



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 076**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/48 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99961585 .9**

96 Fecha de presentación : **04.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1126858**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

54

Título: **Producción de un factor biológico y creación de un entorno inmunológicamente privilegiado usando células de Sertoli alteradas genéticamente.**

30

Prioridad: **06.11.1998 US 107438 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2010

73

Titular/es: **Sertoli Technologies, Inc.**
5210 East Williams Circle, Suite 240
Tucson, Arizona 85711-4410, US

72

Inventor/es: **Shaun A. Kirkpatrick;**
Gores, Paul y
Halberstadt, Craig

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 338 076 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de un factor biológico y creación de un entorno inmunológicamente privilegiado usando células de Sertoli alteradas genéticamente.

Los trasplantes de órganos o células sanas en un paciente que padece una enfermedad a menudo lo rechaza el cuerpo debido a una respuesta inmune iniciada en respuesta al tejido o células foráneas. Las células alteradas genéticamente administradas durante terapia génica a menudo sufren una respuesta inmune similar. La presente invención proporciona un método de trasplante celular en el que se crea un sitio inmunológicamente privilegiado, aliviando de este modo el rechazo asociado con el trasplante convencional y las terapias génicas.

Específicamente, la presente invención proporciona composiciones y métodos para proporcionar a un individuo un factor biológico o intermedio del mismo que comprenden introducir en el individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células de Sertoli manipuladas genéticamente para producir el factor biológico o intermedio del mismo y en los que las células de Sertoli crean un sitio inmunológicamente privilegiado. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende células de Sertoli alteradas genéticamente que producen un factor biológico.

Ciertas enfermedades crónicas destruyen las células funcionales en los órganos afectados. Los individuos con dichas enfermedades a menudo son incapaces de producir proteínas u otros productos biológicos necesarios para mantener la homeostasis y habitualmente requieren numerosas sustancias exógenas para sobrevivir. El trasplante de órganos o células sanas en un individuo que padece dicha enfermedad puede ser necesario para salvar la vida del individuo. Este tipo de terapia se considera generalmente como una última alternativa para curar una afección de lo contrario fatal. Dichos trasplantes, sin embargo, a menudo lo rechaza el cuerpo debido a una respuesta inmune iniciada en respuesta al tejido o células foráneas. Actualmente, el único recurso para combatir esta respuesta inmune es administrar agentes de inmunosupresión no específicos crónicos. El uso de agentes de inmunosupresión no específicos, sin embargo, está cargado de efectos secundarios indeseados tales como susceptibilidad aumentada a infección, hipertensión, fallo renal y crecimiento tumoral.

En los campos del trasplante celular y de órganos, Selawry *et al.*, han demostrado que las células de Sertoli pueden usarse para crear un entorno privilegiado artificial cuando se aíslan de los testículos y después se trasplantan en sitios heterólogos. Los entornos privilegiados se han creado usando células de Sertoli tanto alogénicas como xenogénicas. Rajotte y Korbitt, 1997 *Diabetes* 46: 317-322. Asimismo, se ha demostrado que tanto aloinjertos de células de Sertoli de rata como xenoinjertos de células de Sertoli porcinas sobreviven durante al menos dos meses en cerebro de rata sin inmunosupresión con ciclosporina A. Saporta, S. *et al.*, 1997 *Exp. Neurology* 146 (2): 299-304. Selawry, *et al.*, también han demostrado la inmunoprotección de células del islote colocadas en la cápsula renal de rata cuando se cotrasplantan con células de Sertoli. Se han demostrado la supervivencia del islote a largo plazo y la recuperación funcional en un modelo de rata diabética. Selawry, H., *et al.*, 1993 *Cell Transplant* 2: 123-129. Recientemente se ha sugerido que las células de Sertoli expresan un factor inmunosupresor, el ligando Fas (Fas-L), responsable de proporcionar a los testículos por completo o en parte su estado inmunoprivilegiado. Sandberg, P.R., *et al.*, 1997 *Cell Transplantation* 6 (2):191-193; Saporta, S., *et al.*, *supra*.

El rechazo inmune de células alteradas genéticamente durante terapia génica sigue siendo un problema. Para superar el problema, pueden usarse células autólogas, es decir, células del propio paciente. De hecho, la mayoría de los protocolos de terapia génica humana actualmente aprobados dependen de alteración genética de células autólogas. Dichas células, sin embargo, pueden ser difíciles de obtener debido al estado patológico del paciente y a menudo se destruyen durante su recolección. Las células que sobreviven a la recolección a menudo son difíciles de cultivar *in vitro* y requieren condiciones de cultivo y metodologías de purificación complicadas.

Existe la necesidad, por lo tanto, de composiciones y métodos para producir un factor biológico en un sujeto en los que las células que están alteradas genéticamente para producir el factor biológico estén fácilmente disponibles y se manipulen más fácilmente *in vitro*. Además, existe la necesidad de composiciones y métodos para producir un factor biológico en un sujeto que recibe células alogénicas o xenogénicas que no desencadenen una respuesta inmune que requiera inmunosupresión crónica.

La presente invención proporciona composiciones y métodos para proporcionar a un individuo un factor biológico o intermedio del mismo que comprenden introducir en el individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células de Sertoli manipuladas genéticamente para producir el factor biológico o intermedio del mismo y en los que las células de Sertoli crean un sitio inmunológicamente privilegiado.

La presente invención también proporciona el tratamiento de una enfermedad causada por una deficiencia de un factor biológico que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de células de Sertoli transformadas genéticamente para producir el factor biológico o un intermedio del factor biológico y en el que las células de Sertoli crean un sitio inmunológicamente privilegiado.

Preferiblemente, las células de Sertoli alteradas genéticamente se administran por trasplante. El trasplante puede ser por xenoinjerto o aloinjerto.

ES 2 338 076 T3

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende células de Sertoli transformadas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio del mismo mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 También se proporciona un kit compartimentado que comprende un primer recipiente adaptado para contener células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio del mismo.

La presente invención también proporciona un vector que comprende en dirección 5' a 3' un promotor que funciona en células de Sertoli unido de forma funcional a una secuencia codificante de un factor biológico o intermedio. El vector puede comprender adicionalmente una secuencia de terminación 3' que funciona en células de Sertoli y/o una secuencia señal que codifica un péptido señal. La secuencia señal está localizada cadena debajo de la secuencia promotora y cadena arriba a la secuencia codificante de un factor biológico o intermedio.

15 También se proporcionan células de Sertoli que comprenden los presentes vectores.

La presente invención proporciona composiciones y métodos para producir un factor biológico en un sujeto. Las composiciones y métodos se protegen a sí mismos de la destrucción inmune por el sujeto, eliminado de este modo la necesidad de inmunosupresión crónica.

