproducido, bien por los autores o por otros laboratorios, desde la publicación original.

15 Meier JJ. et al., (2008) mostraron que el incremento de la masa de células beta post-natales humanas se debe a la replicación activa de células beta diferenciadas, y que no permanecen en las células del progenitor. Con todo, esta proliferación de células diferenciadas son incompetentes para producir líneas de células beta funcionales. Ravassard et al., (2011) intentó generar una línea de células beta funcionales a partir de islotes humanos adultos transducidos por vectores lentivirales. Las células transducidas sobrevivieron después de su trasplante en ratones inmunodeprimidos, pero no se desarrollaron después dentro de insulinomas. Estas observaciones eran consistentes con aquellas que se obtuvieron en otro informe de que células beta adultas eran reacias a la transformación empleando múltiples mutantes oncogénicos (Gidekel Friedlander et al., 2009).

20 Por esto, nunca se ha observado la formación del insulinoma a partir de células humanas no fetales, y se ha considerado imposible obtener líneas de células beta humanas a partir de material pancreático no fetal (Ravassard et al., 2011).

Por tanto, aún existe una necesidad de un método fiable y reproducible para desarrollar una línea de células beta humanas funcionales a partir de material pancreático no fetal.

### 35 Descripción

A menos que se defina de otra manera en la presente memoria, los términos científicos y técnicos empleados en relación con la presente invención, deberán tener los significados que se entienden normalmente por los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que se requiera de otra manera por el contexto, los términos particulares podrán incluir pluralidades y términos plurales podrán incluir términos particulares. Generalmente, las denominaciones y las técnicas que se emplean en relación con, el cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, química e hibridación genética, proteica y de ácido nucleico, descritos en la presente memoria, son bien conocidas, y se emplean normalmente en la técnica. La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., ed., 1994); A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal Bernard V., 1988); Phage Display: A Laboratory Manual (Barbas et al., 2001). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizaron, según las especificaciones de los fabricantes, como se realizan normalmente en la técnica, o como se describe en la presente memoria.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método alternativo para producir líneas de células beta pancreáticas humanas. En particular, la invención se dirige a un método para producir líneas de células beta humanas a partir de un páncreas humano no fetal. Como se emplea en la presente memoria, una "célula beta" es una célula de los islotes de Langerhans del páncreas que secreta la hormona insulina en respuesta a glucosa y otros secretagogos. Una "célula beta pancreática humana" o "célula beta humana" (estos términos son sinónimos en el contexto de la presente solicitud y deberá interpretarse, por tanto, para expresar el mismo significado) es una célula beta de origen humano.

- Los presentes inventores han diseñado en la actualidad una nueva estrategia para generar líneas de células beta humanas a partir de materiales de tejido no fetal. Han descubierto que, sorprendentemente, mediante el uso de un método sub-injerto con tejidos pancreáticos neonatales, las células pancreáticas eran capaces de formar estructuras de insulinoma, bajo condiciones específicas. Estas estructuras de insulinomas contienen células beta funcionales humanas, cuyos sub-injertos dan como resultado un enriquecimiento específico en células beta, conduciendo finalmente a la producción de líneas de células beta humanas homogéneas, que se pueden además, amplificar a escala clínica y comercial. Mediante la repetición de las etapas de enriquecimiento y amplificación, los inventores fueron capaces de obtener repetidamente líneas de células que se pueden amplificar para ensayo, diagnóstico o uso terapéutico.
- Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para establecer y amplificar específicamente células beta humanas a partir de tejidos pancreáticos no fetales.
- Se generaron, por tanto, varias líneas de células beta humanas. Tales líneas expresan insulina y tienen un perfil de expresión genético que se asemeja a las células beta adultas. Además, cuando se transplantaron bajo la cápsula del riñón de los ratones diabéticos, eran capaces de normalizar la glucosa en sangre. Además, las líneas de células beta humanas son capaces de normalizar la gluquemia de ratones diabéticos. Realizando la carga de glucosa de manera intraperitoneal, estos animales utilizan normalmente la carga de glucosa, demostrando sus capacidades de secreción de insulina. Por otra parte, su línea celular es capaz de responder a la estimulación de glucosa, y es además completamente funcional.
- Esto abre una perspectiva hacia el uso clínico de las células beta en el tratamiento de la diabetes. El nuevo proceso para obtener células que secretan insulina mediante este método proporciona una fuente abundante de células beta.
- Las líneas de células beta humanas obtenidas con este método se pueden emplear eficientemente para detectar la presencia de auto-anticuerpos que se encuentran en la sangre de pacientes diabéticos, y por consiguiente, tienen un gran potencial para el diagnóstico de la diabetes tipo 1. Estas células beta se están usando también para generar y amplificar líneas celulares beta humanas indefinidamente, las cuales forman lotes de células maestras para terapia celular.
- En una primera realización, un método para preparar células beta pancreáticas humanas o tumores de células beta humanas comprende las etapas de:
- a) disociar el tejido pancreático humano neonatal con colagenasa para obtener células del páncreas humano neonatal;
  - b) transducir y co-transducir las células del páncreas humano neonatal obtenido en la etapa a) con i) un vector lentiviral que expresa el antígeno T SV40 Grande bajo el control del promotor de insulina, o ii) con un vector lentiviral que expresa el antígeno T SV40 Grande bajo el control del promotor de insulina, y un vector lentiviral que expresa hTERT bajo el control del promotor de insulina, o iii) un vector lentiviral que expresa tanto el antígeno T SV40 Grande como el hTERT;
  - c) introducir el páncreas neonatal transducido obtenido en b) dentro de la cápsula del riñón de un animal no humano afectado con inmunodeficiencia comprometida severa (scid);
  - d) permitir a las células del páncreas transducidas desarrollar estructuras similares a un insulinoma, en donde las células pancreáticas humanas neonatales en las estructuras similares al insulinoma tienen células beta pancreáticas diferenciadas que producen insulina;
  - e) micro-disecionar las estructuras similares al insulinoma obtenidas en la etapa d), disociar las células de las mismas, y opcionalmente transducir dichas células con un vector lentiviral que expresa un gen de resistencia a antibiótico bajo el control del promotor de insulina;
  - f) sub-transplantar las células obtenidas en la etapa e) dentro de la cápsula del riñón dentro de un nuevo animal no humano con scid;
  - g) permitir que las células sub-plantadas en la etapa f) desarrollen y regeneren estructuras similares al insulinoma, donde dichas estructuras similares a insulinoma desarrolladas nuevamente están enriquecidas en células beta pancreáticas que producen insulina;
  - h) micro-disecionar las estructuras similares al insulinoma obtenidas en la etapa g), disociar y recoger las células de las mismas;
  - i) opcionalmente, sub-transplantar las células obtenidas en la etapa g) dentro de la cápsula del riñón de un nuevo animal no humano con scid, permitiendo, por lo tanto, el enriquecimiento y la amplificación de las células beta pancreáticas que producen insulina;
  - j) repetir opcionalmente las etapas f), g) y h) hasta obtener la cantidad apropiada de células beta pancreáticas que producen insulina.

El término “tejido pancreático” como se emplea en la presente memoria, se refiere a un tejido obtenido derivado del páncreas; asimismo, el término “células pancreáticas” se refiere en la presente memoria a las células obtenidas o derivadas del páncreas. Como se emplea en la presente memoria, el término “células pancreáticas inmaduras” se refiere a las células que se pueden obtener a partir del páncreas fetal o de células madre que provienen de la primera diferenciación de células endodérmicas.

