



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 583**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04803341 .9**  
96 Fecha de presentación : **29.11.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1694354**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Método para prevenir y tratar la diabetes con neurturina.**

30 Prioridad: **27.11.2003 EP 03027383**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.11.2009**

73 Titular/es: **DeveloGen Aktiengesellschaft**  
**Marie-Curie-Strasse 7**  
**37079 Göttingen, DE**

72 Inventor/es: **Austen, Matthias y**  
**Burk, Ulrike**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

**ES 2 329 583 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

Método para prevenir y tratar la diabetes con neurturina.

- 5 La presente invención se refiere de forma general a métodos para prevenir y/o tratar trastornos pancreáticos, particularmente los relacionados con diabetes, mediante la administración de un producto de neurturina.

**Antecedentes de la invención**

10 El páncreas es una glándula exocrina que segrega enzimas digestivas directamente en el tracto digestivo así como una glándula endocrina que segrega hormonas en el torrente sanguíneo. La función exocrina está asegurada por células acinares y centroacinares que segregan diferentes enzimas digestivas a través de ductos intercalados en el duodeno. La unidad funcional del páncreas endocrino es el islote de Langerhans. Los islotes están dispersados por la porción exocrina del páncreas y están compuestos de cuatro tipos básicos de células: células alfa, células beta, células delta y células PP (ver, por ejemplo, Kim & Hebrok, 2001, Genes Dev. 15: 111-127). Las células beta fabrican insulina, representan la mayoría de las células endocrinas y forman el núcleo de los islotes, mientras que las células alfa segregan glucagón y están situadas en la periferia. Las células delta y las células PP son menos numerosas y segregan somatostatina y polipéptidos pancreáticos, respectivamente.

20 El desarrollo pancreático temprano ha sido bien estudiado en diferentes especies, incluyendo pollo, pez cebra y ratones (para un análisis detallado véase Kim & Hebrok, 2001, *supra*). El páncreas se desarrolla a partir de diferentes primordios dorsales y ventrales. El desarrollo del páncreas requiere una especificación de los primordios pancreáticos a lo largo de los ejes anterior-posterior y dorsal-ventral. Se han identificado varios factores de transcripción que resultan críticos para el correcto desarrollo pancreático (ver Kim & Hebrok, 2001, *supra*; Wilson y col., 2003, Mech Dev. 120: 65-80).

30 En los seres humanos, las células acinares y ductales mantienen una capacidad proliferativa significativa que asegura la renovación y el crecimiento celular mientras que las células de islote se vuelven en su mayor parte mitóticamente inactivas. Lo contrario ocurre en los roedores, donde la replicación de células beta es un mecanismo importante para la generación de nuevas células beta. Se ha sugerido que durante el desarrollo embrionario los islotes pancreáticos de Langerhans proceden de células del túbulo diferenciadas o de otras células con morfología epitelial (Bonner-Weir & Sharma, 2002, J Pathol. 197: 519-526; Gu y col., 2003, Mech Dev. 120:35-43). En los adultos humanos, las nuevas células beta surgen en las proximidades de los ductos (Butler y col., 2003, Diabetes 52: 102-110; Bouwens & Pipeleers 1998, Diabetologia 41: 629-633). Sin embargo, también se ha sugerido una ubicación intra-islote o un origen en la médula ósea para las células precursoras de células beta de adulto (Zulewski y col., 2001, Diabetes 50: 521-533; Lanus y col., 2003, J Clin Invest. 111: 843-850). El desarrollo de los islotes pancreáticos es dinámico y responde a cambios en la demanda de insulina, por ejemplo durante el embarazo, o a cambios de peso corporal durante la infancia. En los adultos existe una buena correlación entre la masa corporal y la masa de los islotes (Yoon y col., 2003, J Clin Endocrinol Metab. 88: 2300-2308).

40 Las células beta pancreáticas segregan insulina como respuesta a los niveles de glucosa en sangre. La insulina, entre otras hormonas, juega un papel clave en la regulación del metabolismo energético. La insulina estimula el almacenamiento de glucógeno y de triglicéridos y la síntesis de proteínas. La entrada de glucosa en los músculos y las células adiposas es estimulada por la insulina. En pacientes que padecen diabetes mellitus tipo I o LADA (diabetes autoinmune latente del adulto (Pozzilli & Di Mario, 2001, Diabetes Care. 8:1460-67) las células beta son destruidas debido a un ataque autoinmune. La cantidad de insulina que producen las células de los islotes pancreáticos restantes es demasiado baja, lo que da lugar a niveles de glucosa en sangre altos (hiperglucemia). En la diabetes tipo II, las células hepáticas y musculares pierden su capacidad para responder a niveles de insulina en sangre normales (resistencia a la insulina). A su vez, los niveles de glucosa en sangre altos (y también los niveles de lípidos en sangre altos) dan lugar a una función insuficiente de células beta y un aumento de apoptosis de células beta. Es interesante mencionar que la velocidad de neogénesis de células beta no parece cambiar en la diabetes tipo II (Butler y col., 2003 *supra*), dando lugar así a una reducción de la masa total de células beta a lo largo del tiempo. En algunos casos resulta necesaria la administración de insulina exógena en las personas con diabetes tipo II.

55 El ajuste de parámetros metabólicos tales como nivel de azúcar en sangre y nivel de lípidos en sangre (p. ej., a través de cambios en la dieta, ejercicio, medicación o combinaciones de los mismos) antes de que la masa de células beta caiga por debajo de un umbral crítico permite una restauración relativamente rápida de la función de las células beta. Sin embargo, después de un tratamiento de este tipo, la función pancreática endocrina permanece deteriorada debido a una velocidad de regeneración aumentada sólo ligeramente.

60 En las personas con diabetes tipo I, en las que las células beta son destruidas por un ataque autoinmune, se han propuesto tratamientos que modulan el sistema inmunológico y que pueden detener o reducir considerablemente la destrucción de islotes (Raz y col., 2001, Lancet 358: 1749-1753; Chatenoud y col., 2003, Nat Rev Immunol. 3: 123-132; Homann y col., Immunity. 2002, 3:403-15). Sin embargo, debido a la regeneración relativamente lenta de las células beta humanas, estos tratamientos sólo pueden tener éxito si se combinan con agentes que estimulen la regeneración de células beta.

## ES 2 329 583 T3

La diabetes es una enfermedad muy incapacitante porque los medicamentos anti-diabetes habituales actualmente no son capaces de controlar los niveles de azúcar en sangre suficientemente bien como para evitar totalmente la incidencia de niveles de azúcar en sangre altos y bajos. Los niveles de azúcar en sangre excesivos son tóxicos y causan complicaciones a largo plazo como por ejemplo renopatía, retinopatía, neuropatía y enfermedad vascular periférica. También existen diferentes condiciones relacionadas tales como obesidad, hipertensión, enfermedad cardíaca e hiperlipidemia, que presentan básicamente un riesgo para las personas con diabetes.

Aparte de la reducción de la calidad de vida en los pacientes con diabetes, el tratamiento de esta y sus complicaciones a largo plazo presentan una tremenda carga económica para nuestros sistemas sanitarios, con tendencia a aumentar. Así, para tratar la diabetes tipo I y tipo II así como la diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) existe en la técnica una gran necesidad de identificar factores que induzcan la regeneración de las células beta pancreáticas que producen insulina. Estos factores podrían restaurar la función normal del páncreas endocrino cuando su función se encuentra deteriorada o incluso podrían evitar el desarrollo o la progresión de la diabetes tipo I, la diabetes tipo II o la LADA.

En la presente invención se revela un uso novedoso y desconocido hasta el momento en el cual el factor neurotrófico neurturina estimula la formación o regeneración de células beta productoras de insulina y, por tanto, un uso para el tratamiento y la prevención de la diabetes.

Los factores neurotróficos son factores de crecimiento que regulan la supervivencia y mantienen la diferenciación fenotípica de ciertas poblaciones de células nerviosas y/o gliales (Varon y col., 1978, *Ann. Rev. Neuroscience* 1: 327-361; Thoenen y col., *Science*, 229:238-242, 1985). El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue el primer factor neurotrófico identificado y caracterizado (Levi-Montalcini y col., 1951, *J. Exp. Zool.* 116:321). El segundo miembro de esta familia descubierto fue el factor neurotrófico derivado del cerebro (Leibrock y col., 1989, *Nature* 341:149-152).

El factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) - un factor neurotrófico no relacionado estructuralmente con el NGF - fue descubierto durante una búsqueda de factores cruciales para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, que degeneran en la enfermedad de Parkinson (Lin y col., 1993, *Science* 260:1130-2). El análisis de secuencias reveló que era un miembro distante de la superfamilia de factores de transformación del factor de crecimiento 8 (TGF-beta).

Otro factor neurotrófico que está, desde el punto de vista estructural, estrechamente relacionado con el GDNF y no está relacionado con el NGF es la neurturina (Kotzbauer y col., 1996, *Nature* 384: 467-470). La neurturina, el GDNF y otros dos factores relacionados (artemina y persefina) definen una familia de factores neurotróficos denominados neurotrofinas relacionadas con TGF-beta. Estos factores neurotróficos favorecen la supervivencia de diferentes neuronas, incluidas las neuronas periféricas autonómicas y sensoriales así como las neuronas motoras centrales y las de dopamina y han sido propuestas como agentes terapéuticos para tratar enfermedades neurodegenerativas (ver revisión de Takahashi, 2001, *Cytokine Growth Factor Rev* 12(4):361-73; ver también, por ejemplo, US 6.090.778 y EP1005358B1. Las neurotrofinas relacionadas con TGF-beta señalan a través de un complejo único de dos receptores que consiste en una molécula de superficie celular vinculada a glicosilfosfatidilinositol, el receptor alfa de la familia GDNF (GFRalfa) y el receptor Ret con actividad proteína tirosina quinasa.

Johnson y col. (US 5.739.307) revelan métodos para tratar las condiciones degenerativas utilizando neurturina, métodos para detectar alteraciones genéticas y métodos para detectar y vigilar los niveles de neurturina en pacientes. También se proporcionan métodos para identificar otros miembros de una familia de neurturina-GDNF de factores de crecimiento. No se describe el uso de neurturina para tratar la diabetes.

Aparte de las funciones descritas en el tejido neuronal, la señalización GDNF/RET es crucial para diferenciar ciertos tejidos no neuronales. Por ejemplo, GFRalfa-1 y el Ret son componentes receptores necesarios para el sobrecrecimiento del brote uretérico y la posterior ramificación en el riñón en desarrollo (Cacalano y col., 1998, *Neuron* 21:53-62; Tang y col., 1998, *J Cell Biol.* 142 (5):1337-45). Los receptores Ret, GFRalfa-1 (el receptor de GDNF) y GFRalfa-2 (el receptor de neurturina) se expresan mediante células germinales testiculares mientras que el GDNF y la neurturina se expresan mediante células de Sertoli. Tanto el GDNF como la neurturina estimulan la síntesis de DNA en espermatogonia. Además, GFRalfa y los ligandos y co-receptores de GFRalfa se expresan en tumores de células germinales y, por tanto, pueden actuar como factores paracrinos en la espermatogénesis (Viglietto y col., 2000, *Int J Oncol.* 16(4):689-94).

Sólo recientemente se ha observado que la biología de la señalización GDNF es mucho más compleja de lo que originalmente se creyó. Los ligandos de la familia del GDNF también señalan a través de la molécula de adhesión celular neural (NCAM). En células sin Ret, el GDNF se une con gran afinidad al complejo NCAM y a GFRalfa-1 (ver revisión de Sariola & Saarma, 2003, *J Cell Sci.* 116(Pt 19): 3855-62). También se ha demostrado la señalización a través del receptor de quinasa c-met (ver Popsueva y col., 2003, *J Cell Biol.* 161 (1):119-29).

Aunque se ha discutido en la técnica que la señalización GDNF/RET es crucial para la diferenciación de los tejidos neuronales y de ciertos tejidos no neuronales, no se ha revelado que un miembro de la familia de las neurotrofinas relacionadas con TGF-beta esté implicado en la regeneración del tejido pancreático. Hemos descubierto de forma sorprendente que la neurturina estimula la formación o regeneración de células beta pancreáticas que producen insulina

y juegan un papel esencial en la diabetes. Por tanto, en la presente invención revelamos el uso de la neurturina para el tratamiento y la prevención de la diabetes.