20 De acuerdo con la presente invención, las células de Sertoli, las células predominantes de los testículos, se usan para producir un factor biológico tal como una proteína *in vivo*. Las células de Sertoli usadas para producir el factor biológico están alteradas genéticamente y se generan por transferencia génica *ex vivo* o también se aíslan de un animal transgénico no humano que expresa el factor biológico en células de Sertoli. Las células de Sertoli alteradas genéticamente después se introducen en un sujeto de modo que se produzca el factor biológico en ese sujeto. Las células de Sertoli trasplantadas resultantes, además de producir un factor biológico deseado, también crean un entorno inmunoprivilegiado en el sitio del trasplante.

Preferiblemente, la vía de introducción es por trasplante subcutáneo en sitios tales como el espacio subcapsular renal, la fascia subcutánea, el espacio subcapsular hepático, el cerebro, la vena porta hepática o la bolsa omental. Las células de Sertoli alteradas genéticamente también pueden colocarse en un dispositivo biocompatible que permita el contacto con el sistema vascular, localice las células de Sertoli, y posibilite que las células Sertoli sobrevivan a largo plazo. Dicho dispositivo también proporciona protección añadida al rechazo por el sistema inmune. Un ejemplo de dicho dispositivo biocompatible se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.182.111, expedida para Aebischer *et al.* Dispositivos de inmunoaislamiento tales como cápsulas de alginato o termoplásticas y fibras huecas también pueden albergar las células alteradas genéticamente *in vivo*. Dichos dispositivos se revisan en Chang, P.L. 1997 *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, Sept./Oct., pág. 145-151.

De acuerdo con la presente invención, puede crearse un animal transgénico no humano que exprese un factor biológico en células de Sertoli usando cualquiera de varios sistemas actualmente disponibles. Por ejemplo, pueden usarse construcciones de expresión que tienen un promotor que funciona en células de Sertoli unido de forma funcional a la secuencia codificante de un factor biológico o intermedio para transfectar los testículos de ratones vivos por bombardeo de micropartículas y electroporación. Muramatsu T. *et al.*, (1997) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 233 (1): 45-49. Dichas construcciones también pueden microinyectarse en los pronúcleos mediante procedimientos convencionales como se describe en Hogan *et al.* (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

La presente invención es útil para mejorar la salud general, el bienestar, o el aspecto de un individuo suministrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor biológico o intermedio del mismo o también es útil para tratar una enfermedad causada por una deficiencia de un factor biológico.

50 Como se define por la presente invención, un factor biológico es una proteína o compuesto no proteico que es necesario para el metabolismo celular y la homeostasis. Además, de acuerdo con la presente invención, un factor biológico es una proteína o compuesto no proteico que está ausente, deficiente o alterado en un sujeto que padece una enfermedad particular. Como se usa en este documento, el término "proteína" incluye, aunque sin limitación, péptidos y polipéptidos. El factor biológico puede ser una proteína que potencia las propiedades inmunosupresoras y potenciadoras del crecimiento de las células de Sertoli. Cuando el factor biológico es un compuesto no proteico, las células de Sertoli se modifican por ingeniería genética para producir una proteína tal como una enzima siendo dicha proteína necesaria para una o más etapas en la vía biosintética de un compuesto no proteico. Por tanto, las células de Sertoli pueden diseñarse para producir un intermedio proteico para un factor biológico no proteico.

60 Las proteínas producidas de forma recombinante de las células de Sertoli pueden comprender cualquiera de varias proteínas estructurales, terapéuticas o biológicamente funcionales, es decir, un polipéptido o proteína que afecte al mecanismo celular de la célula en la que se expresa la proteína biológicamente funcional o a la que se administra. Por ejemplo, la proteína biológicamente funcional puede ser una proteína que afecte al mecanismo celular de la célula de Sertoli en la que se expresa la proteína biológicamente funcional. La proteína biológicamente funcional también puede ser una proteína que mejore la salud de un mamífero suministrando una proteína desaparecida, proporcionando cantidades aumentadas de una proteína que se produce en cantidades bajas en el mamífero, o proporcionando una proteína que inhiba o contrarreste una molécula indeseada que puede estar presente en el mamífero. El factor biológico

también puede ser un factor que ayude a mantener o mejore la salud y bienestar del individuo e incluye por ejemplo, péptidos que estimulan o disminuyen el apetito.

5 La proteína biológicamente funcional puede ser una proteína que sea esencial para el crecimiento normal o reparación de las células. La proteína biológicamente funcional también puede ser una que sea útil para combatir enfermedades tales como el cáncer, la aterosclerosis, la anemia falciforme y las talasemias. Ejemplos de dichas proteínas biológicamente funcionales son la hemoglobina (α , β o γ -globina), factores de crecimiento hematopoyéticos tales como el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y la eritropoyetina (EPO). Otro ejemplo es el factor de necrosis tumoral (TNF), que es una
10 molécula que puede usarse para tratar el cáncer, y en particular, tumores. También se contemplan el supresor tumoral p53 y el retinoblastoma (RB). Diversas citoquinas tales como el factor de crecimiento de mastocitos (MGF) y las interleuquinas 1-11 también son proteínas que se contemplan para la producción por las células de Sertoli alteradas genéticamente de la presente invención. El factor XIII (para el tratamiento de la hemofilia A), el factor IX (para el tratamiento de la hemofilia B), la IL-2 (para potenciar la capacidad de las células de Sertoli de proporcionar inmunoprotección), la insulina (para el tratamiento de la diabetes), y la dopamina (para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson) también son ejemplos de proteínas que pueden producirse por las células de Sertoli de acuerdo con la
15 presente invención.

20 La B-UGT es también otro ejemplo de una proteína que puede fabricarse por las presentes células de Sertoli alteradas genéticamente para el tratamiento de la enfermedad de Crigler-Najjar (CN). Los mamíferos normalmente tienen una enzima hepática, la bilirrubin UDP-glucuronosiltransferasa (B-UGT), que conjuga la bilirrubina (un producto final de la descomposición de la hemoglobina) con ácido glucurónico, que vuelve a la molécula más soluble en agua y excretable. Los pacientes con la enfermedad de Crigler-Najjar (CN) tienen una deficiencia en la B-UGT y acumulan elevados niveles séricos de bilirrubina. Las ratas Gunn también son incapaces de la conjugación de la bilirrubina debido a un defecto genético en la UDP-glucuroniltransferasa. Los fibroblastos de ratas Gunn que expresan B-UGT recombinante se han trasplantado de forma intraperitoneal en ratas Gunn con la corrección resultante del defecto genético.