Un “tejido pancreático humano neonatal” como se emplea en la presente memoria, es un tejido de un páncreas obtenido a partir de un individuo que ya ha nacido. Por tanto, están comprendidos por el presente método los tejidos obtenidos a partir de individuos de todas las edades. Por otro lado, la presente invención no se refiere al uso de material embrionario para obtener líneas de células beta. Preferiblemente, dichos individuos tienen menos de 5 años de edad; más preferiblemente, dichos individuos tienen menos de 1 año de edad; incluso más preferiblemente, dichos individuos tienen menos de 6 meses de edad; aún más preferible, dichos individuos tienen menos de 3 meses de edad; lo más preferible, dichos individuos tienen menos de 1 mes de edad.

La invención se refiere a un método para preparar células beta pancreáticas humanas o tumores de células beta humanas, que comprende las etapas de:

- a) disociar el tejido pancreático humano neonatal a partir de un individuo de menos de 5 años de edad con colagenasa in vitro para obtener células del páncreas humano neonatal;
- b) transducir y co-transducir las células del páncreas humano neonatal obtenidas en la etapa a) con i) un vector lentiviral que expresa el antígeno T SV40 Grande bajo el control del promotor de insulina, o ii) con un vector lentiviral que expresa el antígeno T SV40 Grande bajo el control del promotor de insulina y un vector lentiviral que expresa hTERT bajo el control del promotor de insulina, o iii) un vector lentiviral que expresa tanto el antígeno T SV40 Grande, como el hTERT;
- c) introducir el páncreas neonatal transducido obtenido en b) dentro de la cápsula del riñón de un animal no humano con inmunodeficiencia comprometida severa (scid);
- d) permitir que las células del páncreas transducidas desarrollen estructuras similares al insulinoma, en donde las células del páncreas humanas neonatales en las estructuras similares al insulinoma tienen células beta pancreáticas diferenciadas que producen insulina;
- e) micro-diseccionar las estructuras similares a un insulinoma obtenidas en la etapa d), disociar las células de las mismas;
- f) sub-transplantar las células obtenidas en la etapa e) dentro de la cápsula del riñón de un nuevo animal no humano con scid,
- g) permitir que las células sub-transplantadas en la etapa f) desarrollen y regeneren estructuras similares a un insulinoma, donde dichas estructuras similares a insulinoma desarrolladas nuevamente están enriquecidas en células beta pancreáticas que producen insulina;
- h) micro-diseccionar las estructuras similares al insulinoma obtenidas en la etapa g), disociar y recoger las células de las mismas,
- i) opcionalmente, sub-transplantar las células obtenidas en la etapa g) dentro de la cápsula del riñón de un nuevo animal no humano con scid, permitiendo además, por lo tanto, el enriquecimiento y la amplificación de las células beta pancreáticas que producen insulina; y
- j) repetir opcionalmente las etapas f), g) y h) hasta obtener la cantidad apropiada de células beta pancreáticas que producen insulina.

Como se emplea en la presente memoria, se puede recuperar mediante cirugía a partir de un individuo el tejido pancreático. El tejido pancreático como se emplea en la presente memoria, puede consistir del páncreas entero de dicho individuo, o sólo de una porción de dicho páncreas. En una realización, el tejido pancreático se ha congelado después de ser recogido. En otra realización, el tejido pancreático que se emplea en el método de la invención, es fresco. Por tanto, según esta realización específica, el presente método comprende una etapa de recoger el tejido pancreático antes de la etapa a).

Por “colagenasa”, se refiere en la presente memoria a una enzima que pertenece a la familia metaloproteinasas de matriz (MMP) que es capaz de romper los enlaces peptídicos en el colágeno. Una colagenasa como se emplea en la presente memoria, puede ser bien de origen bacteriano o animal. Las colagenasas bacterianas se diferencian de las colágenas de vertebrados en que muestran una especificidad al sustrato más amplia. A diferencia de las colagenasas animales, la colagenasa bacteriana puede atacar casi todos los tipos de colágenos, y es capaz de realizar múltiples escisiones en las regiones de la triple hélice. Preferiblemente, la colagenasa es una enzima bacteriana; más preferiblemente, es una enzima secretada por la bacteria anaeróbica *Clostridium histolyticum*. En una realización preferida, la colagenasa empleada en el presente método se selecciona del grupo que consiste en

colagenasas Tipo I-S, Tipo IA, Tipo IA-S, Tipo II, Tipo II-S, Tipo IV, Tipo IV-S, Tipo V, Tipo V-S, Tipo VIII, Tipo XI y Tipo XI-S. En la realización más preferida, la colagenasa de la invención es la colagenasa XI.

La concentración de la colagenasa empleada en la etapa a) del método, es preferiblemente inferior o igual a 5 mg/mL; más preferiblemente, de 4 mg/mL; incluso más preferiblemente de 3 mg/mL; aún más preferiblemente, de 2 mg/mL; incluso aún más preferiblemente, de 1 mg/mL. En la realización más preferida, dicha colagenasa se usa a 1 mg/mL. El tejido pancreático humano neonatal se disocia con la colagenasa durante al menos 10 minutos; preferiblemente durante al menos 15 minutos; más preferiblemente al menos 20 minutos; incluso más preferiblemente al menos 25 minutos; aún más preferiblemente al menos 30 minutos; lo más preferiblemente durante 30 minutos a aproximadamente a 37°C. Para que ocurra la disociación, los tejidos pancreáticos mencionados anteriormente, se suspenden preferiblemente en un medio apropiado que comprende PBS + 20% FCS.

La transducción de las células pancreáticas humanas neonatales obtenidas a partir de la disociación de los tejidos pancreáticos con vectores lentivirales se lleva a cabo según los métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ravassard et al., 2011 y referencias del mismo). Los vectores lentivirales son vectores derivados a partir de un lentivirus, tal como HIV1. Éstos son capaces de transducir sin dividirse, así como dividir células y mantener la expresión de secuencias de ácido nucleico heterólogo en varios tejidos diana in vivo, incluyendo células del cerebro, hígado, músculo y sistema hematopoyético. Se conoce un gran número de vectores lentivirales por los expertos en la técnica; se pueden emplear cualquiera de estos vectores en el contexto de la presente invención, proporcionando que expresen al menos el antígeno T SV40 Grande y/o hTERT, bajo el control del promotor de insulina. Los expertos en la técnica se dirigen por Ravassard et al. (2011) y WO 20088/102000, donde se han descrito ejemplos de tales vectores lentivirales.

Puede ser ventajoso recuperar las células beta humanas en determinadas condiciones. Por ejemplo, si se contempla la administración de dichas células a un paciente, es más seguro eliminar los oncogenes transportados por los vectores. Los vectores lentivirales pueden, por tanto, construirse para permitir una inmortalidad reversible o condicionada, para que se pueda introducir al menos un sitio Lox P. Más preferiblemente, los vectores se construyen para que los transgenes del antígeno T SV40 Grande y/o hTERT se localicen dentro de dos sitios Lox P. Dichos transgenes se eliminan mediante expresión de la recombinasa Cre en las células beta. Por ejemplo, las células obtenibles mediante el método anterior, se transducen mediante un vector o plásmido que expresa una recombinasa Cre y aparece reversión. Por supuesto, el experto en la técnica puede elegir emplear el sistema FRT/FLP, para eliminar dichos transgenes. Los métodos para la reversión de las células inmortalizadas son descritas en WO 01/38548.