### Resumen de la invención

5 La invención se define mediante las reivindicaciones. Se describen nuevos métodos para estimulación y/o inducción de la diferenciación entre células progenitoras, p. ej., células madre excepto células madre embrionarias humanas, y células productoras de insulina, o para promover la protección, supervivencia y/o regeneración de células productoras de insulina utilizando un producto de neurturina que afecta, particularmente aumenta, el nivel de expresión o la función de un producto de tipo proteína neurturina.

10 Por tanto, se proporcionan métodos para tratar a pacientes que padecen una enfermedad causada por, asociada con y/o acompañada de, células de islotes pancreáticos deterioradas funcionalmente y/o están en un número reducido, particularmente células beta productoras de insulina, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de neurturina o un compuesto que afecta al nivel de expresión o la función de neurturina. La insuficiencia funcional o la pérdida de células de los islotes pancreáticos puede deberse, p. ej., a un ataque autoinmune como en el caso de la diabetes tipo I o LADA, y/o también a una degeneración celular como en el caso de la diabetes tipo II avanzada. Los métodos de la presente invención también pueden utilizarse para tratar a pacientes con riesgo de desarrollar una degeneración de las células beta productoras de insulina y evitar el inicio o el avance de este proceso.

15 El producto de neurturina puede administrarse, p. ej., como una composición farmacéutica, a través del implante de células que expresan el producto de neurturina y/o por terapia génica.

20 Además, se revelan preparaciones celulares que comprenden células productoras de insulina tratadas con neurturina o células que expresan neurturina.

### Breve descripción de las figuras

25 La Fig. 1 muestra la inducción, dependiente de la neurturina, de la diferenciación entre células productoras de insulina.

30 Células madre embrionarias (ES) de ratón fueron diferenciadas a células productoras de insulina según se ha descrito anteriormente (solicitud de patente PCT/EP02/04362, publicada como WO 02/086107). En las células diferenciadas, la abundancia de mRNA de insulina (Figs. 1A y 1B) y de mRNA de transportador de glucosa Glut2 al interior de células beta (Figs. 1C y 1D) se determinó utilizando PCR en tiempo real cuantitativo en dos ejemplos independientes. Los niveles se normalizaron utilizando RNA 18S como control y 36 ciclos como referencia. Los números en la línea vertical se refieren a la abundancia de los transcritos indicados con respecto a una abundancia para la cual son necesarios 36 ciclos para la detección; “wt ES” se refiere a células madre embrionarias (ES) R1 de ratón no modificadas; “Pax4 ES” se refiere a células madre embrionarias (ES) R1 de ratón transfectadas de forma estable con un constructo de expresión CMV-Pax4; “expresión de insulina en relación con delta Ct36” se refiere a expresión de insulina; “expresión de Glut2 en relación con delta Ct36” se refiere a expresión de transportador de glucosa al interior de células beta; “ES” se refiere a células madre embrionarias de ratón, según se describe en el Ejemplo 1; “control” se refiere al protocolo de diferenciación, según se describe en el Ejemplo 2, sin adición de neurturina; “EB + NTN” se refiere al protocolo de diferenciación, según se describe en el Ejemplo 3, con adición de neurturina a cuerpos embrioides.

35 La Fig. 2 muestra la estructura del constructo transgénico con *mNTN* de ratón. Se muestra el promotor rIP (0,8kb promotor de insulina II de rata) como una línea fina, el DNAC NTN (*mNTN*) de ratón como una casilla blanca, la estructura híbrida de intrón (intrón híbrido) como una casilla gris y la señal de poliadenilación (bgh-polyA) como una casilla negra.

40 La Fig. 3 muestra islotes pancreáticos de ratones transgénicos con *mNTN* con expresión *mNTN* ectópica. Análisis de expresión Taqman en DNAC de islote aislado en dos compañeros de camada de tipo silvestre y dos transgénicos utilizando un par iniciador/sonda específico de *mNTN*. Los datos se presentan como inducción de *mNTN* múltiple con respecto a la expresión de *mNTN* de tipo silvestre en islotes.

45 La Fig. 4 muestra niveles de glucosa en sangre de ratones transgénicos con NTN (rIP-*mNTN*) con alimentación aleatoria en comparación con ratones de tipo silvestre (wt) con dieta de alto contenido en grasas (HF). Se muestran los niveles de glucosa en sangre de ratones de tipo silvestre alimentados aleatoriamente (♦, N=5) y de ratones transgénicos con rIP-*mNTN* (<, N=6). Los datos se expresan como media de glucosa en sangre +/- desviación estándar. Los niveles de glucosa en sangre son significativamente inferiores en los ratones transgénicos con NTN lo que significa que una mayor expresión de NTN en los islotes pancreáticos de mamíferos reducirá el nivel de glucosa en sangre.

### Descripción detallada de la invención

60 Antes de pasar a describir la presente invención, se entenderá que todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que es otorgado habitualmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

En la presente invención el término “regeneración de células beta” se refiere a una restauración al menos parcial de la función normal de las células beta aumentando el número de células beta secretoras de insulina funcionales y/o restaurando la función normal de células beta funcionalmente deterioradas.

5 En la presente memoria, el término “producto de neurturina” incluye productos de tipo proteína neurturina tales como neurturina purificada natural o sintética y variantes de las mismas. Las variantes incluyen variantes de inserción, sustitución y delección y derivados químicamente modificados. Las variantes también incluyen proteínas recombinantes como por ejemplo, aunque no de forma limitativa, híbridos de neurturina y otras proteínas TGF-beta (preferiblemente de la familia del GDNF). También se incluyen proteínas o péptidos básicamente homólogos a la proteína precursora de neurturina humana que tienen la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso de GenBank NP\_004549. El término “producto de neurturina” también incluye polinucleótidos (p. ej., mRNA/DNA) que codifican el producto de la proteína neurturina anteriormente descrito. El término “producto de neurturina” también incluye homodímeros o heterodímeros de neurturina de un producto de la proteína neurturina y otra proteína, en donde la otra proteína preferiblemente pertenece a la familia del GDNF.

15 El término “biológicamente activo” en la presente memoria significa que el producto de neurturina induce y/o estimula la diferenciación de insulina produciendo células a partir del progenitor, p. ej., células madre, y/o favorece la protección, supervivencia o regeneración de células productoras de insulina, p. ej., células beta. La actividad biológica de los productos de tipo neurturina puede ser determinada según se describe en los ejemplos de la presente solicitud.

20 El término “básicamente homólogo” en la presente memoria significa que tiene un grado de homología con el producto de neurturina humana biológicamente activo que resulta de la escisión del precursor de neurturina que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 o con el propio precursor de neurturina humana, que presenta un exceso de 70%, preferiblemente un exceso de 80% y aún más preferiblemente un exceso de 90% ó 95%. El grado de homología entre la proteína de ratón y la humana es de aproximadamente 91% y se contempla que las proteínas neurturina de mamífero preferidas tengan, de forma análoga, un alto grado de homología. También se incluyen las proteínas que son híbridas entre la neurturina y otra proteína TGFbeta, preferiblemente otro miembro de la familia del GDNF que conserve el efecto estimulador sobre la formación de células del islote de la neurturina. El porcentaje de homología o identidad entre un producto de neurturina y la proteína neurturina humana o un precursor o un ácido nucleico que codifica la misma puede determinarse mediante procedimientos estándar, p. ej., mediante algoritmo BLAST. Preferiblemente, el porcentaje de homología o identidad se calcula como el porcentaje de restos nucleótido o aminoácido que se encuentran en la secuencia menor de las dos que se alinean con restos nucleótido o aminoácido idénticos en la secuencia que se está comparando cuando se pueden introducir cuatro huecos en una longitud de 100 nucleótidos o aminoácidos para facilitar este alineamiento. También se incluye como básicamente homólogo cualquier producto de la proteína neurturina que pueda ser aislado mediante reactividad cruzada con anticuerpos frente al producto de la proteína neurturina o cuyos genes puedan ser aislados mediante hibridación con el gen o con segmentos del gen que codifica el producto de tipo proteína neurturina.

40 En la presente invención, el término “células progenitoras” se refiere a células no diferenciadas capaces de ser diferenciadas y células productoras de insulina. El término incluye particularmente células madre, es decir, células embrionarias no diferenciadas o inmaduras, adultas o somáticas que pueden producir diferentes tipos celulares especiales. El término “células madre” puede incluir células madre embrionarias (ES), excepto células madre embrionarias humanas, y células germinales primordiales (EG) de mamíferos, p. ej., de origen humano o animal. El aislamiento y el cultivo de estas células es bien conocido por el experto en la técnica (ver, por ejemplo, Thomson y col., 1998, Science 282:1145-1147; Shambloott y col., 1998, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 95:13726-13731; US 6.090.622; US 5.914.268; WO 0027995; Notarianni y col., 1990, J. Reprod. Fert. 41:51-56; Vassilieva y col., 2000, Exp. Cell. Res. 258:361-373). Se han identificado células madre adultas o somáticas en múltiples tejidos tales como intestino, músculo, médula ósea, hígado y cerebro. En WO 03/023018 se describe un método novedoso para aislar, cultivar y diferenciar células madre intestinales para uso terapéutico. En el páncreas, varias indicaciones sugieren que las células madre también están presentes en el tejido adulto (Gu & Sarvetnick, 1993, Development 118:33-46; Bouwens, 1998, Microsc Res Tech 43:332-336; Bonner-Weir, 2000, J. Mol. Endocr. 24:297-302).

55 Las células madre embrionarias pueden ser aisladas en la masa celular interna de embriones antes del implante (células ES) o en las células germinales primordiales halladas en las crestas genitales de embriones después del implante (células EG). Cuando se cultivan en condiciones especiales tales como en cultivo celular con agitación centrífuga o difusión en fase vapor, tanto las células ES como las EG se agregan para formar cuerpos embrioides (EB). Los EB están compuestos por diferentes tipos de células que son similares a las presentes durante la embriogénesis. Cuando se cultivan en medios apropiados, los EB pueden utilizarse para generar fenotipos diferenciados *in vitro*, tales como endodermo extraembrionario, células hematopoyéticas, neuronas, cardiomiocitos, células músculo-esqueléticas y células vasculares. Hemos descrito anteriormente un método que permite diferenciar los EB de forma eficiente y células productoras de insulina (según se describe en la solicitud de patente PCT/EP02/04362, publicada como WO 02/086107 por Blyszczuk y col., 2003, Proc Nati Acad Sci USA. 100(3):998-1003).

65 El término “medio de cultivo” significa un medio adecuado capaz de soportar el crecimiento y la diferenciación entre células madre. El término “medio de diferenciación” significa un medio adecuado para inducir la diferenciación entre células madre y células productoras de insulina. El término “medio de diferenciación terminal” significa un medio adecuado para la diferenciación terminal de células productoras de insulina. Ejemplos de medios preferidos se describen en WO/023018.

## ES 2 329 583 T3

En esta invención, revelamos un uso novedoso y hasta ahora desconocido del factor neurotrófico neurturina para estimulación y/o inducción de la formación o regeneración de células productoras de insulina y, por tanto, un uso para el tratamiento y la prevención de enfermedades que cursan con (es decir, están causadas por, asociadas con o acompañadas de) una función deteriorada de las células beta como, por ejemplo, pero sin carácter limitante, la diabetes mellitus. Más especialmente, las enfermedades son diabetes tipo I, diabetes tipo II y LADA.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la neurturina estimula la diferenciación entre células productoras de insulina a partir de células madre *in vitro*. Por tanto, puede administrarse una cantidad terapéuticamente efectiva de producto de neurturina para favorecer la regeneración de células beta pancreáticas o para favorecer la formación de células productoras de insulina a partir de células madre o células progenitoras *in vitro* o *in vivo*. La presente invención también se refiere a aplicaciones en el campo de la medicina. Además, la presente invención se refiere a aplicaciones para la identificación y caracterización de compuestos con efectos médicos terapéuticos o toxicológicos derivados directamente del método de la invención.