30 Por tanto, se contempla cualquier proteína que pueda producirse a través de medios de ADN recombinante para su producción por las presentes células de Sertoli alteradas genéticamente y para su uso en los métodos de la presente invención. Existen muchos procedimientos bien conocidos para la preparación de secuencias de ADN que codifiquen una proteína deseada. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos de diversas longitudes por procedimientos conocidos. Varios de dichos oligonucleótidos pueden ensamblarse en moléculas bicatenarias más largas. Como alternativa, pueden sintetizarse moléculas de ADN que tienen las secuencias codificantes deseadas por el uso de la enzima transcriptasa inversa usando ARN mensajero relacionado con el polipéptido deseado como molde para la acción de la transcriptasa inversa (clonación de ADNc). Otra posibilidad para preparar secuencias de ADN que codifiquen la proteína deseada es la clonación de fragmentos de ADN genómico obtenidos de un banco o biblioteca de genes. En muchos casos, el ADN que codifica la proteína de interés está disponible en el mercado.

40 En algunos casos, la proteína producida de forma recombinante es beneficiosa para ejercer su efecto sobre la célula de Sertoli en la que se produce. La IL-2 es un ejemplo de dicha proteína. En muchos otros casos, sin embargo, la proteína producida de forma recombinante de la célula de Sertoli alterada genéticamente beneficia al sujeto solamente cuando dicha proteína alcanza otras células no de Sertoli. Por tanto, en una realización preferida de la invención, la proteína producida de forma recombinante se exporta a través de la membrana de la célula de Sertoli y fuera de la célula de Sertoli, es decir, se secreta. En este aspecto de la invención, la proteína producida de forma recombinante tendrá en su extremo N-terminal un péptido señal (secuencia líder N-terminal). El péptido señal posibilita el transporte de la proteína producida de forma recombinante fuera de la célula de Sertoli donde se produce y en los espacios intercelulares y capilares de las células adyacentes. Una vez transportada fuera de la célula de Sertoli, la proteína producida de forma recombinante entra en el sistema circulatorio del sujeto.

50 El péptido señal puede estar codificado por el mismo gen del que deriva el promotor, por ejemplo, FSHR. En esta realización de la invención, la proteína producida de forma recombinante es muy a menudo una proteína quimérica. También puede usarse el péptido señal nativo de la proteína producida de forma recombinante. En otra realización más, el péptido señal puede ser de una proteína diferente a la proteína producida de forma recombinante o una proteína cuyo gen correspondiente proporciona el promotor para el vector de expresión. Muchas proteínas diferentes tienen péptidos señal en sus extremos N-terminales. Los especialistas en la técnica son conscientes de muchas secuencias diferentes conocidas como secuencias señal, que codifican péptidos señal. Dichas secuencias señal son útiles para su incorporación en vectores de expresión de la presente invención para asegurar la secreción de la proteína producida de forma recombinante fuera de la célula de Sertoli.

60 Las células de Sertoli que tienen que alterarse genéticamente para producir un factor biológico deseado se aíslan primero usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en Cheng *et al.*, 1987 *J. Biol. Chem.* 26: 12768-12779. Las células de Sertoli pueden separarse de otras células testiculares tales como las células de Leydig, las células peritubulares y las células germinales, usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los testículos de un mamífero masculino, tal como un ser humano, un ratón, una rata, un cerdo, un jabalí o un carnero, se recogen primero por castración. Los testículos después se pican en varios trozos y posteriormente se lavan por centrifugación.

Las células de Leydig testiculares pueden retirarse de la suspensión tisular usando agentes de digestión tales como tripsina y DNasa. La suspensión celular restante después se lava por centrifugación varias veces. El sedimento se resuspende en colagenasa, se incuba y se lava por centrifugación para eliminar las células peritubulares dentro de los testículos. Las células germinales testiculares pueden retirarse incubando el sedimento con hialuronidasa y DNasa. Después de varios lavados por centrifugación, las células de Sertoli pueden recogerse para la transformación genética. Se describen métodos similares para aislar células de Sertoli en Selawry, H.P. y Cameron, D.F., (1993) *Cell Transplantation* 2: 123-129; y Korbitt, G.S., et al., (1997) *Diabetes* 46: 317-322.

Las líneas celulares de Sertoli establecidas también pueden usarse para producir un factor biológico de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, se ha establecido una línea celular de Sertoli de rata inmortalizada (SerW3). Pognan, F., et al., 1997 *Cell Biology and Toxicology* 13: 453-463. Se inmortalizaron células de Sertoli de rata primarias frescas con los antígenos T del virus de simio (SV40) que se sabe que inmortalizan células heterólogas pero no las transforman. La línea celular de Sertoli SerW3 tiene propiedades estructurales y bioquímicas similares a las de células primarias en cultivo o células de Sertoli en secciones testiculares. Pognan F., supra. También se ha desarrollado recientemente una línea celular de Sertoli de rata prepuberal conocida como 93RS2. Jiang, C., et al., 1997 *J. Andrology* 18 (4): 393-399. También se han establecido líneas celulares de Sertoli inmortalizadas de forma condicionada a partir de ratones transgénicos *H-2K^b-tsA58*. Walther N., et al., 1996 *Exp. Cell Res.* 225: 411-421.

De acuerdo con la presente invención, pueden usarse células de Sertoli primarias o cultivadas para producir un factor biológico. Sean células primarias o células cultivadas, las células de Sertoli de la presente invención pueden obtenerse de especies tales como rata, ser humano, especies porcinas, murinas, bovinas u otras especies. Estas células de Sertoli lejanamente relacionadas funcionan como células productoras de factor biológico "universales" ya que después de su administración, dichas células no desencadenarán un rechazo inmune, incluso en un sujeto receptor lejanamente relacionado o no relacionado.

De acuerdo con la presente invención, las células de Sertoli aisladas pueden alterarse genéticamente para producir un factor biológico deseado usando cualquiera de varios métodos bien conocidos. Por ejemplo, primero se coloca una secuencia de ADN o ARN que codifica una proteína particular dentro de un vector que puede replicarse dentro de una célula de Sertoli. Por tanto, la presente invención también proporciona vectores para la expresión de proteínas en la célula de Sertoli. Dentro del vector, la secuencia codificante de una proteína particular se une de forma funcional en su extremo 5' a un promotor que funciona en células humanas, de ratón, de rata, de cerdo, de jabalí o de carnero, incluyendo células de Sertoli. En una realización preferida, el vector también contiene una secuencia de terminación 3' unida de forma funcional al extremo 3' de la secuencia codificante.