En una realización particular, el vector lentiviral que expresa T SV40 Grande y el vector lentiviral que expresa hTERT comprende además, un sitio LoxP o FRT, proporcionó que los sitios de recombinación específicos del sitio sean diferentes en ambos vectores.

La etapa de selección negativa se puede realizar también después de la acción de la recombinasa Cre o FLP. Esta etapa permite, además, seleccionar sólo las células en las que se ha eliminado la inmortalización de los genes T SV40 Grande y hTERT, así como el gen resistente a antibiótico. Estas células se pueden congelar, almacenar y opcionalmente encapsular, hasta que se transplante en pacientes diabéticos.

El gen marcador de selección negativa puede ser, por ejemplo, el gen HSV-TK (Timidina Kinasa del virus del herpes simple) y el agente selectivo aciclovir-ganciclovir. O los marcadores de selección negativa son el gen hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) y el gen guanina fosforribosil transferasa (Gpt), y el agente selectivo es la 6-tioguanina. O el marcador de selección negativa es el gen deaminasa de citosina y el agente selectivo es la 5-fluorocitosina. Por tanto, en una realización preferida, dicho gen marcador negativo se selecciona del grupo constituido por el gen HSV-TK, el gen hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), el gen guanina fosforribosil transferasa (Gpt), y el gen deaminasa de citosina. Otros ejemplos de proteínas marcadoras de selección negativa son las toxinas virales y bacterianas, tales como, la toxina A diftérica (DTA). Estos genes y agentes de selección negativa y su uso, son bien conocidos por los expertos en la técnica, y no necesitan más detalle en la presente memoria.

Las células transducidas se introducen después en al menos una cápsula del riñón de animales afectados con inmunodeficiencia comprometida severa (scid). Un animal con scid es un animal con falta de linfocitos T y B y con fallo para generar bien inmunidad humoral o bien inmunidad celular. El animal no-humano con scid como se refiere en la presente memoria, se puede seleccionar entre bovinos, porcinos, caballos, ovejas, cabras, primates excepto seres humanos, roedores, tales como ratones, ratas, hámsters. Dicho animal no-humano con scid puede llevar al menos uno de los otros tipos de mutación que conduce a la inmunodeficiencia. Dicho animal no-humano con scid puede ser un animal diabético no obeso/con síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (NOD/scid). Un animal NOD/scid es un animal con falta de linfocitos T y B, los cuales por tanto, fallan para generar bien la inmunidad humoral o bien la inmunidad celular.

En una realización preferida, el animal NOD/scid empleado en el método de la invención, es un ratón. Los ratones NOD/scid se conocen en la bibliografía y están disponibles comercialmente a partir de proveedores, tales como, Charles River o Jackson Laboratory. Preferiblemente el ratón NOD/scid empleado en el presente método es de

cualquier edad de desarrollo, preferiblemente lo suficientemente mayor para que se pueda realizar un injerto dentro de la cápsula del riñón. Preferiblemente, los ratones NOD/scid tienen aproximadamente de 2 a 15 semanas de desarrollo, más preferiblemente de 6 a 8 semanas de desarrollo.

5 Opcionalmente, las células se transducen además en la etapa c) con otro vector lentiviral que expresa un gen de resistencia a antibiótico bajo el control del promotor de insulina. El gen resistente a antibiótico se selecciona del grupo que consiste en gen resistente a higromicina, gen resistente a neomicina, gen resistente a tetraciclina, gen resistente a ampicilina, gen resistente a kanamicina, gen resistente a fleomicina, gen resistente a bleomicina, gen resistente a geneticina, gen resistente a carbenicilina, gen resistente a cloranfenicol, gen resistente a puromicina, gen resistente a blastidina-S-deaminasa. En una realización preferida, dicho gen resistente a antibiótico es un gen resistente a neomicina. En este caso, el agente selectivo es G418.

10 El método definido anteriormente incluye la recolección de las células beta pancreáticas funcionales humanas obtenidas en la etapa g) las cuales forman una población celular homogénea. La población celular se puede cultivar además in vitro para establecer una línea de células funcionales humanas. En esta etapa, las células derivadas de los sucesivos sub-injertos contenían la T SV40 Grande y/o hTERT y los transgenes de resistencia a antibiótico. Por tanto, las líneas de células obtenibles mediante el método anterior se immortalizan y, dependiendo del punto final, pueden revertirse o no (recuperarse). En particular, la recuperación puede ser útil cuando se contempla, por tanto, un uso terapéutico de las células obtenidas.

15 El método anterior para preparar células Beta pancreáticas funcionales humanas, es particularmente útil para ensayar y cribar un medicamento candidato para tratar la diabetes in vivo o in vitro, después del injerto en animales no humanos, tales como ratones o ratas.

20 A este respecto, y en una realización específica, se puede practicar el método anterior para preparar una gran cantidad de células Beta pancreáticas funcionales humanas con propósitos de ensayar y cribar, así como para el diagnóstico in vitro que permite la clasificación de los pacientes con diabetes tipo 1 ó 2. Aquí, las células se pueden revivir. Por el contrario, con el método anterior, las etapas f), g) y h) se pueden repetir tantas veces como sea necesario para obtener una gran cantidad de insulinoma o células beta humanas aisladas del mismo, y estas células se pueden amplificar además, en cultivo in vitro indefinidamente. Se pueden unir o adsorber a un soporte sólido (por ejemplo, placas revestidas de polilisina), células beta tumorales de la sección transversal, células derivadas de la misma o un extracto proteico de esas células, y hacerles reaccionar con el suero plasmático de los individuos. Después de la incubación, el suero se lava, y se revela la presencia o ausencia de autoanticuerpos frente a diferentes antígenos de superficie específicos a una autoinmunidad asociada con la diabetes (por ejemplo, por medio de Ig anti-humana marcada).

25 Por lo tanto, en un segundo aspecto, se divulga en la presente memoria tumores de células beta humanas o insulinomas, o células beta pancreáticas humanas obtenibles mediante el método descrito anteriormente. Estos tumores de células beta humanas o células beta pancreáticas humanas muestran al menos una de las siguientes características:

- Carboxipeptidasa-A negativa
- Factor transcripcional Pdx1 positivo
- Factor de transcripción MafA positivo
- Proconvertasa Pcsk1 positiva
- 40 - Expresión del transportador de Glucosa Glut2
- Expresión de Kcnj11 y Abcc8 que codifican para las subunidades del canal de potasio
- Expresión del transportador de zinc Znt8 (Slc30a8), o
- Expresión de insulina

45 Los tumores de células beta humanas o las células beta pancreáticas humanas, como se definen anteriormente, son también positivas a la reacción con anti-insulina, anti-GAD y/o anticuerpos anti-IA2 y se pueden mantener y crecer en cultivo en un medio libre de suero y en Matrigel y células recubiertas con fibronectina. Por tanto, un cultivo celular que comprende las células beta pancreáticas humanas descritas anteriormente en cultivo en un medio libre de suero que comprende Matrigel y fibronectina, también se divulga en la presente memoria. Este cultivo celular permite expandir y establecer líneas de células beta pancreáticas humanas immortalizadas.