De acuerdo con esta invención, el producto de neurturina puede ser administrado:

- i) como una composición farmacéutica v.g. por vía enteral, parenteral o tópica, preferiblemente directamente al páncreas,
  - ii) por implantación de células que expresan el producto proteínico de producto neurturina neurturina y/o
  - iii) por terapia génica
- según se describe más detalladamente a continuación.

Además, el nivel de expresión de neurturina en un paciente puede verse deteriorado por un principio farmacéuticamente activo administrado

- i) como una composición farmacéutica v.g. por vía enteral, parenteral o tópica, preferiblemente directamente al páncreas,
  - ii) a través de tratamiento celular y/o
  - iii) por terapia génica
- según se describe más detalladamente a continuación.

El producto de neurturina o el principio farmacéuticamente activo del mismo puede ser administrado de la manera anteriormente descrita sólo o en combinación con otra composición farmacéutica útil para tratar la degeneración de las células beta como, por ejemplo, hormonas, factores de crecimiento o agentes moduladores de inmunidad.

Un producto de neurturina o el principio farmacéuticamente activo puede ser administrado a pacientes que sufren una enfermedad que acompaña a una función deteriorada de las células beta, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, diabetes tipo I, LADA o diabetes tipo II avanzada. También se contempla que un producto de neurturina o el principio farmacéuticamente activo pueda ser administrado de forma preventiva a pacientes con riesgo de desarrollar una degeneración de las células beta como, por ejemplo, pero sin carácter limitante, pacientes que padecen diabetes tipo II o LADA en fases iniciales. A continuación se describen en más detalle diferentes formulaciones farmacéuticas y diferentes técnicas de administración.

Además, se proporcionan métodos para diferenciar células progenitoras y células productoras de insulina *in vitro* que comprenden:

- (a) activar uno o más genes pancreáticos en un progenitor, p. ej., célula madre (etapa opcional, particularmente si se utilizan células madre embrionarias)
- (b) agregar dichas células para formar cuerpos embrioides (etapa opcional, particularmente si se utilizan células madre embrionarias)
- (c) cultivar cuerpos embrioides o cultivar células madre adultas (p. ej., células del túbulo) en un medio de diferenciación específico que contiene el producto de la proteína neurturina en condiciones en las cuales la diferenciación de las células beta se encuentra significativamente mejorada y
- (d) identificar y seleccionar células productoras de insulina.

La activación de genes pancreáticos puede comprender la transfección de una célula con un gen pancreático unido de forma operativa a una secuencia de control de expresión, p. ej., en un vector de transfección adecuado, según se describe en WO 03/023018. Ejemplos de genes pancreáticos preferidos son Pdx1, Pax4, Pax6, neurogenina 3 (ngn3),

## ES 2 329 583 T3

Nkx 6.1, Nkx 6.2, Nkx 2.2, HB 9, BETA2/Neuro D, Isl 1, HNF1-alfa, HNF1-beta y HNF3 de origen humano o animal. Cada gen puede ser utilizado por separado o en combinación con al menos otro gen. Pax4 es particularmente preferido.

5 Los productos de tipo proteína neurturina, es decir, los productos de tipo proteína o ácido nucleico de neurturina, se obtienen preferiblemente mediante técnicas recombinantes ya que estos métodos son capaces de conseguir grandes cantidades de proteína de gran pureza pero no se limitan a productos expresados en sistemas celulares de bacterias, plantas, mamíferos o insectos.

### 10 *Productos de tipo proteína neurturina*

Las formas recombinantes de producto de la proteína neurturina incluyen formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína. En general, las técnicas recombinantes implican aislar los genes que codifican el producto de tipo proteína neurturina, clonar el gen en vectores y/o tipos celulares adecuados, modificar el gen en caso necesario para codificar una variante deseada y expresar el gen para obtener el producto de tipo proteína neurturina.

De forma alternativa, puede sintetizarse químicamente una secuencia de nucleótidos que codifique el producto de neurturina deseado. Se contempla la expresión de un producto de neurturina utilizando secuencias de nucleótidos que varíen en cuanto al uso de codones debido a la degeneración del código genético o variaciones o alteraciones alélicas realizadas para facilitar la obtención del producto de tipo proteína por parte de la célula seleccionada.

Kotzbauer y col., Nature 1996, 384:467-470, describen la identificación de un DNAC y una secuencia de aminoácidos de ratón y un DNAC y una secuencia de aminoácidos humanos para la proteína neurturina. Los productos de tipo neurturina de acuerdo con la presente invención pueden ser aislados o generados de diferentes maneras. Métodos ilustrativos para obtener productos de tipo neurturina útiles se describen en la solicitud de patente WO 97/08196. También se describen numerosos vectores, células huésped y condiciones de cultivo para la expresión de proteína neurturina así como métodos para sintetizar variantes del producto de tipo proteína neurturina. Otros vectores adecuados para expresar el producto de la proteína neurturina en *E. coli* se describen en la patente EP 0 423 980.

30 El peso molecular de la neurturina purificada indica que en su forma biológicamente activa la proteína es un dímero unido a disulfuro. El material aislado tras la expresión en un sistema bacteriano es prácticamente biológicamente inactivo y existe como monómero. Es necesario un repliegamiento para obtener el dímero unido a disulfuro biológicamente activo. Los procesos adecuados para el repliegamiento y la maduración de la neurturina expresada en sistemas bacterianos son básicamente similares a los descritos en WO 93/06116. Los ensayos estándar *in vitro* para determinar la actividad de la neurturina son también básicamente similares a los utilizados para determinar la actividad del GDNF según se describe en WO 93/06116 y en la solicitud de patente US 08/535.681 (WO 97/11964).

Las variantes de producto de neurturina se preparan introduciendo cambios de nucleótido apropiados en el DNA que codifica el polipéptido o mediante síntesis química *in vitro* del polipéptido deseado. El experto en la técnica apreciará que pueden realizarse numerosas combinaciones de deleciones, inserciones y sustituciones que dan lugar a una variante de producto de proteína con actividad biológica de neurturina.

Las técnicas de mutagénesis para la sustitución, inserción o deleción de uno o más restos de aminoácido seleccionados son bien conocidas para el experto en la técnica (p. ej., patente US 4.518.584).

En las variantes de sustitución de neurturina se ha eliminado al menos un resto aminoácido de la secuencia de aminoácidos de neurturina humana o de ratón y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Estas variantes de sustitución incluyen variantes alélicas que se caracterizan por cambios en la secuencia de nucleótidos naturales en la población de esta especie que pueden o no dar lugar a un cambio de aminoácido.

50 Los derivados químicamente modificados de productos de tipo proteína neurturina también pueden ser preparados por el experto en la técnica de acuerdo con las descripciones de la presente memoria. Los restos químicos más adecuados para la derivatización incluyen los polímeros solubles en agua. Un polímero soluble en agua resulta deseable porque la proteína a la que está unido no precipita en medio acuoso como, p. ej., un medio fisiológico. Preferiblemente, el polímero será farmacéuticamente aceptable para preparar un producto o una composición de tipo terapéutico. El experto en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado a la vista de consideraciones tales como si el conjugado de polímero/proteína será utilizado para fines terapéuticos y, en este caso, la dosis deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. Un polímero soluble en agua particularmente preferido para su uso en la presente invención es el polietilenglicol. Debe evitarse la adhesión a restos importantes para la unión al receptor si se desea dicha unión al receptor. Se puede desear de forma específica una proteína con N-terminal químicamente modificado.

El uso de derivados que son neurturina expresada en procariotas, o variantes de los mismos, unidos a al menos una molécula de polietilenglicol así como el uso de neurturina, o variantes de la misma, unida a una o más moléculas de polietilenglicol a través de un resto acilo o alquilo. La pegilación puede realizarse mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo: Focus on Growth Factors, 3 (2):4-10, 1992; EP 0 154 316, EP 0 401 384; y las demás publicaciones citadas en la presente memoria relativas a la pegilación.

## ES 2 329 583 T3

El uso de derivados que son neurturina expresada en procariotas, o variantes de los mismos, unidos a al menos un resto hidrófobo, por ejemplo moléculas de ácidos grasos, así como el uso de neurturina, o variantes de la misma, unida a uno o más restos hidrófobos. Por ejemplo, en la solicitud de patente publicada como WO 03/010185 se describe un método para producir polipéptidos acilados en células huésped transformadas expresando una molécula precursora del polipéptido deseado que después son acilados en una etapa posterior *in vitro*.

### *Polinucleótidos que codifican el producto de tipo proteína neurturina*

Se proporcionan polinucleótidos que codifican productos de tipo proteína neurturina producidos de forma recombinante o naturales.

Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto de la proteína neurturina puede ser fácilmente obtenida mediante diferentes formas que incluyen, sin limitación, síntesis química, selección de librerías de cDNA o genómicas, selección de librerías de expresión y/o amplificación por PCR de cDNA. Estos métodos así como otros métodos útiles para aislar estas secuencias de ácidos nucleicos han sido descritos, por ejemplo, por Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), por Ausubel y col., eds (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press, 1994), y por Berger y Kimmel (Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987). La síntesis química de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto de la proteína neurturina puede también ser realizada con métodos bien conocidos en la técnica, como los descritos por Engels y col. (Angew. Chem. Int. Ed., 28:716-734, 3 0 1989).

Se describen polinucleótidos de producto de neurturina con la secuencia señal nativa y otras secuencias pre-pro así como polinucleótidos en donde la secuencia señal nativa es eliminada y sustituida por una secuencia señal heteróloga. La secuencia señal heteróloga seleccionada debería ser tal que fuera reconocida y procesada, es decir, escindida por una peptidasa señal, por la célula huésped. En el caso de células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal nativa de neurturina, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasas o enterotoxina II termoestable. En cuanto a la secreción de levadura, la secuencia señal de neurturina nativa puede ser sustituida por líderes de invertasa de levadura, factor alfa o fosfatasa ácida. En la expresión celular de mamífero la secuencia señal nativa es satisfactoria, aunque también pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamífero.

Los vectores de expresión y donación incluyen por lo general una secuencia de ácidos nucleicos que permite al vector replicar en una o más células huésped seleccionadas.

### *Composiciones farmacéuticas de producto de neurturina*

Las composiciones farmacéuticas de producto de neurturina incluyen de forma típica una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto de neurturina mezclado con una o más formulaciones farmacéutica y fisiológicamente aceptables. Además de los principios activos, las composiciones farmacéuticas de producto de neurturina pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que puedan ser utilizadas farmacéuticamente. Más detalles sobre las técnicas de formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de Pharmaceutical Sciences of Remington (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Una vez formulada la composición terapéutica, esta puede ser almacenada en viales estériles como solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones pueden ser almacenadas en una forma lista para su uso o en una forma, p. ej., liofilizada, que requiera su reconstitución antes de ser administrada. Las formulaciones farmacéuticas óptimas serán determinadas por el experto en la técnica en función de consideraciones tales como la ruta de administración y la dosis deseada. Estas formulaciones pueden afectar al estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de aclaramiento *in vivo* de las presentes proteínas de tipo neurturina y sus variantes y derivados. También se contemplan otras formas de administración efectivas tales como formulaciones de liberación lenta, nebulizaciones para inhalación o formulaciones oralmente activas.

Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida, el producto de neurturina puede ser unido o incorporado a preparaciones en forma de partículas de compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc.) o liposomas.

### *Administración/Suministro del producto de neurturina*

El producto de neurturina puede ser administrado mediante cualquier medio adecuado, preferiblemente por vía enteral o parenteral o de forma tópica directamente en el páncreas, como es conocido por el experto en la técnica. La dosis específica puede ser calculada de acuerdo con consideraciones relativas a peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano. El experto en la técnica realizará de forma rutinaria otros ajustes en los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento con cada una de las formulaciones antes mencionadas y esto se

encuentra dentro del ámbito de las tareas que se realizan de forma rutinaria. Las dosis apropiadas pueden ser calculadas mediante los ensayos establecidos para determinar las dosis utilizadas junto con los datos apropiados de respuesta a la dosis. La pauta posológica final de un método para tratar las condiciones anteriormente descritas será determinada por el médico en funciones teniendo en cuenta los diferentes factores que modifican la acción de los fármacos, p. ej., edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, gravedad de cualquier infección, duración de la administración así como otros factores médicos. A medida que se vayan completando los estudios irá apareciendo nueva información relativa a los niveles de dosificación apropiados para tratar las diferentes enfermedades y condiciones.