Los vectores de la presente invención pueden construirse por técnicas convencionales conocidas para los especialistas en la técnica y que se encuentran, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory-Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., o cualquiera de la multitud de manuales de laboratorio sobre tecnología de ADN recombinante que están ampliamente disponibles. Está disponible una diversidad de estrategias para ligar fragmentos de ADN, cuya elección depende de la naturaleza de los extremos de los fragmentos de ADN y pueden determinarla fácilmente los especialistas en la técnica.

Los vectores de la presente invención también pueden contener otros elementos de secuencia para facilitar la propagación, el aislamiento y la subclonación del vector; por ejemplo, genes marcadores de selección y orígenes de replicación que permiten la propagación y selección en bacterias y células hospedadoras. Los genes marcadores de selección pueden incluir genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina para la propagación en bacterias o resistencia a neomicina, higromicina o zeocina para la selección en células de mamífero. Las secuencias para genes heterólogos que codifican proteínas estructurales, terapéuticas o biológicamente funcionales así como secuencias para marcadores de selección y genes informadores son bien conocidas para los especialistas en la técnica. Ejemplos de genes informadores incluyen GFP, luciferasa, CAT, y β -galactosidasa. Por "genes heterólogos" se entiende secuencias codificantes o partes de las mismas que se introducen de forma artificial en células de Sertoli.

Están actualmente disponibles sistemas de expresión inducibles en los que factores administrados de forma exógena funcionan induciendo la expresión génica. Dichos sistemas son especialmente útiles en la selección de células de Sertoli que se han transformado con un vector de expresión de la presente invención. Los sistemas REV TET-ONTM y REV TET-OFFTM disponibles en Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA, y el Sistema de Expresión de Mamíferos Inducible con Ecdisona, disponible en Invitrogen, Carlsbad, CA, son especialmente útiles a este respecto.

Los promotores que funcionan en células de Sertoli son conocidas para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el promotor para la transferrina o la clusterina. Para limitar la expresión del factor biológico o intermedio deseado a células de Sertoli solamente, puede emplearse el promotor del receptor de la hormona folículo-estimulante (FSHR). Otros promotores, secuencias reguladoras 5' cadena arriba y secuencias reguladoras 3' incluyendo secuencias de terminación que pueden usarse en los vectores de la presente invención incluyen secuencias de citomegalovirus (CMV), del virus de simio 40 (SV40), del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), de herpesvirus, de poxvirus, y de virus adeno-asociados (AAV), el virus de Epstein-Barr (EBV).

El gen de la clusterina se ha estudiado en ratón, rata, y ser humano. Herault et al., 1992 *Nucleic Acids Research* 20: 6377-6383; Wong et al., 1993 *J. Biol. Chem.* 268: 5021-5031, Wong et al., 1994 *Eur. J. Biochem.* 221: 917-925; Jordan - Starck et al., 1994, *J. Lipid Res.* 35: 194-210; Rosemblyt y Chen, 1994 *J. Mo. Endocrinology* 13: 69-76. El gen se

expresa en los tejidos reproductores masculinos a diferentes niveles y se expresa más elevadamente en las células de Sertoli. Rosembly *et al.*, 1996 *J. Mol. Endocrinology* 16: 287-296. Se ha descubierto en rata y ratón que los andrógenos y el AMPc regulan negativamente la expresión génica de la clusterina. Pignataro *et al.*, 1992 *Endocrinology* 130 (5): 2745-2750. Las secuencias reguladoras de la clusterina tales como el promotor y las secuencias flanqueantes 5' de rata se han identificado localizadas entre los nucleótidos -266 y +54. Los elementos de ADN reguladores negativos potenciales pueden estar presentes en localizaciones cadena arriba tales como -266 a -714 y de -714 a -1298. Rosembly *et al.*, 1996, *J. Endocrinology* 16 (3): 287-296. Se ha publicado la región promotora del gen de la clusterina humana. Michel *et al.*, 1997 *Biochem. J.* 328: 45-50; Wong *et al.* 1994 *Eur. J. Biochem* 221: 911-925. Entre los promotores de las clusterinas de mamífero, existe una conservación relativamente moderada; la mayor parte de la homología está confinada dentro de un dominio muy proximal con regiones cadena arriba que son completamente divergentes. Michel, *supra*.

El promotor del gen del receptor de FSH (FSHR) también puede usarse en los vectores de expresión de la presente invención. La expresión génica del FSHR está limitada a las células de Sertoli de los testículos y las células granulosas del ovario. Gromoll *et al.*, 1996 *Genomics* 35: 308-311. Por tanto, este promotor específico de tejido es muy útil para las composiciones y métodos de la presente invención. El gen de FSHR se ha aislado y caracterizado en ratón, rata y ser humano. Goetz *et al.*, 1996 *J. Biol. Chem.* 271 (52): 33317-33324. En ratas, experimentos de extensión de cebador y nucleasa S1 han localizado dos sitios de inicio de la transcripción principales; uno en -80 y uno en -98 con relación al sitio de inicio de la traducción. Estudios de expresión transitoria utilizando un gen quimérico constituido por 830 pb de ADN 5' al sitio de inicio de la traducción unido de forma funcional al gen de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) han demostrado que esta parte del gen actúa como promotor de la transcripción en células de Sertoli de rata. Heckert, L.L., *et al.*, 1992 *Mol. Endocrin.* 6 (1):70-80.

El gen del FSHR humano tiene 54 kb, que consta de 10 exones y 9 intrones. El gen codifica 695 aminoácidos incluyendo un péptido señal de 18 aminoácidos. La región promotora central está localizada entre el codón de inicio de la traducción y 225 pb cadena arriba. Como en rata y ratón, en el gen humano, una caja CAAT o TATA consenso no está localizada dentro de esta región promotora. Gromoll *et al.*, *supra*. La región promotora del gen del FSHR humano se ha mapeado con precisión y se ha demostrado que consta de una secuencia de caja E consenso conservada y una secuencia de región tipo iniciador (InR). Se ha demostrado que una región de 114 pares de bases que abarca de -143 a -30 que incluye la caja E y la InR es suficiente para conferir más del 75% de la función promotora. Mutaciones en la InR, sin embargo, provocan una reducción significativa de la actividad del promotor del FSHR. Goetz, *supra*. También se ha publicado la secuencia de la región flanqueante 5' del gen del FSHR humano. Cuando se transfectaban de forma transitoria con construcciones génicas que contienen 1486 pb de la región flanqueante 5' del gen del FSHR (incluyendo delecciones del mismo), unido de forma funcional al gen de la CAT, las células de ovario de hámster chino (CHO), las células de Sertoli de rata primarias, y las células granulosas-luteínicas humanas dirigían una expresión significativa de CAT. La región proximal del promotor se ha asignado a la región de -225 a -1 pb. Gromoll *et al.*, 1994 *Molecular and Cellular Endocrinology* 102: 93-102.