50 Por otra parte, las líneas celulares obtenibles mediante el método descrito anteriormente se pueden recuperar, para que se puedan emplear, por ejemplo, con objetivos de ensayar y cribar, así como para el diagnóstico in vitro permitiendo la clasificación de pacientes con diabetes tipo 1 ó 2.

El método descrito anteriormente para preparar células beta pancreáticas funcionales para el ser humano, es particularmente útil para ensayar y cribar medicamentos candidatos para tratar la diabetes in vivo o in vitro, tras el injerto en animales no humanos, tales como ratones o ratas. Específicamente, se divulga en la presente memoria, un método para ensayar y cribar medicamentos candidatos para tratar la diabetes, comprendiendo dicho método la etapa de administrar un medicamento candidato a un animal no humano injertado con células pancreáticas humanas de la invención. En una realización más específica un método comprende las etapas anteriores para obtener dichas células beta según los métodos descritos anteriormente, e injertar dichas células en dicho animal no humano. Dicho animal no-humano es preferiblemente un animal no humano con scid, como se describe anteriormente.

También se divulga en la presente memoria un método de diagnóstico in vitro de la diabetes. Los tumores de células beta de la sección transversal, células derivadas de los mismos o extracto de proteína de estas células se pueden unir o adsorber a un soporte sólido (por ejemplo, placas recubiertas de polilisina) células beta tumorales de la sección transversal, células derivadas de la misma o un extracto proteico de esas células, y hacerles reaccionar con el suero plasmático de los individuos. Después de la incubación, el suero se lava, y se revela la presencia o ausencia de autoanticuerpos frente a diferentes antígenos de superficie específicos a una autoinmunidad asociada con la diabetes (por ejemplo, por medio de Ig anti-humana marcada).

Por tanto, se divulga en la presente memoria un método de diagnóstico in vitro para la diabetes, comprendiendo dicho método la unión o adsorción de tumores de células beta humanas o células beta pancreáticas humanas como se describe anteriormente, o un extracto proteico de dichas células, a un soporte sólido, y hacerles reaccionar con el suero plasmático de los individuos, detectar la presencia o ausencia de autoanticuerpos frente a diferentes antígenos de superficie específicos para la diabetes tipo 1 o tipo 2, tales como los Anticuerpos de las Células del Islote (ICA), seleccionadas, por ejemplo, a partir de autoanticuerpos de Insulina (IAA) y anticuerpos del ácido glutámico decarboxilasa (GADA).

Preferiblemente, el suero del paciente y el control se añaden en dichas secciones del tejido de dichos tumores de células beta humanas o células beta humanas, y se incuban con una IgG anti-humana marcada, tal como una IgG anti-humana conjugada marcada fluorescente, para revelar la presencia o ausencia de auto-anticuerpos asociados con la diabetes en el suero de dicho paciente. En esta realización, la presencia de auto-anticuerpos es indicativa de diabetes.

La presencia o ausencia de auto-anticuerpos asociados con diabetes en el suero de dicho paciente, se puede detectar también mediante un western blot de un extracto proteico de dichos tumores de células beta humanas o dichas células beta pancreáticas humanas. En este caso, la presencia o ausencia de auto-anticuerpos asociados con diabetes en el suero de dicho paciente, se revela con IgG antihumana marcada, tal como IgG antihumana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). Alternativamente, la presencia o ausencia de auto-anticuerpos asociados con diabetes en el suero de dicho paciente, se detecta mediante un test ELISA, en las que las placas de los pocillos se recubren con un extracto proteico de dichos tumores de células beta humanas o dichas células beta pancreáticas humanas. Según esta realización, dicho extracto proteico se incuba con el suero del paciente y el control, y la presencia o ausencia de auto-anticuerpos asociados con diabetes en el suero de dicho paciente, se revela con IgG antihumana marcada, tal como IgG antihumana conjugada con HRP.

En otro aspecto, un método de diagnóstico in vitro de la diabetes comprende hacer reaccionar la sección de los tumores de células beta, las células derivadas de los mismos o el extracto proteico de estas células obtenible mediante el método descrito anteriormente, con el suero plasmático de los individuos, detectar la presencia o ausencia de autoanticuerpos frente a diferentes antígenos de superficie específicos para la diabetes tipo 1 o tipo 2, tales como, los Anticuerpos de las Células del Islote (ICA), o más recientemente anticuerpos específicos identificados como anticuerpos autoanticuerpos antiinsulínicos (IAA) y anticuerpos del ácido glutámico decarboxilasa (GADA) o anticuerpos IA-2 (IA2A) o anticuerpos específicos no conocidos. La identificación de anticuerpos nuevos o conocidos, se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunoblot o dot-blot.

También se proporciona en la presente memoria un kit para la clasificación de la diabetes, en donde dicho kit se puede preparar en una escala comercial. Más particularmente, los autoanticuerpos específicos son Anticuerpos de las Células del Islote (ICA), seleccionados de Autoanticuerpos antiinsulínicos (IAA) y anticuerpos del ácido glutámico decarboxilasa (GADA). De hecho, estos antígenos se expresan en la superficie de los tumores de células beta o células derivadas de los mismos obtenibles según el método anterior. Por tanto, en la presente memoria se abarca un kit de diagnóstico para la diabetes, comprendiendo dicho kit tumores de células beta o células beta pancreáticas funcionales humanas obtenibles mediante el método anterior, o extractos proteicos de los mismos, que se unen o adsorben opcionalmente a un soporte sólido.

En otra realización, las células como se describen anteriormente, se cultivan in vitro y se establecen líneas celulares beta pancreáticas humanas para el cribado de compuestos capaces de modular la secreción de insulina. También se proporciona en la presente memoria un método para cribar compuestos capaces de modular la secreción de insulina, comprendiendo dicho método las etapas de: a) poner en contacto las células beta pancreáticas humanas obtenidas mediante el método de la invención con un compuesto de ensayo, y b) detectar la secreción de insulina y medir el nivel de secreción de insulina. La secreción de insulina se puede detectar mediante cualquiera de los medios conocidos por los expertos en la técnica, como se detalla en, por ejemplo, los ejemplos experimentales de a

continuación, en Ravassard et al., y en WO 2008/102000. Según una realización preferida, el método anterior comprende una etapa de comparación del nivel de insulina secretada obtenida en la etapa b) con al menos un nivel de control. Dicho nivel de control corresponde al nivel de insulina producido por una línea celular que es conocida para secretar insulina, tal como, la línea celular EndoC- $\beta$ H1 de Ravassard. Alternativamente, dicho nivel de control  
 5 corresponde al nivel de insulina producido por una línea celular que es conocida por producir cualquier insulina. En otra realización preferida, el nivel de insulina secretado de la etapa b) se compara con dos niveles control, uno que corresponde al nivel de insulina producido por una línea celular que es conocida por secretar insulina, y el otro corresponde al nivel de insulina producido por una línea celular que se conoce por secretar insulina. En otra  
 10 realización preferida, el método anterior comprende una etapa anterior para obtener la línea celular beta pancreática humana según el método descrito anteriormente.

En otra realización, el método anterior se dirige al establecimiento de bancos de células maestras para la terapia celular de la diabetes. Aquí, el método incluye además la recuperación de las células. Dicha recuperación de las células incluye una etapa de eliminar el transgen T SV40 Grande y el hTERT a partir de los vectores lentivirales. Preferiblemente el transgen se escinde mediante la recombinación específica del sitio con una recombinasa  
 15 específica del sitio, tal como Cre o FLP, como se describe anteriormente.