Se contempla que la administración continuada o sostenida de un producto de neurturina puede ser ventajosa para un determinado tratamiento. Aunque la administración continuada puede ser realizada a través de un medio mecánico tal como una bomba de infusión, también se contempla el uso de otros modos de administración continuada o casi continuada. Por ejemplo, la derivatización o encapsulación química puede producir formas de liberación sostenida de la proteína que tienen el efecto de una presencia continua, en cantidades predecibles, con una pauta posológica determinada. Por tanto, los productos de tipo proteína neurturina incluyen proteínas derivatizadas o formuladas de otra manera para realizar esta administración continuada.

También se contempla la terapia celular con el producto de neurturina, es decir, el implante pancreático de células productoras del producto de tipo proteína neurturina. Esta realización implicaría implantar células capaces de sintetizar y segregar una forma biológicamente activa de producto de la proteína neurturina en el paciente. Estas células productoras de producto de la proteína neurturina pueden ser células que son productoras naturales de producto de la proteína neurturina o pueden ser células modificadas para expresar la proteína. Estas células modificadas incluyen células recombinantes cuya capacidad para producir un producto de la proteína neurturina ha sido aumentada por transformación con un gen que codifica el producto de la proteína neurturina deseado en un vector adecuado para favorecer su expresión y secreción. Para minimizar una posible reacción inmunológica en aquellos pacientes a los que se les administra producto de la proteína neurturina de una especie extraña, se prefiere que las células productoras de producto de la proteína neurturina sean de origen humano y produzcan producto de la proteína neurturina humana. De forma análoga, se prefiere que las células recombinantes que producen producto de la proteína neurturina sean transformadas con un vector de expresión que contenga un gen que codifique un producto de la proteína neurturina humano. Las células implantadas pueden ser encapsuladas para evitar la infiltración de tejido circundante. Las células animales humanas o no humanas pueden ser implantadas en pacientes en cerramientos o membranas poliméricas biocompatibles semipermeables que permitan la liberación del producto de la proteína neurturina pero que impidan la destrucción de células por parte del sistema inmunológico del paciente o de otros factores nocivos del tejido circundante.

De forma alternativa, las células que segregan el producto de la proteína neurturina pueden ser introducidas en un paciente que se encuentra en necesidad de ello de forma intraportal con una técnica percutánea transhepática y anestesia local. Preferiblemente se administran 3000 - 100 000 equivalentes de células productoras de insulina diferenciadas por kilo de peso corporal. Estas técnicas quirúrgicas son bien conocidas en la técnica y pueden ser aplicadas sin problemas, ver Pyzdrowski y col., 1992, *New England J. Medicine* 327:220-226; Hering y col., *Transplantation Proc.* 26:570-571, 1993; Shapiro y col., *New England J. Medicine* 343: 230-238, 2000.

En otra realización preferida, el producto de la proteína neurturina puede ser administrado directamente al progenitor, p. ej., células madre, para estimular la diferenciación entre células productoras de insulina. Por ejemplo, la administración de proteína puede realizarse con liposomas policatiónicos (Sells y col. (1995) *Biotechniques* 19:72-76), Tat-mediated protein transduction (Fawell y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:664-668) y fusionando una proteína con el motivo permeable a la célula derivado del dominio PreS2 del virus de la hepatitis B (Oess y Hildt (2000) *Gene Ther.* 7:750-758). La preparación, producción y purificación de estas proteínas a partir de bacterias, levadura o células eucariotas son bien conocidos para el experto en la técnica. En esta realización de la invención, la neurturina puede añadirse preferiblemente a concentraciones de entre 1 ng/ml y 500 ng/ml, más preferiblemente de entre 10 y 100 ng/ml, p. ej., a aproximadamente 50 ng/ml.

También se describe una preparación celular que comprende células progenitoras diferenciadas, p. ej., células madre que presentan una producción de insulina, particularmente una línea celular productora de insulina, que puede conseguirse por el método descrito anteriormente. Las células productoras de insulina pueden presentar una expresión estable o transitoria de al menos un gen pancreático implicado en la diferenciación de las células beta. Las células son preferiblemente células humanas derivadas de células madre humanas. Para aplicaciones terapéuticas se prefiere particularmente la producción de células humanas autólogas a partir de células madre adultas del paciente. Sin embargo, las células productoras de insulina también pueden obtenerse de células no autólogas. En caso necesario, pueden evitarse las reacciones inmunes no deseadas mediante encapsulación, inmunosupresión y/o modulación o con propiedades no inmunogénicas de las células.

Las células productoras de insulina de la invención preferiblemente presentan características muy similares a las de las células beta naturales. Además, las células de la invención preferiblemente son capaces de presentar una respuesta rápida a la glucosa. Tras añadir 27,7 mM glucosa, la producción de insulina mejora en un factor de al menos 2, preferiblemente en un factor de al menos 3. Además, las células de la invención son capaces de normalizar los niveles de glucosa en sangre después de su trasplante en ratones.

## ES 2 329 583 T3

Las células pancreáticas funcionales pueden obtenerse mediante cualquiera de estos métodos. Las células son preferiblemente de mamífero, p. ej., de origen humano. Preferiblemente, dichas células son células beta pancreáticas, p. ej., células beta o células madre pancreáticas maduras, excepto células madre embrionarias humanas, diferenciadas en células beta pancreáticas. Estas células beta pancreáticas preferiblemente segregan insulina como respuesta a la glucosa. Además, la presente invención proporciona células pancreáticas funcionales que expresan glucagón como respuesta a la glucosa. Una preparación que comprende las células de la invención puede también contener células con propiedades de otros tipos celulares endocrinos tales como células alfa, células delta y/o células PP. Estas células son preferiblemente células humanas.

La preparación celular de la invención es preferiblemente una composición farmacéutica que comprende las células junto con vehículos farmacológicamente aceptables, diluyentes y/o adyuvantes. La composición farmacéutica se utiliza preferiblemente para el tratamiento o la prevención de enfermedades pancreáticas, p. ej., la diabetes.

Las células productoras de insulina funcional tratadas con neurturina pueden ser trasplantadas preferiblemente de forma intrahepática, directamente en el páncreas de un individuo humano necesitada o por otros métodos. De forma alternativa, estas células pueden ser introducidas en cápsulas implantables que pueden ser introducidas en el organismo de un individuo humano, en cualquier lugar, más preferiblemente cerca del páncreas, la vejiga o el hígado o bajo la piel. Los métodos para introducir células en las personas son bien conocidos para el experto en la técnica e incluyen, aunque no de forma limitativa, administración mediante inyección, por vía intravenosa o por vía parenteral. Puede realizarse una administración única, múltiple, continuada o intermitente. Las células pueden ser introducidas en diferentes sitios que incluyen, entre otros, el páncreas, la cavidad abdominal, el riñón, el hígado, la arteria celíaca, la vena porta o el bazo. Las células también pueden ser depositadas en el páncreas del paciente.

La metodología para la encapsulación en membrana de células vivas es familiar para el experto en la técnica y la preparación de las células encapsuladas y su implante en pacientes pueden ser realizados sin problemas. Ver, p. ej., las patentes US 4.892.538, US 5.011.472 y US 5.106.627. Un sistema para encapsular células vivas se describe en PCT WO 91/10425 de Aebischer y col. Ver Asimismo, PCT WO 91/10470 de Aebischer y col., Winn y col., Exper. Neurol., 113:322-329, 1991, Aebischer y col., Exper. Neurol., 111:269-275, 1991; Tresco y col., ASAIO, 38:17-23, 1992. Las técnicas para formular otros muchos medios de administración sostenida o controlada, tales como vehículos de liposoma, partículas o perlas biodegradables e inyecciones “depot”, también son conocidas para el experto en la técnica.

En otra realización se contempla la terapia génica *ex vivo*, es decir, las propias células del paciente pueden ser transformadas *ex vivo* para obtener un producto de la proteína neurturina o una expresión de neurturina que estimule la proteína que sería directamente reimplantado. Por ejemplo, células del paciente pueden ser cultivadas y transformadas con un vector apropiado. Tras una fase de propagación/expansión opcional, las células pueden ser trasplantadas de nuevo al cuerpo del mismo paciente, particularmente al páncreas, donde producirían y liberarían el producto de la proteína neurturina deseado. La administración por transfección y mediante inyecciones de liposoma puede conseguirse con métodos bien conocidos en la técnica. Cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente descritos puede ser aplicado a cualquier paciente adecuado, incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, con máxima preferencia, seres humanos.

También se contempla la terapia génica con producto de neurturina *in vivo* introduciendo el gen que codifica un producto de la proteína neurturina en células pancreáticas diana a través de inyección local de un constructo de ácido nucleico o por otros métodos de administración apropiados (Hefti, J. Neurobiol., 25:1418-1435, 1994). Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto de la proteína neurturina puede estar contenida en un vector derivado de virus adenoasociado o en un vector derivado de adenovirus para su envío a las células pancreáticas. Los vectores virales alternativos incluyen, aunque no de forma limitativa, vectores derivados de retrovirus, virus de herpes simple y virus del papiloma. También puede realizarse una transferencia física, *in vivo* o *ex vivo* según proceda, mediante transferencia mediada por liposoma, inyección directa (DNA desnudo), transferencia mediada por receptor (complejo ligando-DNA), electroporación, precipitación de fosfato cálcico o bombardeo con micropartículas (pistola de genes).

Los medicamentos inmunosupresores, como la ciclosporina, también pueden ser administrados al paciente para reducir la reacción de tipo “injerto contra huésped”. Los aloinjertos con las células obtenidas por los métodos de la presente invención también son útiles porque un único donante sano podría proporcionar suficientes células como para regenerar al menos parcialmente la función pancreática en múltiples receptores.

El ácido nucleico y la proteína tipo neurturina pueden ser administrados en monoterapia o en un tratamiento combinado con otros agentes farmacéuticos. Por ejemplo, estos pueden ser administrados junto con otros agentes farmacéuticos adecuados para el tratamiento o la prevención de enfermedades pancreáticas y/u obesidad y/o síndrome metabólico, particularmente con otros agentes farmacéuticos adecuados para estimulación y/o inducción de la diferenciación entre células productoras de insulina y células progenitoras. Además, estos pueden ser administrados junto con agentes farmacéuticos con actividad inmunosupresora, p. ej., anticuerpos, polipéptidos y/o sustancias de bajo peso molecular peptídicas o no peptídicas. En la tabla 1 se presentan ejemplos preferidos de agentes inmunosupresores.