Otra secuencia reguladora útil para las composiciones y métodos de la presente invención incluye el promotor del gen de la transferrina. La transferrina, una proteína transportadora de hierro, se expresa a un elevado nivel en el hígado pero a bajos niveles en otros órganos tales como el cerebro, las células de Sertoli de los testículos, las glándulas mamarias y el músculo fetal. Las células de Sertoli sintetizan y secretan transferrina testicular. Schaeffer *et al.*, 1993 *J. Biol. Chem.* 268 (31): 23399-23408; Guillou *et al.*, 1991 *J. Biol. Chem.* 266 (15): 9876-9884; Skinner *et al.* 1980 *J. Biol. Chem.* 255: 9523-9525. Se ha aislado el gen humano y se han identificado las secuencias reguladoras. Adrian *et al.*, 1986 *Gene* 49: 161-115. Análisis de delección 5' en sistemas de expresión transitoria han indicado que la región de -125/+39 es la región proximal del promotor. Schaeffer *et al.*, 1989 *J. Biol. Chem.* 264: 7153-7160. La región que abarca de -52 a +30 de la caja TATA es suficiente para activar un nivel basal de transcripción. Guillou *et al.*, 1991 *J. Biol. Chem.* 266: 9876-9884. La activación transcripcional en células de Sertoli implica la interacción de proteínas de unión al ADN con el par PRI-caja TATA o el par PRI-PRII. Guillou *et al.*, 1991 *J. Biol. Chem.* 266: 9876-9884. También se ha descubierto que el promotor de la transferrina contiene dos elementos de respuesta críticos denominados elemento de Sertoli 1 (SE1) y elemento de Sertoli 2 (SE2). A través del análisis de secuenciación, se ha descubierto que SE2 contiene un elemento de caja E. Se ha demostrado que los elementos de respuesta de caja E responden a factores de transcripción de hélice-bucle-hélice básicos (bHLH). Las proteínas de transcripción bHLH son una clase de factores de transcripción que están implicados en la inducción y progreso de la diferenciación celular. Chaudhary, J., *et al.*, 1997 *Endocrinology* 138 (2): 667-675.

Ratones transgénicos transformados con construcciones genéticas en las que un segmento de 670 pb de la secuencia reguladora del gen de la transferrina humana está unido de forma funcional al gen de la CAT o tres diferentes alelos de apolipoproteína E (apoE) han mostrado expresión de dichos genes en diferentes partes de su cerebro. Bowman, B.H., *et al.*, 1995 *Proc. Nat., Acad. Sci. USA* 92 (26): 12115-12119. La región flanqueante 5' del gen de la transferrina de ratón también se ha aislado y usado para dirigir la expresión de la hormona del crecimiento humana (hGH) en ratones transgénicos.

Los especialistas en la técnica están familiarizados con las metodologías requeridas para subclonar todo o una parte de los genes de la clusterina, el FSHR, y la transferrina, y para aislar las regiones reguladoras respectivas tales como el promotor y secuencias reguladoras 5' y 3'. Por ejemplo, un promotor del gen de la clusterina, el FSHR, o la transferrina y secuencias reguladoras cadena arriba pueden generarse a partir de un clon genómico de ratón, de rata, bovino, porcino, o humano que tenga exceso de la secuencia flanqueante 5' o la secuencia codificante cadena abajo o

ambas mediante delección mediada por exonucleasa III. Esto se consigue digiriendo ADN preparado apropiadamente con exonucleasa III (exoIII) y retirando alícuotas a intervalos crecientes de tiempo durante la digestión. Los fragmentos sucesivamente más pequeños resultantes de ADN pueden secuenciarse para determinar el punto final exacto de las delecciones. Hay varios sistemas disponibles en el mercado que usan exonucleasa III (exoIII) para crear dicha serie de delecciones, por ejemplo, el sistema "Erase-A-Base" de Promega Biotech. Como alternativa, pueden definirse cebadores de PCR para permitir la amplificación directa de los promotores y las regiones reguladoras 5' deseadas.

Una secuencia reguladora 3' de clusterina, FSHR, o transferrina, incluyendo la secuencia de terminación 3', puede aislarse a partir de un clon genómico de ratón, de rata, bovino, porcino, o humano que tenga exceso de la secuencia flanqueante 3' o la secuencia codificante cadena arriba o ambas mediante las mismas metodologías de delección mediadas por exoIII descritas anteriormente.

Las secuencias reguladoras 5' y 3' y las secuencias de ADN que codifican una proteína deseada y el péptido señal pueden modificarse para la preparación de un vector de expresión por una diversidad de procedimientos. Por ejemplo, los extremos del ADN preparado como se ha descrito anteriormente pueden ligarse con la enzima ADN ligasa en moléculas de ADN bicatenarias cortas que contienen la secuencia de nucleótidos reconocida por endonucleasas de restricción específicas, llamadas moléculas enlazadoras. La digestión de estas moléculas con una endonucleasa de restricción específica después del ligamiento generará extremos correspondientes al sitio de reconocimiento por la endonucleasa de restricción específica en los extremos de la secuencia de ADN preparada.

Por tanto, la presente invención también proporciona un vector de expresión recombinante que comprende en dirección 5' a 3': un promotor que funciona en una célula de Sertoli y la secuencia codificante de un factor biológico o intermedio. En otra realización, uno de los presentes vectores comprende en dirección 5' a 3': un promotor que funciona en una célula de Sertoli, la secuencia codificante de un factor biológico o intermedio y una secuencia reguladora 3' que incluye una secuencia de terminación. En otra realización más, se proporciona un vector que comprende en dirección 5' a 3': un promotor que funciona en una célula de Sertoli, una secuencia señal, y la secuencia codificante de un factor biológico o intermedio. En otra realización más, se proporciona un vector que comprende en dirección 5' a 3': un promotor que funciona en una célula de Sertoli, una secuencia señal, la región codificante de un factor biológico o intermedio, y una secuencia reguladora 3' que incluye una secuencia de terminación. Otras realizaciones incluyen cualquiera de los vectores definidos anteriormente con una secuencia reguladora 5' adicional además del promotor.