En otra realización, la invención se refiere a tumores de células beta y células aisladas de los mismos, obtenibles mediante el método anterior. Como se explica, se abarca en la presente memoria tanto células inmortalizadas como recuperadas.

La presente divulgación se refiere también al empleo de dichas células para ensayar o cribar medicamentos  
 20 candidatos para el tratamiento en la diabetes, para el diagnóstico in vitro como se explica anteriormente, y para la terapia celular de la diabetes.

La presente divulgación proporciona también un método regenerador de la función del páncreas en un individuo afectado con diabetes, comprendiendo el método una etapa de administrar una cantidad eficaz de células pancreáticas funcionales humanas como se describe anteriormente, siendo dichas células revertidas a un fenotipo celular beta primario, en dicho individuo. En una realización preferida, dichas células se transplantan dentro de dicho individuo. En otra realización preferida, dicho método regenerador de la función del páncreas comprende una etapa anterior para obtener dichas células beta pancreáticas humanas mediante el método descrito anteriormente.

La presente divulgación se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico aceptable y una cantidad eficaz de las células pancreáticas funcionales humanas como se define  
 30 anteriormente, siendo dichas células encapsuladas opcionalmente.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o clínicos deseados. Una cantidad eficaz, por ejemplo, de  $10^5$  a  $10^9$  células, se puede administrar en una o más aplicaciones, aunque es preferible que sea suficiente una administración. Para los objetivos de la presente divulgación, una cantidad eficaz de precursores de células madre de células beta pancreáticas, es una cantidad que es suficiente para producir  
 35 células pancreáticas diferenciadas que son capaces de restablecer una o más de las funciones del páncreas. Se contempla que pueda ocurrir rápidamente un restablecimiento mediante la introducción de cantidades relativamente grandes de células del páncreas, como por ejemplo, superior a  $10^9$  células. Además, se contempla también que cuando se introducen menos células pancreáticas, la función se restablecerá cuando a la célula o células pancreáticas se le permita proliferar in vivo. Por tanto, se puede obtener "una cantidad eficaz" de células pancreáticas, permitiendo que en el tiempo suficiente, desde sólo una hasta unas pocas células del páncreas regeneren todo o parte del páncreas. Preferiblemente, una cantidad eficaz administrada al individuo es mayor de aproximadamente  $10^1$  células pancreáticas, preferiblemente entre aproximadamente  $10^2$  y aproximadamente  $10^{15}$  células pancreáticas, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^{12}$  células pancreáticas. En términos de tratamiento, una "cantidad eficaz" de células pancreáticas es la cantidad que es capaz  
 45 de mejorar, paliar, estabilizar, revertir, enlentecer o retrasar la progresión de la enfermedad pancreática, tal como la diabetes.

Como se emplea en la presente memoria, "vehículo aceptable farmacéuticamente" incluye todos los disolventes, tampones, disoluciones salinas, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de adsorción, y similares, que son compatibles fisiológicamente. El tipo de vehículo se puede seleccionar en base a la ruta de administración destinada. En varias realizaciones, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, transdérmica u oral. Vehículos aceptables farmacéuticamente incluyen disoluciones acuosas o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso del medio y de los agentes para sustancias activas farmacéuticamente, es bien conocido en la técnica. Una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa podría fabricarse para contener hasta 250 ml de disolución estéril de Ringer, y 100 mg de la combinación. Los métodos actuales para preparar compuestos administrables parenteralmente se conocerán o serán evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle, en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa, (1985), y las ediciones 18ª y 19ª del mismo, que se incorporan en la presente memoria por referencia.

Los métodos para introducir células dentro de individuos se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, inyección, administración intravenosa o parenteral. Se puede efectuar una administración continua o intermitente, única, o múltiple. Las células beta humanas de la invención, se pueden introducir, por tanto, dentro de cualquiera de los diferentes sitios, incluyendo pero no limitado a el páncreas, la cavidad abdominal, el riñón, el hígado, el tronco celíaco, la vena portal o el bazo. Preferiblemente, dichas células beta se depositan en el páncreas del individuo.

Las células beta pancreáticas humanas de la invención pueden ser útiles para regenerar funciones pancreáticas. Dichas células se pueden administrar también a un paciente que padece de un trastorno pancreático para tratar dicho trastorno. Por tanto, la presente divulgación contempla también un método para tratar un trastorno pancreático con células beta pancreáticas humanas obtenidas mediante el método de la invención, que comprende la administración de dichas células beta pancreáticas humanas a un paciente que necesita de las mismas. Según una realización preferida, el presente método comprende una etapa anterior de obtención de dichas células beta pancreáticas humanas a partir de un tejido pancreático humano. En una realización preferida, el tejido pancreático humano se obtiene a partir de dicho paciente que necesita de un tratamiento.

Es por tanto, otro aspecto de la presente divulgación, proporcionar células pancreáticas obtenidas mediante el método de la invención, como un medicamento. De manera más precisa, la presente divulgación se refiere al uso de células beta pancreáticas humanas obtenidas mediante el método de la invención, para preparar un medicamento para tratar un trastorno pancreático humano. Otro aspecto de la divulgación se refiere a células beta pancreáticas humanas obtenidas mediante el método de la invención para usar en el tratamiento de un trastorno pancreático humano.

Uno de los trastornos pancreáticos humanos descritos en la presente memoria, son la diabetes, hipoglucemia, o cualquier patología asociada con una disfunción de las enzimas digestivas. Preferiblemente, el trastorno pancreático humano es la diabetes dependiente de insulina (T1D).

#### Leyendas de las figuras

La Figura 1 divulga la tinción de un tejido pancreático neonatal humano que fue transducido con lentivirus que expresan T SV40 bajo el control del promotor de insulina de rata, transplantado a ratones con SCID y extraídos 12 días más tarde. Una gran cantidad de células positivas a insulina se tiñen positivamente para T SV40.

La Figura 2 divulga la tinción de un tejido pancreático neonatal humano empleando anti-insulina, anticuerpos anti-T SV40 y anti-Ki67 que se transdujeron con lentivirus que expresan T SV40 bajo el control del promotor de insulina de rata, transplantado a ratones con SCID y extraídos siete meses más tarde. La masa de células beta (células positivas a insulina) se expandieron con una proliferación principal de células positivas a insulina.

La Figura 3 muestra la tinción empleando anticuerpos anti-insulina, anti-T SV40 y anti-PDX1 del insulinoma humano derivado del ratón SCID sub-injertado.

Los ejemplos de a continuación son simplemente ejemplos del alcance de la invención y del contenido de esta divulgación. Un experto en la técnica puede diseñar y construir numerosas modificaciones a los ejemplos citados más abajo sin alejarse del alcance de esta invención.