# ES 2 329 583 T3

TABLA 1

*Agentes inmunosupresores ilustrativos*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nombres	Mecanismo
Derivados del 2-amino-1,3-propanodiol	Utilizado para prevenir o tratar el rechazo crónico en pacientes que reciben un órgano o alotrasplante o xenotrasplante de tejido
Clorhidrato de 2-amino-2[2-(4-octilfenil)etil] propano-1,3-diol	Inmunosupresión, de recirculación de linfocitos acelerada
40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, SDZ-RAD, everolimus	Derivado de sirolimús (rapamicina) utilizado para el rechazo agudo de riñón; reduce el rechazo y la vasculopatía de injerto después de un trasplante de corazón inhibiendo la proliferación celular
6-(3-dimetil-aminopropionil) forscolina	Actividad inmunosupresora útil también para tratar enfermedades autoinmunes
6-mercaptopurina (6-MP)	Utilizada para tratar la enfermedad de Crohn, la enfermedad inflamatoria intestinal y para el tratamiento de trasplantes de órganos
A-420983	Inhibidor de Lck

ES 2 329 583 T3

<p>5 10 15</p> <p>ABX-CBL (CBL-1)</p>	<p>AB monoclonal de ratón dirigido contra células T, células B, células NK y monocitos humanos, para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped resistente a esteroides, posible uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes</p>
<p>20</p> <p>Alefacept (proteína de fusión LFA-3 IgG1 humana)</p>	<p>Rompe linfocitos T de memoria causales; utilizado para tratar soriasis, una enfermedad inflamatoria mediada por células T</p>
<p>25 30 35</p> <p>Inhibidor ICAM-1 antisentido (ISIS 2302), enlimomab, BIRR1, alicaforseno</p>	<p>AB monoclonal de ratón que bloquea la adhesión de células blancas a la molécula de superficie de célula T (ICAM-1 r); tratamiento de rechazo de trasplante de riñón</p>
<p>40 45 50</p> <p>Inmunoglobulina antitimocito (ATGAM)</p>	<p>Timocito anti-humano, inmunoglobulina; utilizado para revertir el rechazo agudo de trasplante de riñón y probablemente se utilizará de forma no prevista para el tratamiento de inducción de trasplante</p>
<p>55 60</p> <p>Azatioprina</p>	<p>Tratamiento de la artritis reumatoide y prevención del rechazo de trasplante de riñón y otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias tales como la enfermedad inflamatoria intestinal</p>

65

ES 2 329 583 T3

Baohuoside-1	Flavonoide; inhibe la activación de linfocitos ; Ma y col., Transplantation 78: 831-838, (2004)
Basiliximab	AB monoclonal que se une a sitios receptores en células T, evita la activación por el tejido trasplantado (trasplante renal)
BMS-279700	Inhibidor de Lck
BTI-322	AB monoclonal derivado de ratón dirigida al receptor CD2; utilizado para prevenir el primer rechazo de riñón y tratar el rechazo resistente
Cladribina	Antimetabolito y agente inmunosupresor que es relativamente selectivo para linfocitos; utilizado para tratar tumores linfoides malignos, p. ej., leucemia linfocítica
CP-690550	Inhibidor de JAK-3
Ciclofosfamida (CTX)	Inmunosupresor para el tratamiento de la artritis y de otras enfermedades autoinmunes y cánceres
Ciclosporina (ciclosporina A, ciclosporina)	Péptido cíclico compuesto por 11 aminoácidos; bloquea la célula T auxiliar, inmunosupresor utilizado en el tratamiento de trasplantes de órganos y otras enfermedades inmunes

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 329 583 T3

5	Daclizumab, HAT (Anti-Tac humanizado), anti-Tac SMART, anti-CD25 y receptor anti-IL2 humanizado	AB monoclonal que inhibe la unión de IL-2 al receptor IL-2 mediante la unión al receptor IL-2; suprime la actividad de las células T frente a aloinjertos (trasplante renal)
10		
15	Dexametasona (decadron, dexona, dexasona)	Inmunosupresor adrenocorticoide, eficaz para diferentes trastornos
	DIAPEP-277	Propiedades inmunomoduladoras
20	Dipéptido ácido borónico (DPBA)	Inhibidor de proteasoma ; Wu y col., Transplantation 78:360-366, (2004)
25	Ácido docosahexanoico (DHA)	Inmunosupresor que reduce el porcentaje de células T que expresan CD4 o CD8, bloquea el proceso de reconocimiento de antígeno; Taku y col., Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 1047, (2000)
30		
35		
40	Efalizumab	Modulador de células T dirigido a células T a través de la interacción con moléculas de adhesión en la superficie celular endotelial, dirigido a la migración de células T a la piel y a la activación de células T; utilizado para tratar la soriasis
45		
50		
55	Efomicina M	Inhibidor de la adhesión de leucocitos, antiinflamatorio
60	FTY720 (derivado de la miriocina oral)	Altera la infiltración de linfocitos en los tejidos injertados; utilizado para prevenir el rechazo de órganos en los trasplantes de riñón
65	Acetato de glatiramer	Copolímero de péptidos

ES 2 329 583 T3

<p>(copolímero-1)</p>	<p>sintéticos; imita la estructura de la mielina de forma que las células inmunes se unen a la copaxona en lugar de a la mielina; para tratar la esclerosis múltiple</p>
<p>Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)</p>	<p>Posee actividad inmunosupresora en modelos de animales diabéticos; Winer y col., Nature Medicine 9: 198, (2003)</p>
<p>Gusperimús (15-desoxispergualina)</p>	<p>Inmunosupresor intravenoso; suprime la producción de células T citotóxicas, neutrófilos y macrófagos</p>
<p>Péptido HLA-B2702</p>	<p>Péptido humano, bloquea la acción de toxicidades mediadas por células NK y células T, utilizado en la prevención del primer rechazo de aloinjerto de riñón</p>
<p>hul124 (anti-CD11a)</p>	<p>Anticuerpo monoclonal humanizado; dirigido al receptor CD11a en la superficie de células T para inhibir de forma selectiva el rechazo por parte del sistema inmunológico de órganos trasplantados</p>
<p>hOKT31p (Ala-Ala)</p>	<p>Anticuerpo anti-CD3 humanizado que no se une a Fc</p>
<p>Infliximab</p>	<p>AB monoclonal, se une y desactiva el TNF-alfa humano; utilizado para tratar la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide</p>
<p>Interferón</p>	<p>Propiedades inmunomoduladoras</p>
<p>ISAtx247</p>	<p>Utilizado para tratar enfermedades autoinmunes tales</p>

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 329 583 T3

	como artritis reumatoide y soriasis
Isotretinoína	Inmunosupresor, reduce la capacidad de proliferación de las células T como respuesta a la provocación inmune. Vergelli y col., Immunopharmacology, 31:191, (1997)
L-683,742: también descrito como 31-desmetoxi-31-hidroxi-L-683,590	Tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y/o prevención de rechazos de trasplante de órganos
Leflunomida (ARAVA)	Agente antiinflamatorio
Medi-500 (T10B9)	AB monoclonal intravenoso dirigido contra células T humanas; trata el rechazo agudo de riñón y la enfermedad de injerto contra huésped
Medi-507	AB humanizado intravenoso dirigido contra células T CD2; utilizado para tratar enfermedades de injerto contra huésped resistentes a corticosteroides y prevenir el rechazo de riñón
Metotrexato	Antimetabolito utilizado para tratar la enfermedad de Crohn, la soriasis grave y la artritis reumatoide del adulto (y como medicamento anti-cáncer)
Mitoxantrona	Efecto antiproliferativo sobre el sistema inmunológico celular incluidas células T, células B y macrófagos; utilizado para tratar cáncer de próstata refractario a

ES 2 329 583 T3

5		hormonas, leucemia mieloide aguda y esclerosis múltiple
10	Micofenolato de mofetilo	Proliferación de linfocitos T y B mediante bloqueo de la síntesis de nucleótidos de purina; utilizado en el tratamiento del trasplante de órganos y la enfermedad inflamatoria intestinal
15		
20	OKT4A	AB monoclonal de ratón dirigido contra células T CD4 humanas; utilizado para prevenir el rechazo de trasplante de riñón cuando se utiliza junto con otros medicamentos inmunosupresores
25		
30	Muromonab-CD3	AB monoclonal que se une a sitios receptores en células T evitando la activación por parte del tejido trasplantado
35		
40	Prednisolona	Corticosteroide, suprime la inflamación asociada al rechazo de trasplante
45		
	Psora-4	Bloqueador de Kv1.3
	Rifampicina	Antibiótico; tiene propiedades inmunomoduladoras
	Rituximab	Anticuerpo CD20
50	S1006	Posee actividad inmunosupresora en modelos de animales diabéticos
55		
60	Sirolimús, rapamicina	Inmunosupresor y potente inhibidor de la proliferación de células T dependientes de la citoquina (p. ej. IL-2) (trasplante de riñón)

65

El tratamiento combinado puede comprender la administración conjunta de los medicamentos durante el período de tratamiento y/o la administración separada de medicamentos individuales durante diferentes períodos del tratamiento.

La administración de un producto de la proteína neurturina en una composición farmacéutica a un sujeto necesitado del mismo, particularmente a un paciente humano, produce una regeneración al menos parcial de células pancreáticas. Preferiblemente, estas células son células beta productoras de insulina que contribuirán a mejorar la afección diabética. Con la administración de esta composición p. ej., a corto plazo o de forma regular, puede conseguirse un aumento de la masa de células beta. Este efecto sobre el organismo invierte la diabetes de forma parcial o total. Cuando la homeostasis de la glucosa en sangre del paciente mejora, puede reducirse la concentración de la dosis administrada. Al menos en algunos casos se puede suspender la administración ya que el paciente sigue produciendo una cantidad normal de insulina sin necesidad de tratamiento. Por tanto, el paciente no solamente es tratado sino que podría llegarse a curar totalmente de la condición diabética. Sin embargo, incluso una mejoría moderada de la masa de células beta podría reducir la necesidad de insulina exógena, mejorar el control glucémico y como consecuencia reducir las complicaciones diabéticas. En otro ejemplo, las composiciones de la presente invención también serán eficaces para tratar a pacientes con otras enfermedades pancreáticas tales como cáncer de páncreas, displasia o pancreatitis cuando resulta necesario regenerar células beta.

En otra realización, la presente invención permite producir células para la identificación y/o caracterización de compuestos que estimulan la diferenciación de las células beta, la secreción de insulina y/o la respuesta a la glucosa, más particularmente de compuestos que aumentan el nivel de expresión o la función de la neurturina. Este método es particularmente adecuado para ensayos *in vivo* para aplicaciones diagnósticas y para el desarrollo o selección de medicamentos. El compuesto de interés se agrega a células adecuadas y se determina la expresión o la función de la neurturina. De forma alternativa, se agrega un compuesto de interés a una célula tratada con neurturina y se determina el efecto sobre la diferenciación de la célula y/o la producción de insulina. Preferiblemente, se utilizan células productoras de insulina diferenciadas. Pueden determinarse los niveles de insulina en las células tratadas, p. ej., mediante cuantificación con análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo directo (RIA). Con este método es posible seleccionar un gran número de compuestos, pudiéndose identificar fácilmente compuestos que inducen la expresión de neurturina o soportan la actividad de la neurturina produciendo una diferenciación de las células beta y/o un aumento en la secreción de insulina.

En un método de selección de rendimiento elevado, las células son transfectadas con un constructo de DNA, p. ej., un vector viral o no viral que contiene un gen informador, p. ej., el gen lacZ o el gen GFP, bajo control de la regulación de un promotor de un gen implicado en la diferenciación de las células beta, preferiblemente Pax4. Las células transfectadas se dividen en alícuotas y cada alícuota se pone en contacto con una sustancia problema, p. ej., el candidato 1, el candidato 2 y el candidato 3. La actividad del gen informador se corresponde con la capacidad del compuesto problema para inducir la diferenciación de las células beta.

En otra realización (que puede combinarse con la selección de rendimiento elevado descrita anteriormente) se realiza una validación del rendimiento medio. En ella, el compuesto problema se agrega a células que son cultivadas y se determina la expresión de neurturina y/o la producción de insulina. Después de un ensayo de alto rendimiento inicial, como el ensayo celular descrito anteriormente donde se utiliza, p. ej., un promotor de Pax4 como marcador para la regeneración de células beta, se analiza la actividad de las moléculas candidatas para inducir la diferenciación de las células beta en un ensayo de validación que comprende añadir dichos compuestos a los medios de cultivo de los cuerpos embrioides. A continuación se valora la diferenciación en células productoras de insulina, p. ej., mediante comparación con las células de tipo silvestre y/o las que expresan Pax4 para valorar la eficacia de un compuesto.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos, que se incluyen a título ilustrativo, permitirán una mejor comprensión de la presente invención y de sus múltiples ventajas.

### Ejemplo 1

#### *Generación de células ES que expresan el gen Pax4*

Células ES de ratón R1 (Nagy y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 8424-8428) fueron electroporadas con el gen Pax4 bajo el control del promotor CMV y con el gen resistente a la neomicina bajo el control del promotor fosfoglicerato quinasa I (pGK-1).

Se cultivaron células ES en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía 4,5 g/l de glucosa,  $10^{-4}$  M beta-mercaptoetanol, 2 nM glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1 nM piruvato sódico, 15% de FCS y 500 U/ml de factor inhibitorio de leucemia (LIF). Concretamente, aproximadamente  $10^7$  células ES resuspendidas en 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se sometieron a electroporación con 25 g/ml de vector de expresión linealizado (Joyner, Gene Targeting: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, 1993). Cinco minutos después de la electroporación, las células ES se colocaron en placas de Petri que contenían células alimentadoras

## ES 2 329 583 T3

fibroblásticas previamente desactivadas mediante tratamiento con 100 µg/ml de mitomicina C. Un día después de la electroporación se cambió el medio de cultivo por un medio que contenía 450 µg/ml de G418. Los clones resistentes fueron aislados por separado y cultivados durante 14 días después de aplicar el medio de selección. Las células se cultivaron siempre a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células ES no tratadas y no diferenciadas fueron utilizadas como control en el experimento que se muestra en la Fig. 1 (mencionadas como “ES” en la Fig. 1).