Los presentes vectores después pueden introducirse en la célula de Sertoli. La introducción de ADN en células de Sertoli puede conseguirse a través de diversos procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, los presentes vectores pueden comprender secuencias virales necesarias para el empaquetado, la transcripción inversa, y la integración en un genoma hospedador además de un promotor que funcione en células de Sertoli unido de forma funcional a la secuencia codificante de un factor biológico o intermedio como se ha descrito *supra*. Vectores que tienen dichas secuencias son útiles para su introducción por transfección en células auxiliares a partir de las cuales pueden producirse viriones recombinantes. Los viriones que contienen los presentes vectores después se usan para transfectar células de Sertoli.

También pueden usarse técnicas físicas/químicas tales como transfección con fosfato cálcico, formación de complejos con policationes o lípidos, electroporación, bombardeo de partículas y microinyección en núcleos para transfectar células de Sertoli. Preferiblemente, la introducción de los presentes vectores en células de Sertoli se consigue usando liposomas.

Están disponibles en el mercado reactivos de lipofectina, por ejemplo, el sistema LipofectAMINE® disponible en Gibco/BRL. En esta metodología, lípidos cargados positivamente y neutros forman liposomas que forman complejos con las presentes construcciones de vector de ADN cargadas negativamente. Los complejos ADN-liposoma se aplican a las células de Sertoli primarias o cultivadas y se captan por endocitosis. Los endosomas experimentan la ruptura de las membranas y las construcciones de ADN se liberan dentro de las células de Sertoli. El ADN entra en el núcleo de la célula de Sertoli a través de poros nucleares y facilita la integración o recombinación homóloga en los cromosomas de la célula de Sertoli.

Después de la transferencia de la construcción genética en células de Sertoli, las células se seleccionan usando el antibiótico apropiado. Después se realiza la detección de la expresión del gen heterólogo usando un ensayo apropiado. El ensayo usado para detectar la expresión depende de la naturaleza de la secuencia heteróloga. Por ejemplo, habitualmente se usan genes informadores ejemplificados por la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), la β -galactosidasa y la luciferasa, para evaluar la competencia transcripcional y traduccional de las construcciones químicas. Están disponibles ensayos convencionales para detectar sensiblemente la enzima informadora en un organismo transgénico. Por ejemplo, puede emplearse un ensayo de CAT que detecta derivados de cloramfenicol mono y diacetilados por cromatografía en capa fina. Los derivados de cloramfenicol pueden cuantificarse por formación de imágenes con fósforo.

Las células de Sertoli transformadas con vectores que comprenden el gen informador de la β -galactosidasa, pueden identificarse detectando el resto galactosidasa escindido por emisión de luz. Este método se realiza mejor usando un luminómetro o contador de centelleo.

La introducción de células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico deseado o intermedio en un sujeto tal como un mamífero se consigue por técnicas convencionales. En una realización preferida,

la introducción es por trasplante subcutáneo. Los ejemplos de localizaciones preferidas para el trasplante incluyen el espacio subcapsular renal, el espacio subcapsular hepático, la bolsa omental, la fascia subcutánea, el cerebro y la vena porta hepática. Pueden crearse entornos inmunoprivilegiados en el sitio del trasplante usando células de Sertoli alogénicas o xenogénicas.

5 De acuerdo con la presente invención, puede administrarse un factor biológico exógeno después del trasplante de las células de Sertoli alteradas genéticamente hasta que las células de Sertoli trasplantadas produzcan una cantidad terapéuticamente eficaz del factor biológico. Por ejemplo, en el tratamiento de la diabetes, puede administrarse insulina después del trasplante de las células de Sertoli productoras de insulina hasta que las células de Sertoli trasplantadas produzcan una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina.

10 Las células de Sertoli que producen el factor biológico o intermedio pueden trasplantarse usando cualquier técnica capaz de introducir las células en un sujeto tal como administración parenteral o administración subcutánea después de exposición quirúrgica en un sitio deseado. Antes del trasplante, el mamífero receptor se anestesia usando anestesia local o general de acuerdo con técnicas convencionales. Por ejemplo, después de anestesiarse al mamífero, pueden inyectarse las células de Sertoli en una masa tisular, creando de este modo un sitio inmunoprivilegiado. En una realización preferida, el sujeto a tratar es un mamífero. En una realización incluso más preferida, el mamífero es un ser humano.

15 De acuerdo con la presente invención, la introducción de las células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio también provoca la creación de un sitio inmunológicamente privilegiado en el sujeto tratado. Un sitio inmunológicamente privilegiado como se define por la presente invención es un sitio en el sujeto donde la respuesta inmune producida en respuesta a las células trasplantadas se suprime debido a agentes inmunosupresores producidos por las células de Sertoli trasplantadas.

20 Como se usa en este documento, el término “alogénico” se refiere a tejidos o células de dos sujetos genéticamente distintos de la misma especie. El término “xenogénico” se refiere a tejidos o células de dos sujetos genéticamente distintos de diferente especie. El término “aloinjerto” como se usa en la presente invención describe la transferencia de tejidos o células entre dos sujetos genéticamente distintos de la misma especie. El término “xenoinjerto” en la presente invención describe la transferencia de tejidos o células entre dos sujetos de diferente especie.

25 Las células de Sertoli se introducen en una cantidad eficaz para proporcionar un sitio inmunológicamente privilegiado. Dicha cantidad eficaz se define como la que previene el rechazo inmune de las células de Sertoli alteradas genéticamente trasplantadas. El rechazo inmune puede determinarse, por ejemplo, histológicamente, o por evaluación funcional del factor biológico producido por las células.

30 Las células de Sertoli alteradas genéticamente que producen el factor biológico se introducen en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por “cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende una cantidad eficaz para producir el efecto deseado. Por ejemplo, en el caso de un péptido que estimula el apetito, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que estimula el apetito. En el caso de un péptido que reduce el apetito, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que reduce el apetito. En el caso de una enfermedad particular, “una cantidad terapéuticamente eficaz” es esa cantidad eficaz para tratar la enfermedad. Para propósitos de la presente invención, los términos “tratar” o “tratamiento” incluyen prevenir, inhibir, reducir la incidencia de y/o mejorar los efectos fisiológicos de la patología tratada.

35 Los especialistas en la técnica pueden determinar la cantidad apropiada de células que producen el factor biológico o intermedio por métodos conocidos en la técnica. La cantidad de células de Sertoli depende de la cantidad de factor que está produciendo las células y la cantidad terapéuticamente eficaz conocida del factor necesaria para producir el efecto deseado o tratar la enfermedad. La cantidad terapéuticamente eficaz precisa de células de Sertoli alteradas genéticamente puede determinarla un médico considerando las diferencias individuales en la edad, el peso, la enfermedad particular a tratar, la fase de la enfermedad, y el estado del paciente. Generalmente puede establecerse que una composición terapéutica que comprende las presentes células de Sertoli alteradas genéticamente debe administrarse preferiblemente en una cantidad de al menos aproximadamente 1×10^1 a aproximadamente 1×10^{10} células por dosis.