#### Ejemplos

Construcciones de ADN y producciones del vector lentiviral

Se construyeron los vectores lentivirales, pTRIP<sup>U3</sup>.RIP405-SV40LT loxP y pTRIP<sup>U3</sup>.RIP405-hTERT loxP, mediante adición de un sitio loxP en la región 3'LTR del pTRIP<sup>U3</sup>.RIP405-SV40LT/hTERT descritos anteriormente (Ravassard et al., 2009). Ambos vectores pTRIP<sup>U3</sup> se digirieron mediante KpnI y PacI para eliminar la región 3'LTR. La región 3'LTRloxP del SIN-RP-LTcADN-WHV-U3loxP (proporcionado por Bernard Thorens) se amplificó mediante PCR y se digirieron a continuación mediante KpnI y PacI y se ligaron después dentro de dos vectores pTRIP lineales. Las reservas de los vectores lentivirales se produjeron mediante transfección transitoria de células 293T mediante encapsulación del plásmido p8.9 ( $\Delta Vpr\Delta Vif\Delta Vpu\Delta Nef$ ) (Zufferey et al., 1997) pHCMV-G que codifica la glicoproteína-G VSV (Zufferey et al., 1997) y el vector recombinante pTRIP  $\Delta U3$ , como se describió anteriormente (Zufferey et al., 1997). Los sobrenadantes se trataron con ADNasa I (Roche Diagnostic) antes de su ultracentrifugación, y los gránulos resultantes se re-suspendieron en PBS, se hicieron alícuotas, y después se congelaron a -80°C hasta su uso. La cantidad de proteína de la cápsida p24 se cuantificó mediante ELISA del antígeno HIV-1 p24 (Beckman Coulter). Todas las transducciones se normalizaron en relación a la cuantificación de la proteína de la cápsida p24.

Tejidos humanos

Se obtuvieron trozos pancreáticos neonatales humanos a partir del tallo del páncreas, tras la cirugía de niños menores de un año de edad en conformidad según la legislación bioética francesa.

Transferencia genética

5 El tejido pancreático se cortó en trozos cuadrados de 1 mm en suero bovino fetal, se trató con colagenasa XI (1 mg/ml RPMI) (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C y a continuación se lavó dos veces en PBS que contiene 20% de suero bovino fetal. Las pancreas recién nacidas se transdujeron con pTRIP ΔU3.RIP405-SV40LT lox P como se describió anteriormente (Castaing 2005, Scharfmann 2008). En resumen, los tejidos se transdujeron con una cantidad total de vectores lentivirales que corresponden a 2 μg de proteína de la cápsida p24 durante dos horas a 37°C en 200 μl de DMEM que contiene 5,6 mM de glucosa, 2% de albúmina fracción V de suero bovino (BSA, Roche diagnostics), 50 μM de 2-mercaptoetanol, 10 mM de nicotinamida (Calbiochem), 5,5 μg/ml de transferrina (Sigma-Aldrich), 6,7 ng/ml de selenito (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina, y 100 μg/ml de estreptomina y 10 μg/ml de DEAE-dextrano. Los tejidos se lavaron después dos veces con medio de cultivo y se mantuvieron en cultivo durante la noche hasta su trasplante en los ratones con scid.

Animales y trasplante en ratones SCID

15 Ratones macho (Harlan) con SCID se mantuvieron aislados. Empleando un microscopio de disección, las pancreas o islotes se implantaron debajo de la cápsula del riñón, como se describió anteriormente (17, 33). Después del trasplante en diferentes puntos de tiempo, se sacrificaron los ratones, se eliminó el riñón, y se diseccionó el injerto. Todos los estudios y protocolos animales fueron aprobados por la Oficina de Inspección Veterinaria según la legislación Francesa bajo el acuerdo número B75-13-03.

Inmunotinción de los explantes y líneas celulares pancreáticas

20 Los tejidos se fijaron en 3,7% de formaldehído antes de embeberlos en parafina. Se prepararon y procesaron para inmunohistoquímica, secciones (4μm de espesor), como se describe anteriormente (Attali et al., 2007). Los siguientes anticuerpos se emplearon para inmunotinción: anticuerpo anti-insulina de cerdo de Guinea (1/500, DakoCytomation); anti-glucagón de conejo (1/1000, Euromedex); anticuerpo anti-somatostatina de conejo (1/500, DakoCytomation); anticuerpo PDX1 anti-humano de conejo (1/2000) (45); anticuerpo anti-SOX9 de conejo (1/500, Millipore); anticuerpo anti-carboxipeptidasa A de conejo (1/600, AbD Serotec); antígeno anti-SV40LT de ratón (1/50, Calbiochem Merck Biosciences) y antígeno anti-humano Ki67 de ratón (1/50 DakoCytomation). Los anticuerpos secundarios, fueron anticuerpo anti-ratón conjugados con fluoresceína (1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories, Beckman Coulter); anticuerpo de anti-cerdo de Guinea rojo-Texas (1/200; Jackson Immunoresearch Laboratories).

30 Se capturaron imágenes digitales empleando una cámara acoplada a un dispositivo de carga de tres-chips refrigerados (Hamamatsu C5810; Hamamatsu) que estaba unido a un microscopio fluorescente (Leika; Leitz).

**Resultados**

35 Se transdujeron pequeños trozos de rudimentos pancreáticos neonatales con un vector lentiviral que expresa SV40LT bajo el control de un fragmento largo de 405 nucleótidos del promotor II de insulina de rata. Los tejidos transducidos resultantes se transplantaron a continuación bajo la cápsula del riñón de ratones con SCID. El tejido pancreático se trasplanta en el día 12 y a los siete meses. En el día 12, el análisis inmunohistoquímico empleando anticuerpos anti-insulina y anti-SV40T indicaron que cerca del 50% de las células positivas a insulina se tiñeron positivamente para SV40T, demostrando una transducción y supervivencia eficaces (Fig. 1). Después de 7 meses, el análisis inmunohistoquímico empleando el anticuerpo anti-insulina, anti-SV40T y anti-Ki67, demostró una proliferación principal de células beta (Fig. 2). Como se esperaba, la proliferación de células beta se tiñó positivamente para el factor de transcripción PDX1 y negativamente para glucagón y somatostatina (datos no mostrados). En esta etapa, algunas de las células se sub-transplantaron a nuevos ratones con SCID como se describió (Ravassard et al., 2011). Un mes más tarde, la glucemia descendió en tales ratones transplantados, un signo de formación rápida de insulinoma.

45 Se derivó una línea celular a partir de tal insulinoma. Estas células se tiñeron para inmunocitoquímica. Como se muestra en la Fig. 3, la tinción es muy rica para insulina y PDX1 y está presente para el antígeno T Grande.