### Ejemplo 2

10 *Diferenciación entre células ES y células productoras de insulina (mencionadas como “control” en la Fig. 1)*

La línea celular ES R1 (tipo silvestre, “wt ES” en la Fig. 1) y las células ES que expresan de forma constitutiva Pax4 (“Pax4 ES” en la Fig. 1) se cultivaron como cuerpos embrioides (EB) por el método de difusión en fase vapor, según se describe en la solicitud de patente PCT/EP02/04362, publicada como WO 02/086107 por Blyszczuk y col., 2003, Proc Nati Acad Sci USA. 100: 998-1003, con los medios descritos más adelante y en la Tabla 2. Se dejaron formar los cuerpos embrioides en cultivos de difusión en fase vapor durante 2 días y después se transfirieron durante tres días a cultivos de suspensión en placas de Petri. El día 5 se colocaron los EB por separado en placas de cultivo celular de 6 cm recubiertas con gelatina que contenían un medio de diferenciación preparado con una base de medio de Dulbecco modificado por Iscove. Tras la disociación y la colocación de nuevo en placas el día 14, las células se cultivaron hasta 40 días en el medio de diferenciación preparado con una base de medio de Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12).

### Ejemplo 3

25 *Expresión de genes específicos del páncreas tras la diferenciación entre células ES y células productoras de insulina*

Los niveles de expresión de genes específicos del páncreas se midieron mediante análisis PCR en tiempo real semicuantitativo. Las células ES diferenciadas de tipo silvestre y las células ES Pax4 se recogieron tras la formación de cuerpos embrioides y se suspendieron en tampón de lisis (4 M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato sódico, pH 7; 0,5% de sarcosilo, 0,1 M beta-mercaptoetanol). El RNA total se aisló mediante el método de extracción en una única etapa descrito por Chomczynski & Sacchi, 1987, Anal. Biochem. 162: 156-159). El mRNA se transcribió de forma inversa utilizando un iniciador Oligo PolyT d(T)<sub>16</sub> (PerkinElmer) y el DNAc resultante se amplificó utilizando iniciadores de oligonucleótidos complementarios e idénticos a transcritos del transportador de glucosa Glut2 al interior de células beta e insulina. Se utilizó el gen doméstico beta-tubulina como patrón interno. La transcripción inversa (RT) se realizó con transcriptasa inversa MuLV (Perkin Elmer). Se realizó PCR multiplex con polimerasa DNA AmpliTaq (Perkin Elmer) según se describe en Wobus y col., 1997, *supra*. Se analizaron los niveles de mRNA de genes que codifican Glut2 e insulina utilizando el microkit Dynalbeads mRNA DIRECT (Dynal) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Un tercio de cada reacción PCR se separó mediante electroforesis. Se analizaron señales de fluorescencia de bromuro de etidio de geles con un software especial (TINA2.08e). Se determinó la intensidad de las señales de fluorescencia del bromuro de etidio a partir del área bajo la curva para cada pico y se representaron los datos de genes diana como el porcentaje de cambio en relación con la expresión del gen doméstico beta-tubulina.

Los resultados muestran que los marcadores para la función de diferenciación de las células beta se expresaron a mayores niveles en las células ES diferenciadas de Pax4<sup>+</sup> que en las células ES diferenciadas de tipo silvestre demostrando así que la activación de un gen de control de desarrollo pancreático hace que la diferenciación sea más eficiente que en las células ES de tipo silvestre (Fig. 1). La expresión de Glut2 en células madre diferenciadas indica que las células productoras de hormonas son capaces de responder a la glucosa. La expresión de cantidades importantes de insulina en células madre diferenciadas indica que las células diferenciadas muestran un fenotipo similar al de las células beta.

### 55 Ejemplo 4

*Inducción de la diferenciación entre células productoras de insulina por parte de la neurturina (mencionada como EB + NTN en la Fig. 1)*

60 Para estudiar el efecto de la neurturina en la inducción de la diferenciación de las células beta *in vitro* generamos células madre embrionarias (ES) de ratón estables que expresan Pax4 bajo el control del promotor temprano/región amplificadora de citomegalovirus (CMV) según se describe en el Ejemplo 1. Pax4 y las células ES de tipo silvestre fueron después cultivadas en difusión en fase vapor o cultivo celular con agitación centrífuga para permitir la formación de cuerpos embrioides. Se formaron cuerpos embrioides en presencia de 50 ng/ml de solución de neurturina en PBS-01% de BSA. Los cuerpos embrioides fueron posteriormente colocados en placas, se volvió a añadir neurturina cada dos días hasta el día 12 y a continuación se disociaron enzimáticamente los cuerpos y se volvieron a colocar en placas. Tras la disociación, las células se cultivaron en un medio de diferenciación que contenía diferentes factores de crecimiento (ver Tabla 2 para más detalles). La neurturina se adquirió a RDI Research Diagnostics INC, EE.UU.,

## ES 2 329 583 T3

ref. RDI-4511. En estas condiciones, la expresión de insulina fue inducida significativamente por la neurturina en dos ejemplos independientes (Figs. 1A y 1B). Además, la adición de neurturina al medio de diferenciación mejoró significativamente la expresión del transportador de glucosa Glut-2 en dos ejemplos independientes (Figs. 1C y 1D). Por el contrario, las células ES de tipo silvestre no contenían ninguna célula productora de insulina en la misma etapa y solamente pequeñas cantidades de células que expresaban Glut-2. Estos datos demuestran que la neurturina puede favorecer y mejorar significativamente la diferenciación entre células ES y células productoras de insulina con respecto a las células ES de tipo silvestre.

Los resultados que se muestran en la Fig. 1 demuestran claramente una inducción significativa de la diferenciación entre células productoras de insulina (Figs. 1A y 1B) y de células con respuesta a la glucosa (Figs. 1C y 1D) cuando se agrega neurturina a cuerpos embrioides. Por tanto, la neurturina tiene un fuerte efecto de inducción sobre la diferenciación de las células beta productoras de insulina.

TABLA 2

*Protocolo para inducir la diferenciación entre células productoras de insulina mediante neurturina*

Los medios B1, B2 y el suplemento B27 (niacinamida NA) se describen en Rolletschek y col., 2001, Mech. Dev. 105:93-104.			
<b>Día</b>	<b>Etapas de cultivo</b>	<b>Medio</b>	<b>Recubrimiento y análisis</b>
0	Difusión en fase vapor (200 células/gota)	Iscove + 15% de FCS, adición de neurturina (NTN) 50 ng/ml	RNA (células ES)
1			

ES 2 329 583 T3

5	2	EB en suspensión	Iscove + 15% de FCS + <b>NTN, 50 ng/ml</b>	
	3			
10	4	Cultivo en placas de EB	Iscove + 10% de FCS + <b>NTN, 50 ng/ml</b>	RNA con recubrimiento de gelatina (EB)
15	+1	cambio de medio	Medio B1 + <b>NTN, 50 ng/ml</b>	
	+2			
20	+3	cambio de medio		
	+4			
	+5	cambio de medio		
25	+6			
	+7	cambio de medio		
30	+8	disociación	B2+B27+NA+10% de FCS	RNA (placa 1 x 6 cm)
	+9	cambio de medio	ver más arriba, retirar FCS	
35	+10			
	+11	cambio de medio		
40	+12			
	+13	cambio de medio		
	+14			
45	+15	cambio de medio		
	+16			
	+17	cambio de medio		
50	+18			
	+19	cambio de medio		
	+20			
55	+21	cambio de medio		
	+22			
60	+23	cambio de medio		
	+24			
65				

5	+25	cambio de medio	Inmunofluorescencia (IF); RNA
	+26		
	+27	cambio de medio	
10	+28		IF; RNA
	+29	cambio de medio	
	+30		
15	+31	cambio de medio	
	+32		IF; RNA

## 20 Ejemplo 5

### *Identificación funcional de las células productoras de insulina diferenciadas*

25 Una propiedad importante de las células beta es la secreción de insulina como respuesta a la glucosa. Para comprobar si las células productoras de insulina derivadas de Pax4 poseen esta propiedad de respuesta a la glucosa se realizó un ensayo *in vitro* de respuesta a la glucosa en las células diferenciadas. El día del ensayo se retiró el medio de diferenciación de la placa de 12 ó 6 pocillos y las células se lavaron 3 veces con tampón Krebs Ringer-Hepes Bicarbonato (KRBH; 125 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM Hepes, 0,1% de BSA) suplementado con 2,8 mM glucosa. Para la pre-incubación, las células se incubaron en KRBH + 2,8 mM glucosa durante 2 horas a 37°C. A continuación las células fueron incubadas en 750 µl hasta 1 ml de KRBH + 2,8 mM glucosa durante 1 hora a 37°C. El sobrenadante se guardó para medir la secreción de insulina basal. Para la liberación estimulada de insulina se añadieron 750 µl hasta 1 ml de KRBH que contenía 16,7 mM glucosa a las células. Tras una incubación de 1 hora a 37°C, se recuperó el KRBH para medir la secreción de insulina inducida por glucosa y las células se extrajeron con ácido-etanol (ver también Irminger, J.-C. y col., 2003, *Endocrinology* 144: 1368-1379). Los niveles de insulina se determinaron con un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la insulina de ratón (Mercodia), que se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Un medio alternativo para una liberación adecuada de insulina estaba basado en DMEM con una concentración de glucosa de 1 g/l (Gibco) suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco, solución madre 1:100) y los factores adicionales mencionados anteriormente. Este medio puede ser aplicado de 1 a 6 días antes de utilizar las células.

40 Se espera una secreción de insulina basal cuando tanto las células productoras de insulina de tipo silvestre como las inducidas por neurturina se cultivan en concentraciones de glucosa bajas (2,8 mM). Sin embargo, las células productoras de insulina inducida por neurturina responden en gran medida a la estimulación por glucosa. En presencia de concentraciones de glucosa elevadas (16,7 mM) se espera un aumento de la secreción de insulina en las células productoras de insulina derivadas de neurturina ES.

## Ejemplo 6

### *Trasplante de células productoras de insulina derivadas de Pax4 ES en ratones con diabetes inducida por STZ*

55 El potencial terapéutico de las células productoras de insulina inducidas por neurturina para mejorar y curar la diabetes puede ser investigado trasplantando las células en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). La estreptozotocina es un antibiótico que es citotóxico para las células beta cuando se administra a ciertas dosis (ver Rodrigues y col.: *Streptozotocin-induced diabetes*, en McNeill (ed) *Experimental Models of Diabetes*, CRC Press LLC, 1999). Su efecto es rápido, haciendo que el animal se vuelva gravemente diabético en el plazo de 48 horas.

60 Ratones macho BalbC no en ayunas fueron tratados con STZ para que desarrollaran hiperglucemia tras el tratamiento con STZ. Los ratones se consideraban como diabéticos si presentaban un nivel de glucosa en sangre superior a 10 mmol/l durante más de 3 días consecutivos. Las células fueron trasplantadas bajo la cápsula renal y en el bazo de los animales. La presencia de las células productoras de insulina fue confirmada mediante análisis inmunohistológico del tejido trasplantado. Los resultados se espera que demuestren que las células trasplantadas pueden normalizar la glucosa en sangre en los animales diabéticos.

65

## ES 2 329 583 T3

### Ejemplo 7

#### *Generación de un constructo transgénica con mNTN*

5 Se clonó un Open Reading Frame (ORF) de *mNTN* completo bajo el control del promotor de la insulina tipo II de la rata (Lomedico y col., (1979) Cell 18: 545-558) utilizando el sistema Gateway (Invitrogen). Para la estructura del constructo transgénico, véase también la Fig. 2.

### 10 Ejemplo 8

#### *Generación de ratones transgénicos con rIP-mNTN*

15 Se inyectó DNA de constructo transgénico (ver ejemplo 7) en embriones C57/BL6 x CBA (Harlan Winkelmann, Borchen, Alemania) utilizando técnicas estándar (ver, por ejemplo, Brinster y col. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442). El transgen mNTN (ver Ejemplo 7) se expresó bajo el control del promotor del gen de insulina II de rata (Lomedico y col., *supra*) utilizando técnicas conocidas para el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Gunnig y col. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,4831-4835). Con esta técnica se generaron varias líneas fundadoras independientes.