40 Después del trasplante de las células de Sertoli alteradas genéticamente que producen un factor biológico o intermedio, puede administrarse un agente inmunosupresor durante un tiempo durante el cual las células de Sertoli llegarán a establecerse y a crear el sitio inmunoprivilegiado. Dichos agentes inmunosupresores incluyen, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimo, desoxiespergualina y anticuerpos monoclonales contra, por ejemplo, células T. En una realización preferida el agente inmunosupresor es ciclosporina. En otra realización preferida se administra ciclosporina en una dosificación de 0,5 mg a 200 mg/kg de peso corporal. En una realización más preferida se administra ciclosporina en una dosificación de 5 mg a 40 mg/kg de peso corporal.

45 Más generalmente, el agente inmunosupresor puede administrarse durante un tiempo suficiente para permitir que las células de Sertoli trasplantadas lleguen a ser funcionales. Este periodo se prolonga desde el punto antes de o inmediatamente después del trasplante de las células de Sertoli hasta el punto en el que las células son capaces de producir cantidades terapéuticamente eficaces del factor biológico o intermedio. En una realización preferida, el periodo de tiempo suficiente para administrar un agente inmunosupresor es de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 días después del trasplante de las células de Sertoli. En una realización más preferida, el periodo de tiempo suficiente es de aproximadamente 50-60 días.

Una realización de esta invención se refiere al tratamiento de la diabetes mellitus tipo I y tipo II trasplantando en el espacio subcapsular renal, células de Sertoli que se han alterado genéticamente para producir insulina. En otra realización de la invención, se proporciona el tratamiento de la hemofilia B trasplantado en el espacio subcapsular renal, células de Sertoli que se han alterado genéticamente para producir factor IX. En otra realización más de la invención, se proporciona un método para tratar la enfermedad de Crigler-Najjar (CN) trasplantando en el espacio subcapsular renal, células de Sertoli que se han alterado genéticamente para producir bilirrubin UDP-glucuronosiltransferasa (B-UGT).

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las células de Sertoli son células de Sertoli de rata, murinas, porcinas, bovinas o humanas. Como se usa en este documento, un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y similares. El uso de dichos medios y agentes es bien conocido en la técnica.

La presente invención también se refiere a un kit para el tratamiento de una enfermedad. En una realización, el kit está compartimentado para acoger un primer recipiente adaptado para contener células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio del mismo que está ausente, producido a bajos niveles, o deficiente en el individuo a tratar en una cantidad eficaz para producir el efecto deseado o para tratar la enfermedad. En una realización preferida, las células de Sertoli son de rata, murinas, bovinas, porcinas o humanas y se proporcionan en una cantidad de 10^1 a 10^{10} células. En una realización más preferida, las células de Sertoli se proporcionan en una cantidad de 10^5 a 10^{10} células. En otra realización preferida, las células de Sertoli que producen un factor biológico o intermedio son células que se han transformado con ADN que codifica el factor o intermedio.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos específicos que no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Se aíslan células de Sertoli de ratas Lewis y se cultivan durante dos a siete días usando técnicas convencionales (Selawry, H.P. y Cameron, D.F., 1993 *Cell Transplantation* 2: 123-129; Korbitt, G.S., *et. al.*, 1997 *Diabetes* 46: 317-322). Por ejemplo, se recogen testículos de ratas Lewis de 15 a 21 días de edad en solución salina equilibrada de Hank (HBSS), se pican en trozos de 1 mm con tijeras, y se digieren durante 10 minutos a 37°C con colagenasa (2,5 mg/ml; Sigma Tipo V, St. Louis, MO) en HBSS. El producto de digestión se lava tres veces con HBSS libre de calcio y magnesio que contiene 1 mmol/l de EDTA y albúmina de suero bovino al 0,5% (Sigma) (HBSS/EDTA), se digiere durante 10 minutos a 37°C con tripsina (25 µg; Boehringer) en HBSS/EDTA, y se lava cuatro veces en HBSS; el sedimento celular final se resuspende en medio F10 de HAM suplementado con 10 mmol/l de D-glucosa, 2 mmol/l de L-glutamina, 50 µmol/l de isobutimetilxantina, albúmina de suero bovino al 0,5%, 10 mmol/l de nicotinamida, 100 U/ml de penicilina, 100 ng/ml de estreptomina, y suero de rata de Lewis al 5% (no inactivado por calor). El tejido se pasa a través de una malla de 500 µm, se coloca en placas Petri no recubiertas con cultivo tisular y se incuban durante 48 horas a 37°C (CO₂ al 5%) antes del trasplante.

Se usa un vector de expresión que contiene el promotor de CMV y el gen de la β-galactosidasa para transfectar las células de Sertoli. Por ejemplo, pCMVbeta (disponible en Clontech, Palo Alto, CA) contiene el promotor del gen temprano de citomegalovirus humano, un intrón (donante de corte y empalme/aceptor de corte y empalme) y la señal de poliadenilación de SV40 junto con el gen de la beta-galactosidasa de *E. coli* de longitud completa con señales de traducción eucariotas. Como alternativa, se usa un vector de expresión constituido por el gen de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) bajo el control del promotor de SV40 (pCAT3, disponible en Promega, Madison, Wisconsin) para transfectar las células de Sertoli.

Después de aproximadamente dos a siete días en cultivo, las células de Sertoli se transfectan usando el método de lipofectina de Gibco/BRL (Rockville, Maryland) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. También puede usarse el método de fosfato cálcico acoplado con choque hiperosmótico (glicerol al 10%) como se describe en Whaley *et al.* (1995) *Endocrinology* 136: 3046-3053.

Después de la transfección, para seleccionar aquellas células de Sertoli transformadas por un vector de expresión, se emplea un ensayo apropiado. Por ejemplo, las células de Sertoli transfectadas con el gen de la CAT experimentan un ensayo de CAT que detecta derivados de cloramfenicol mono y diacetilados tal como el ensayo descrito en Gorman *et al.*, (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2 (9): 1044-1051. Los derivados de cloramfenicol pueden cuantificarse por formación de imágenes con fósforo.