## Referencias

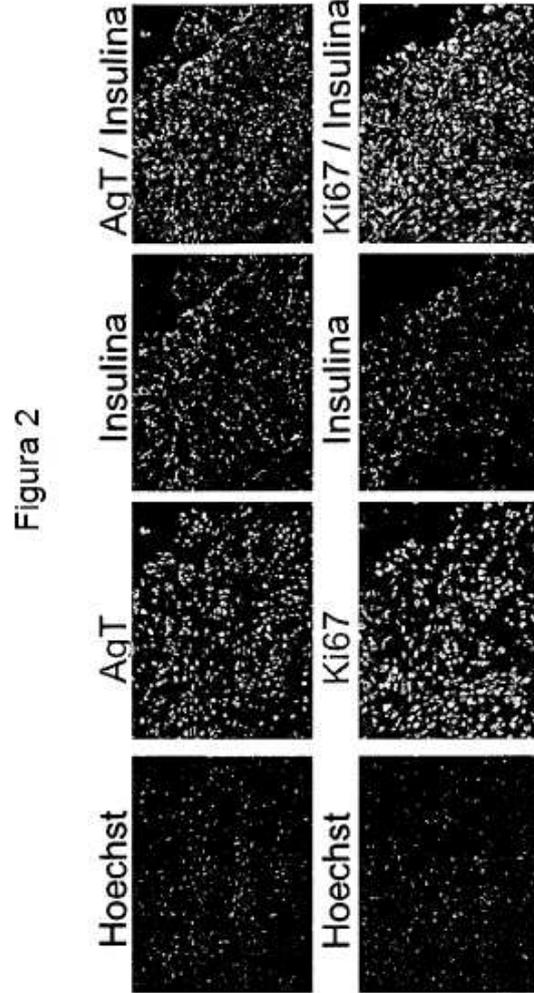
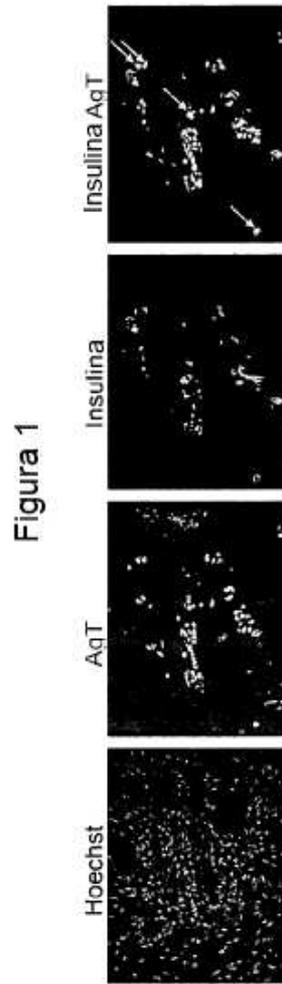
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P., y Wolheim, K. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167-178.
- 5 Attali M, Stetsyuk V, Basmaciogullari A, Aiello V, Zanta-Boussif MA, Duvillie B, Scharfman R (2007) Control of the beta-cell differentiation by the pancreatic mesenchyme. *Diabetes* 56(5):1248-1258.
- Castaing, M., Duvillie, B., Quemeneur, E., Basmaciogullari, A., and Scharfmann, (2005a). Ex vivo analysis of acinar and endocrine cell development in the human embryonic pancreas. *Dev Dyn* 234, 339-345.
- Chen H., Gu X., Su I., Bottino R., Contreras J.L., Tarakhovsky A. and Kim S.K. (2011) Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell ink4a/arf expression and regeneration in diabetes mellitus, *Genes & development*: 23:975-985.
- 10 D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., y Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.
- De la Tour, D., Halvorsen, T., Demeterco, C., Tyrberg, B., Itkin-Ansari, P., Loy, M., Yoo, S. J., Hao, E., Bossie, S., and Levine, F. (2001). Beta-cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 15, 476-483.
- 15 Demeterco, C., Itkin-Ansari, P., Tyrberg, B., Ford, L. P., Jarvis, R. A., and Levine, F. (2002). c-Myc controls proliferation versus differentiation in human pancreatic endocrine cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3475-3485.
- Efrat, S., Fusco-DeMane, D., Lemberg, H., al Emran, O., and Wang, X. (1995). Conditional transformation of a pancreatic Beta-cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3576-3580.
- 20 Efrat, S., Leiser, M., Surana, M., Tal, M., Fusco-Demane, D., and Fleischer, N. (1993). Murine insulinoma cell line with normal glucose-regulated insulin secretion. *Diabetes* 42, 901-907.
- Efrat, S., Linde, S., Kofod, H., Spector, D., Delannoy, M., Grant, S., Hanahan, D., and Baekkeskov, S. (1988).  $\beta$  cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9037-9041.
- 25 Gazdar, A., Chick, W., Oie, H., Sims, H., King, D., Weir, G., and Lauris, V. (1980). Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumour. *Proc Natl Acad Sci USA* 77,3519-3523.
- Gidekel Friedlander SY, Chu GC, Snyder EL, Girnius N, Dibelius G, Crowley D, Vasile E., DePinho RA, Jacks T. (2009). Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* 16(5): 379-89.
- 30 Gueli, N., Toto, G., Palmieri, G., Carmenini, G., Delfino, A., and Ferrini, U. (1987). In vitro growth of a cell line originated from a human insulinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 4, 281-285.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315, 115-122.
- 35 Hansson, M., Tønning, A., Frandsen, U., Petri, A., Rajagopal, J., Englund, M. C., Heller, R. S., Hakansson, J., Fleckner, J., Skold, H. N., et al. (2004). Artfactual insulin release from differentiated embryonic stem cells: diabetes 53, 2603-2609.
- Ju, Q., Edelstein, D., Brendel, M. D., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Bretzel, R. G., and Brownlee, M. (1998). Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia* 41, 736-739.
- 40 Knaack, D., Fiore, D. M., Surana, M., Leiser, M., Laurance, M., Fusco-DeMane, D., Hegre, O. D., Fleischer, N., and Efrat, S. (1994). Clonal insulinoma cell line that stably maintains correct glucose responsiveness. *Diabetes* 43, 1413-1417.
- Köhler et al, Olewinski M., Tannapfel A., Schmidt W.E., Fritsch H., Meier J.J.(2010), Cell cycle control of beta-cell replication in the prenatal and postnatal human pancreas. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* E221-E230.
- 45 Levine, F., Wang, S., Beattie, G., Mally, M., Cirulli, V., Lopez, A., and Hayek, A. (1995). Development of a cell line from human foetal pancreas. *Transplantation proceedings* 27, 3410.

- Meier JJ., Buttler A.E., A.E., Saisho Y., Monchamp T., Galasso R., Bhushan A., Rizza R.A. Butler P.C. (2008).  $\beta$ -cell replication is the primary mechanism subserving the Postnatal Expansion of  $\beta$ -cell mass in humans, *Diabetes*, 57: 1584-1594.
- 5 Miller DG, Adam M.A. and Miller A.D. (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol.* 10:4239-4242.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127, 126-132.
- 10 Narushima, M., Kobayashi, N., Okitsu, T., Tanaka, Y., Li, S. A., Chen, Y., Miki, A., Tanaka, K., Nakaji, S., Takei, K., et al. (2005). A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. *Nat Biotechnol* 23, 1274-1282.
- Rajagopal, J., Anderson, W. J., Kume, S., Martinez, O. I., and Melton, D. A. (2003). Insulin staining of ES cell progeny form insulin uptake. *Science* 299, 363.
- 15 Ravassard P, Emilie Bricout-Neveu, Hazhouz Y, Pechberty S, Mallet J, Czernichow P, Scharfmann R. (2009) A new strategy to generate functional insulin-producing cell lines by somatic gene transfer into pancreatic progenitors. *PLoS One*.4(3): e4731.
- Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M, Czernichow P, Scharfmann R. (2011), A genetically engineered human pancreatic  $\beta$  cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest.* Sep 1;121(9):3589-97.
- 20 Santerre, R., Cook, R., Criscl, R., Sharp, J., Schidt, R., Williams, D., and Wilson, C. (1981). Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 4339-4342.
- Soldevila, G., Buscema, M., Marini, V., Sutton, R., James, R. F., Bloom, S. R., Robertson, R. P., Mirakian, R., Pujol-Borrell, R., and Bottazzo, G. F. (1991). Transfection with SV40 gene of human pancreatic endocrine cells. *J Autoimmun* 4, 381-396.
- 25 Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J A., and Martin, F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalise glycaemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49, 157-162.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.