### 20 Ejemplo 9

#### *Análisis de genotipo de ratones transgénicos con rIP-mNTN*

25 El genotipado se realizó mediante PCR utilizando DNA genómico aislado de la punta de la cola. Para detectar el transgen mNTN se utilizó un iniciador en sentido anterior específico de transgen (5' tgc tat ctg tct gga tgt gcc 3') y un iniciador en sentido reverso específico de transgen *mNTN* (5' aag gac acc tgc tcc tca tag 3').

### 30 Ejemplo 10

#### *Análisis de expresión de mNTN a través de análisis TaqMan*

35 La expresión del transgen mNTN en islotes se monitorizó mediante análisis TaqMan. Para este análisis se utilizaron 25 ng de cDNA derivado de RNA de islote pancreático aislado en ratones transgénicos y sus compañeros de camada y un par iniciador/sonda específico de mNTN para detectar la expresión de *mNTN* endógeno y transgénico (iniciador en sentido anterior *mNTN*-1: 5' GCC TAT GAG GAC GAG GTG TCC 3', iniciador en sentido reverso *mNTN*: 5' AGC TCT TGC AGC GTG TGG T 3', sonda *mNTN*: 5' TCC TGG ACG TGC ACA GCC GC 3'). El análisis TagNan se realizó utilizando técnicas estándar conocidas para el experto en la técnica. La expresión transgénica ectópica se detectó en 3 de las 4 líneas fundadoras transgénicas con *rIP-mNTN* analizadas. Las dos líneas fundadoras que presentaban los máximos niveles de expresión de transgen fueron utilizadas para el análisis posterior. Para el nivel de expresión de mNTN en islotes de un animal transgénico en comparación con los un animal de tipo silvestre, véase también la Fig. 3.

### 45 Ejemplo 11

#### *Procedimientos analíticos realizados en ratones transgénicos con mNTN*

50 Entre 3 y 6 ratones fueron introducidos en cada jaula, a los cuales se les administró alimento *ad libitum*. Se determinaron los parámetros de sangre metabólica utilizando sangre venosa aislada de la vena de la cola o a través de hemorragia retroorbital. Se determinaron los valores de glucosa en sangre utilizando medidores One Touch de glucosa en sangre (LifeScan, Alemania). Los ratones transgénicos con mNTN con alimentación aleatoria presentan menores niveles de glucosa en sangre (*rIP-mNTN*) que los ratones de tipo silvestre (wt), ver también la Fig. 4.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un producto de neurturina para estimular y/o inducir la diferenciación entre células productoras de insulina y células progenitoras, particularmente células madre excepto células madre embrionarias humanas, v.g. células madre somáticas, *in vitro*, en donde el producto de neurturina es

10 (i) una proteína o péptido, seleccionada(o) de proteínas o péptidos que tienen una homología de al menos 70% con la proteína precursora de neurturina humana que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 y/o con el producto de la proteína neurturina madura que resulta de la escisión del precursor de la proteína neurturina publicado como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 ó

(ii) un ácido nucleico, v.g. RNA y/o DNA, que codifica un producto de la proteína neurturina como se define en (i).

15 2. El uso de la reivindicación 1, en donde las células progenitoras son células madre de origen mamífero, preferiblemente de origen humano.

20 3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde las células progenitoras se han transfectado con un gen pancreático, particularmente el gen Pax4.

4. Uso de un producto de neurturina para promover la protección, supervivencia y/o regeneración de células productoras de insulina, particularmente células productoras de insulina de origen mamífero, preferiblemente de origen humano, tales como células beta *in vitro*, en donde el producto de neurturina es

25 (i) una proteína o péptido, seleccionada(o) de proteínas o péptidos que tienen una homología de al menos 70% con la proteína precursora de neurturina humana que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 y/o con el producto de la proteína neurturina madura que resulta de la escisión del precursor de la proteína neurturina publicado como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 ó

30 (ii) un ácido nucleico, v.g. RNA y/o DNA, que codifica un producto de la proteína neurturina como se define en (i).

35 5. El uso de la reivindicación 4, en donde las células productoras de insulina se han transfectado con un gen pancreático, particularmente el gen Pax4.

6. El uso de un producto de neurturina para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad que acompaña a una función deteriorada de las células beta, particularmente degeneración de las células beta en pacientes que sufren diabetes tipo I, LADA, o diabetes tipo II avanzada, en donde el producto de neurturina es

40 (i) una proteína o péptido, seleccionada(o) de proteínas o péptidos que tienen una homología de al menos 70% con la proteína precursora de neurturina humana que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 y/o con el producto de la proteína neurturina madura que resulta de la escisión del precursor de la proteína neurturina publicado como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 ó

45 (ii) un ácido nucleico, v.g. RNA y/o DNA, que codifica un producto de la proteína neurturina como se define en (i).

50 7. El uso de la reivindicación 6, para estimular y/o inducir la diferenciación entre células productoras de insulina y células progenitoras, particularmente células madre, v.g. células madre somáticas.

8. El uso de la reivindicación 6, para promover la protección, supervivencia y/o regeneración de células productoras de insulina, particularmente células productoras de insulina de origen mamífero, preferiblemente de origen humano, tales como células beta.

55 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6- 8, en donde dicho producto de neurturina es para administración a un paciente

(i) como una composición farmacéutica v.g. por vía enteral, parenteral o tópica directamente al páncreas,

60 (ii) por implantación de células que expresan el producto proteínico de producto neurturina neurturina, y/o

(iii) por terapia génica,

65 opcionalmente en combinación con otra composición farmacéutica útil para tratar la degeneración de las células beta, por ejemplo pero sin carácter limitante hormonas, factores de crecimiento, o agentes moduladores de inmunidad.

## ES 2 329 583 T3

10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el producto de neurturina es de origen mamífero, preferiblemente origen humano.

5 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la diferenciación de las células progenitoras, v.g. células madre en células productoras de insulina *in vitro* comprende

(a) activar opcionalmente uno o más genes pancreáticos en las células progenitoras,

10 (b) agregar opcionalmente dichas células para formar cuerpos embrioides,

(c) cultivar dichas células o cuerpos embrioides en un medio de diferenciación específica que contiene el producto proteínico de neurturina y

15 (d) identificar y seleccionar opcionalmente células productoras de insulina, con la salvedad de que se excluye el uso de embriones humanos.

12. El uso de la reivindicación 11, en donde las células productoras de insulina tratadas con neurturina son

20 (i) capaces de respuesta a la glucosa y/o

(ii) capaces de expresar glucagón,

en particular en donde las células productoras de insulina tratadas con neurturina son capaces de normalizar los niveles de glucosa en sangre después de ser trasplantadas en ratones.

25 13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde se producen una cantidad eficaz de células tratadas con neurturina *in vitro* para trasplante a un paciente que se encuentra en necesidad de ello.

30 14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una estimulación de la expresión de neurturina,

en donde se producen las células de un paciente que se encuentra en necesidad de ello que se han modificado para producir y secretar un producto proteínico de neurturina *in vitro*, para reimplantación en el paciente y/o

35 en donde se modifican células de un paciente que se encuentra en necesidad de ello para producir y secretar un producto proteínico de neurturina *in vivo*.

40 15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 14 en combinación con al menos otro agente farmacéutico, en donde el al menos otro agente farmacéutico es particularmente adecuado para el tratamiento o la prevención de enfermedades pancreáticas y/u obesidad y/o síndrome metabólico o para estimulación y/o inducción de la diferenciación entre células productoras de insulina y células progenitoras o en combinación con al menos otro agente farmacéutico que tiene una actividad inmunosupresora.

45 16. Un método para diferenciación o regeneración de células en células pancreáticas funcionales, comprendiendo el método: (a) cultivar células, excepto células madre embrionarias humanas, capaces de diferenciarse o regenerarse en células pancreáticas en presencia de una cantidad eficaz de neurturina *in vitro*; (b) dejar que las células se desarrollen, para diferenciar y/o regenerar al menos una función pancreática; y (c) opcionalmente, preparar una cantidad eficaz de las células pancreáticas diferenciadas o regeneradas para trasplante a un paciente que se encuentra en necesidad de ello, en donde el paciente que se encuentra en necesidad es particularmente un individuo humano.

50 17. El método de la reivindicación 16, en donde el paciente que se encuentra en necesidad tiene (a) funcionalidad deteriorada, (b) números reducidos y/o (c) funcionalidad deteriorada y números reducidos de células pancreáticas.

55 18. El método de la reivindicación 16 ó 17, en donde dicho paciente que se encuentra en necesidad es un paciente diabético tipo I o paciente diabético tipo II o paciente de LADA.

60 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en donde las células pancreáticas son células productoras de insulina, particularmente células beta de los islotes pancreáticos.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19, en donde las células del paso (a) son de origen mamífero, preferiblemente origen humano.

65 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, en donde la al menos una función pancreática se selecciona de producción de insulina en respuesta a la glucosa y expresión de glucagón.

## ES 2 329 583 T3

22. Un método para diferenciación o regeneración de células, excepto células madre embrionarias humanas, en células pancreáticas funcionales, comprendiendo el método los pasos de:

(i) preparar una cantidad eficaz de un producto de neurturina, en donde el producto de neurturina es

(a) una proteína o péptido, seleccionada(o) de proteínas o péptidos que tienen una homología de al menos 70% con la proteína precursora de neurturina humana que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 y/o con el producto de la proteína neurturina madura que resulta de la escisión del precursor de la proteína neurturina publicado como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 ó

(b) un ácido nucleico, v.g. RNA y/o DNA, que codifica un producto de la proteína neurturina como se define en (i) Y

(ii) poner en contacto el producto de neurturina con células capaces de diferenciarse en células beta pancreáticas en presencia de neurturina *in vitro*.

23. Una preparación de células que comprende un producto proteínico de neurturina que expresa células pancreáticas, en donde el producto proteínico de neurturina es

(i) una proteína o péptido, seleccionada(o) de proteínas o péptidos que tienen una homología de al menos 70% con la proteína precursora de neurturina humana que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso de GenBank NP\_004549 y/o con el producto de la proteína neurturina madura que resulta de la escisión del precursor de la proteína neurturina publicado como Número de Acceso de GenBank NP\_004549.

24. La preparación de células de la reivindicación 23, en donde las células se han modificado para producir y secretar un producto proteínico de neurturina y se preparan para trasplante en una localización adecuada en un paciente.

25. La preparación de la reivindicación 23-24, que es una composición farmacéutica, particularmente una composición diagnóstica o terapéutica.

26. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 23-25 en el tratamiento o la prevención de enfermedades pancreáticas, particularmente diabetes, y/o para administración por trasplante o para uso en un dispositivo médico.

27. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 23-26 para la fabricación de un agente para la regeneración de tejidos o células pancreáticas, particularmente células beta pancreáticas.

28. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 23-27 para la aplicación *in vivo* o *in vitro*.

29. Un método para identificar y/o caracterizar compuestos capaces de modular la diferenciación o regeneración de células en células funcionales pancreáticas, particularmente células productoras de insulina, que comprende:

poner en contacto un compuesto a testar con células, excepto células madre embrionarias humanas, en condiciones en las cuales las células son capaces de diferenciarse o regenerarse en células pancreáticas funcionales en presencia de neurturina, y determinar el efecto del compuesto sobre el proceso de diferenciación.

30. El método de la reivindicación 29 que comprende transfectar las células con un constructo de DNA que contiene un gen informador bajo control de la regulación de un gen implicado en la diferenciación de las células beta, poner en contacto dichas células transfectadas con un compuesto a testar y determinar la actividad del gen informador, o que comprende poner en contacto cuerpos embrioides que se cultivan en un medio de diferenciación que mejora la diferenciación de las células beta con un compuesto a testar y determinar la diferenciación en células productoras de insulina.

31. Un método para identificar y/o caracterizar compuestos capaces de modular la diferenciación o regeneración de células en células pancreáticas funcionales, particularmente células productoras de insulina, que comprende:

poner en contacto un compuesto a testar con células, excepto células madre embrionarias humanas, en condiciones en las cuales las células son capaces de diferenciarse o regenerarse de células pancreáticas funcionales y/o determinar el efecto del compuesto sobre la expresión de neurturina.

32. Uso de una preparación de células que expresan neurturina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la diabetes.

33. El uso de la reivindicación 32 para inducir la regeneración de células pancreáticas, en donde las células pancreáticas son particularmente células beta de los islotes.

## ES 2 329 583 T3

34. Uso de la reivindicación 33, en donde las células se han modificado para producir y secretar un producto proteínico de neurturina y se preparan para trasplante en una localización adecuada en un paciente.

5 35. Uso de una preparación de células tratadas con neurturina, excepto células madre embrionarias humanas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la diabetes, en donde las células son particularmente células progenitoras diferenciadas capaces de producir insulina.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

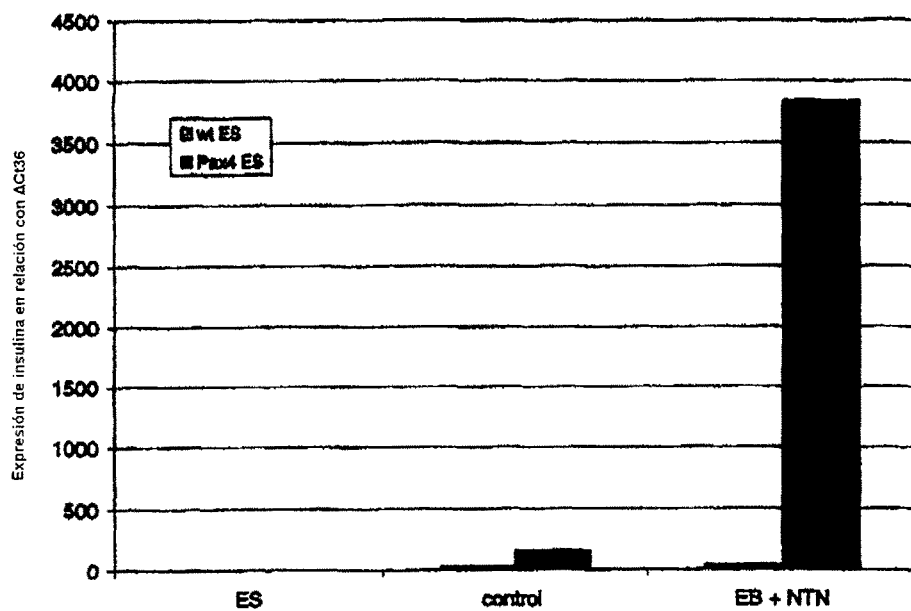


Fig. 1A

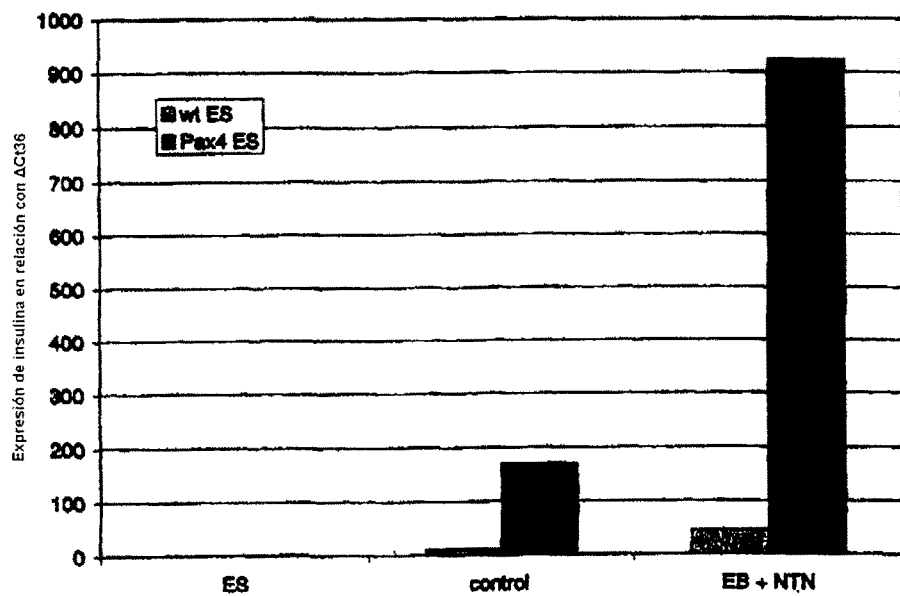


Fig. 1B

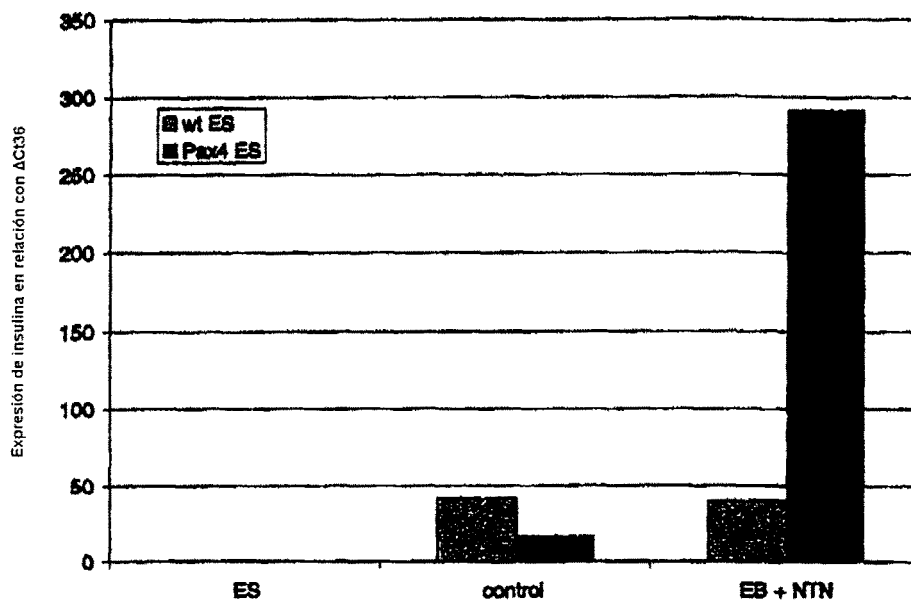


Fig. 1C

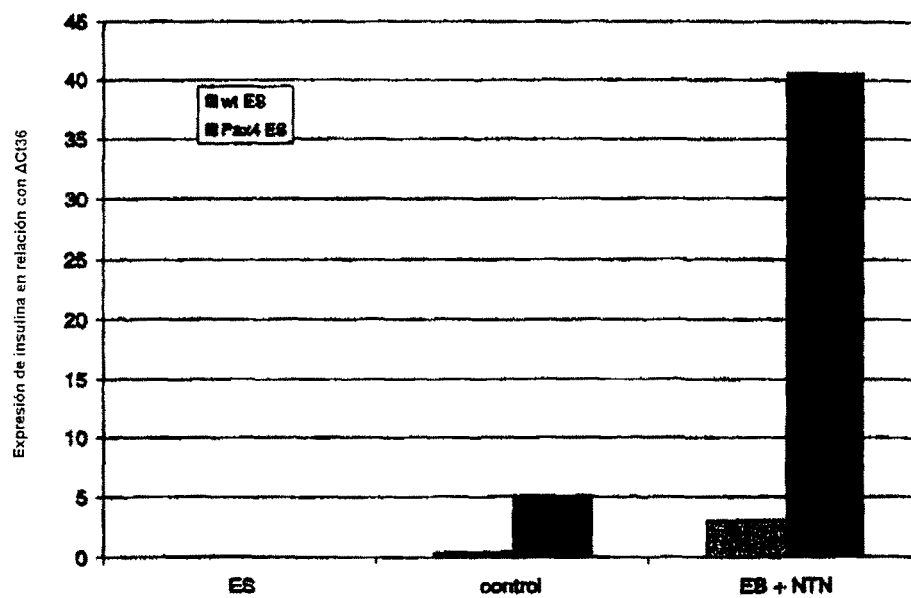
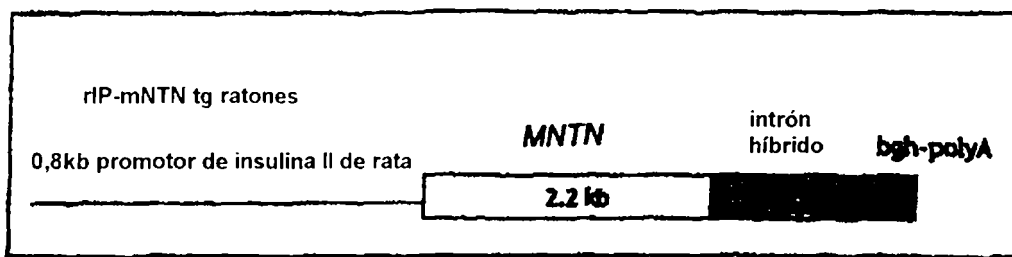
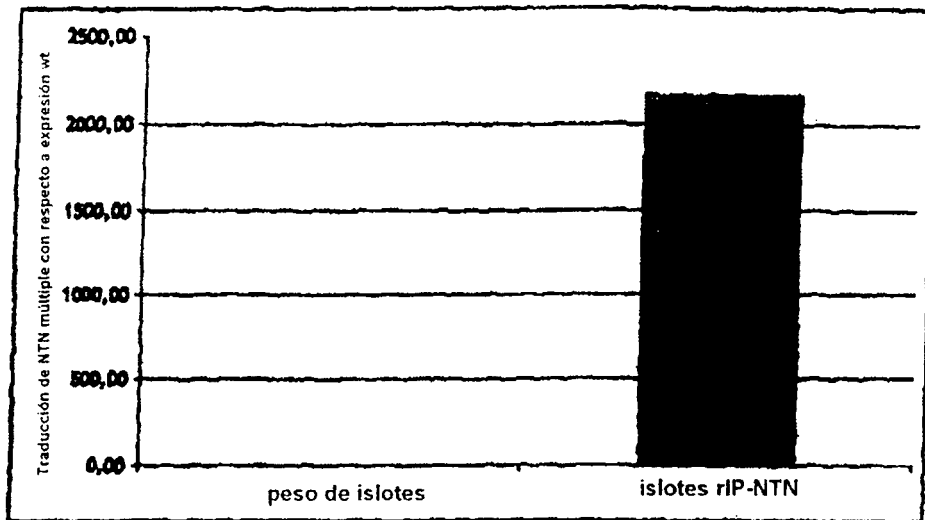


Fig. 1D



**Fig. 2**



**Fig. 3**

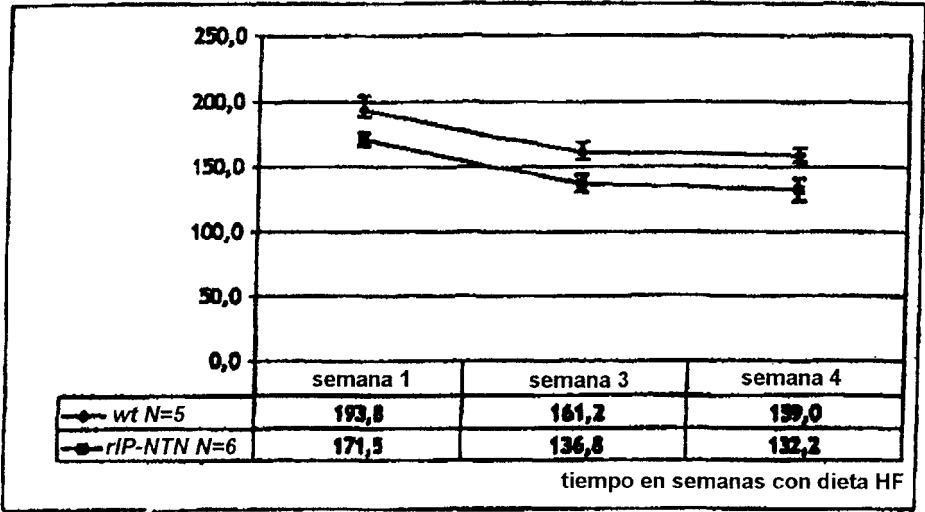


Fig. 4