**REIVINDICACIONES**

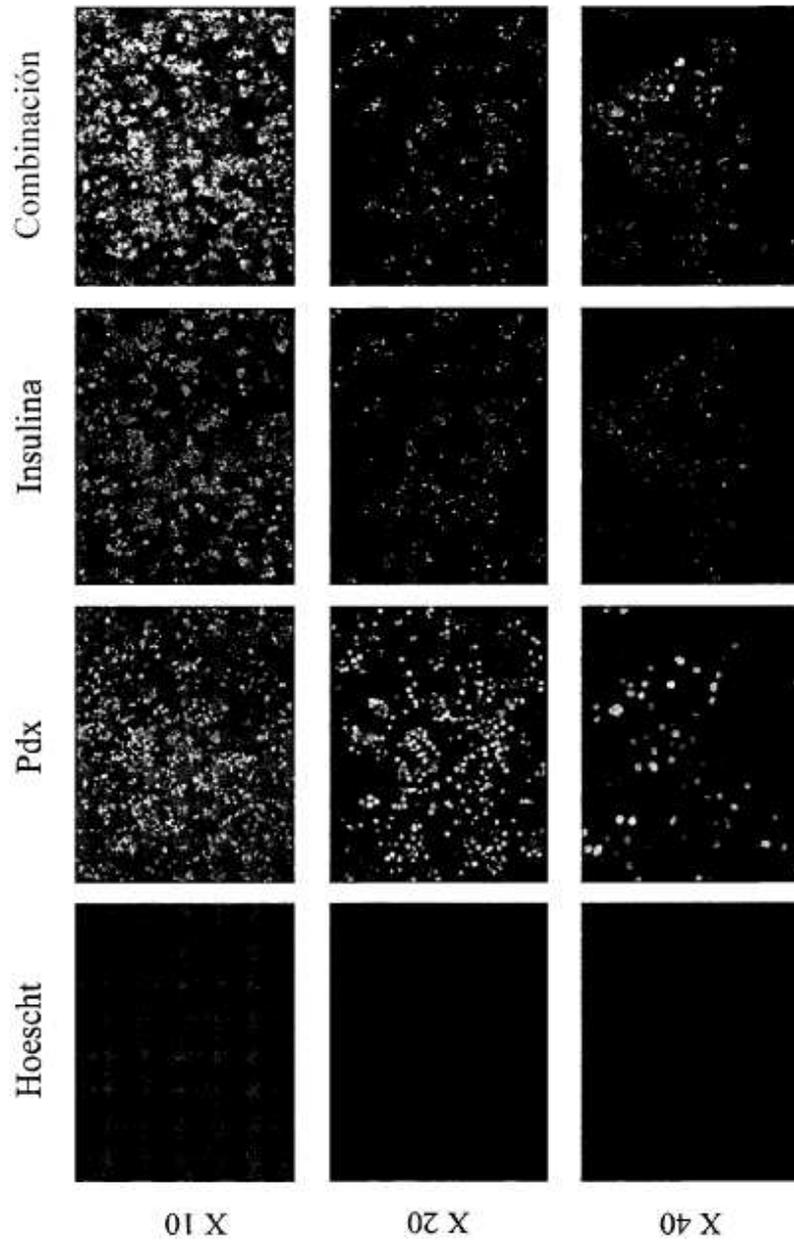
1. Un método para preparar células beta pancreáticas humanas o tumores de células beta humanas, que comprende las etapas de:
  - 5 a) disociar con colagenasa in vitro, el tejido pancreático humano neonatal de un individuo de menos de 5 años de edad, para obtener células pancreáticas humanas neonatales;
  - 10 b) transducir y co-transducir las células pancreáticas humanas neonatales obtenidas en la etapa a) con i) un vector lentiviral que expresa el antígeno T SV40 Grande bajo el control del promotor de insulina, o ii) con un vector lentiviral que expresa el antígeno T SV40 Grande bajo el control del promotor de insulina y un vector lentiviral que expresa hTERT bajo el control del promotor de insulina, o iii) un vector lentiviral que expresa tanto el antígeno T SV40 Grande como hTERT;
  - 15 c) introducir las células pancreáticas neonatales transducidas obtenidas en b) dentro de la cápsula del riñón de un animal no humano con inmunodeficiencia comprometida severa (scid);
  - d) permitir a las células del páncreas transducidas desarrollar estructuras similares al insulinoma, en donde las células del páncreas humanas neonatales en las estructuras similares al insulinoma tienen diferenciadas las células beta pancreáticas que producen insulina;
  - e) micro-disecionar las estructuras similares al insulinoma obtenidas en la etapa de, disociar las células de las mismas;
  - 20 f) sub-transplantar las células obtenidas en la etapa e) dentro de la cápsula del riñón de un nuevo animal no humano con scid;
  - g) permitir a las células sub-transplantadas en la etapa f) desarrollar y regenerar las estructuras similares al insulinoma, en donde dichas estructuras similares al insulinoma desarrolladas nuevamente están enriquecidas en células beta pancreáticas que producen insulina;
  - 25 h) micro-disecionar las estructuras similares al insulinoma obtenidas en la etapa g), y disociar y recoger las células de las mismas;
  - i) opcionalmente, sub-transplantar las células obtenidas en la etapa g) dentro de la cápsula del riñón de un nuevo animal no humano con scid, permitiendo además por lo tanto el enriquecimiento y la amplificación de células beta pancreáticas que producen insulina; y,
  - 30 j) opcionalmente repetir las etapas f), g) y h) hasta obtener la cantidad apropiada de células beta pancreáticas que producen insulina.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la construcción de los vectores lentivirales permite la inmortalización reversible o condicionada.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde los vectores lentivirales comprenden al menos un sitio Lox P y se eliminan los genes T SV40 Grande y/o hTERT mediante la acción de la recombinasa Cre.
- 35 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde los vectores lentivirales comprenden al menos un sitio FRT y se eliminan los genes T SV40 Grande y/o hTERT mediante la acción de la recombinasa FLP.
- 40 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el vector lentiviral que expresa T SV40 Grande y el vector lentiviral que expresa hTERT comprenden además un sitio LoxP o FLP, siempre y cuando los sitios de recombinación específicos del sitio sean diferentes en dichos vectores.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde se realiza una etapa de selección negativa después de la acción recombinasa Cre o FLP, para seleccionar sólo las células en las que se ha eliminado la inmortalización de los genes T SV40 Grande y/o hTERT.
- 45 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dichos vectores lentivirales incluyen al menos un gen marcador de selección negativa.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el gen marcador negativo se selecciona del grupo constituido por el gen HSV-TK, el gen hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), el gen guanina-fosforribosil-transferasa (Gpt), y el gen deaminasa de citosina.

- 5
- 10
- 15
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho animal no-humano con scid es un ratón con scid.
  10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además transducir las células de la etapa e) con un vector lentiviral que expresa un gen de resistencia a antibiótico bajo el control del promotor de insulina.
  11. El método de la reivindicación 10, en donde el gen de resistencia a antibiótico es un gen de resistencia a neomicina.
  12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además recoger las células beta pancreáticas humanas obtenidas en la etapa j) para formar una población de células homogéneas y opcionalmente, cultivar in vitro dicha población para establecer una línea celular beta funcional humana.
  13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha colagenasa es la colagenasa XI.
  14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además una o más etapas de recuperación incluyendo la eliminación del T SV40 Grande, el hTERT y/o los transgenes de resistencia a antibiótico.



PÁGINA SUSTITUTA (REGLA 26)

Figura 3



PÁGINA SUSTITUTA (REGLA 26)