Las células de Sertoli transfectadas con el gen lacZ se identifican detectando el resto galactosidasa escindido usando emisión de luz. Un luminómetro o contador de centello es lo más adecuado para este propósito. Las células de Sertoli transfectadas se siembran a 5 x 10⁵ células por placa. Las células se siembran por triplicado y la expresión se ensaya a los 0, 2, 4, 8, 12, 18, 28 y 42 días. Si la expresión es menor que la esperada, el vector de expresión puede alterarse incorporando el potenciador pCAT.

ES 2 338 076 T3

Después de la selección de las células con integración estable de la construcción genética, las células seleccionadas se dejan expandir en cultivo (aproximadamente 15-21 días) Después de la expansión, las células se recogen para el trasplante.

5 Ejemplo 2

Las células de Sertoli recogidas del Ejemplo 1 después se combinan y se trasplantan en una rata normal bajo el espacio subcapsular de riñón (renal). El protocolo de trasplante usado para trasplantar las células transfectadas de forma estable es el mismo que el usado para el trasplante de células del islote y células de Sertoli descrito en Rajotte *et al.* (1997) *Diabetes* 46: 317-322. Por ejemplo, cada receptor recibe de aproximadamente $5,5 \pm 0,3$ a $11 \pm 0,4 \times 10^6$ células de Sertoli transgénicas. Las células se aspiran en tubos de polietileno tal como PE-50, se sedimentan por centrifugación, y se colocan con cuidado bajo el espacio subcapsular renal izquierdo de animales anestesiados (por ejemplo, anestesiados con halotano). La cantidad de células de Sertoli transgénicas injertadas en cada animal se evalúa midiendo el contenido de ADN de alícuotas representativas por triplicado de cada preparación celular antes del trasplante, y los cálculos se basan en el hallazgo de que células testiculares recién aisladas contienen aproximadamente 20 pg de ADN por célula. Por lo tanto, el contenido de ADN total trasplantado por 20 pg de ADN por célula testicular es igual a la cantidad de células testiculares.

Una cantidad predeterminada de ratas experimenta el trasplante con las células de Sertoli alteradas genéticamente. Se realizan tanto isoinjertos (células de Sertoli, de rata Lewis, transformadas trasplantadas en ratas Lewis) como aloinjertos (células de Sertoli, de rata Lewis, transformadas trasplantadas en ratas Wistar-Furth). Como controles, ratas Lewis reciben tanto isoinjertos como aloinjertos de células de Sertoli sin transformar trasplantadas bajo la cápsula renal. También como control, se trasplantan islotes aislados de tejido pancreático de rata Lewis en receptores Wistar-Furth.

Una parte de las ratas con células de Sertoli trasplantadas se sacrifica para el examen histológico en diversos momentos puntuales después del trasplante. Los momentos puntuales después del trasplante son aproximadamente 5, 10, 15, 20, 30, 50 y 90 días. El examen histológico se realiza por triplicado en cada momento puntual.

El tejido renal que contiene los diferentes injertos se examina histológicamente usando tinción inmunohistoquímica, por ejemplo, para clusterina, para asegurar que las células de Sertoli aún son viables, es decir, no se han rechazado, y que la β -galactosidasa continúa produciéndose.

35 Ejemplo 3

Se transfectan células de Sertoli de rata Lewis con un vector retroviral constituido por el gen de la fosfatasa alcalina. El sistema RetroExpress[®], disponible en Clontech es especialmente útil. Después de la selección y la expansión descrita en el Ejemplo 2, las células de Sertoli transfectadas se trasplantan en ratas Wistar-Furth como se describe en el Ejemplo 2.

45 Ejemplo 4

Se aíslan células de Sertoli porcinas de forma similar a los métodos descritos en Korbitt *et al.* (1997) *Diabetes* 46: 317-322 y Selawry (1993) *Cell Transplantation* 2: 123-129. Se retiran los testículos de cerdos recién fallecidos con tijeras y fórceps. Los testículos se colocan en un vaso de precipitados que contiene aproximadamente 100 ml de solución salina equilibrada de Hank más CaCl_2 (HBSS, Life Technologies), suplementada con un antibiótico tal como gentamicina.

Un trozo del tejido testicular se retira de los testículos. Se retira la túnica albugínea del tejido dejando una alícuota más pequeña de aproximadamente 1,45 a 1,63 g. Se pica el parénquima con tijeras y se coloca entre aproximadamente 1,45 y 1,63 g de testículos en un tubo de centrifuga de 50 ml y la muestra se lava por centrifugación dos veces con solución de Hank + CaCl_2 . El volumen total para cada lavado es de 35 a 40 ml y la muestra se centrifuga a 1000 rpm durante aproximadamente tres minutos.

Se añaden 30 ml de solución de Hank más CaCl_2 al sedimento seguido de 33 mg de colagenasa. La muestra y el medio se transfieren a un matraz, se tapa con gasa estéril y papel de aluminio, y se coloca en un agitador/baño de agua a 37°C durante 15 minutos (programación del agitador aproximadamente 6,5). Las células se transfieren a un tubo de centrifuga de 50 ml y se lavan dos veces con solución de Hank más CaCl_2 . A las células se les añaden 400 μl de tripsina (solución madre de 2 mg/ml), 200 μl de DNasa (solución madre de 1 mg/ml), 40 ml de solución de Hank (SIN calcio o magnesio, Life Technologies). Las células y el medio se transfieren a un matraz y se coloca en un baño de agua con agitación durante diez minutos a 37°C. Las células y el medio después se transfieren a un tubo de centrifuga de 50 ml y se lavan tres veces con solución de Hank más CaCl_2 . Después del lavado final, se añaden 20 ml de Medio 199 (Sigma BioSciences, St. Louis, MO) más suero de caballo al 5% más antibióticos [en este documento mencionado como "Medio 199"] al tubo, el sedimento se resuspende y la suspensión se vierte a través de un recolector celular de 500 micrómetros en un vaso de precipitados. Se vierten 10 ml adicionales de Medio 199 sobre las células. El paso de

ES 2 338 076 T3

las células se facilita empujando suavemente con el émbolo de una jeringa de 10 ml. Se vierten 10 ml adicionales de Medio 199 sobre las células y se repite el proceso. Las células se diluyen adicionalmente con otros 10 ml de Medio 199 (volumen total = 50 ml). En este punto, puede colocarse una muestra bajo un microscopio de contraste de fases para confirmar la predominancia y la integridad de las células de Sertoli en la preparación.

5

Para estimar la cantidad de células en base a la correlación al contenido de ADN (véase el Ejemplo 2), se retiran 2 ml de suspensión celular a un tubo de centrífuga de plástico pequeño, se centrifuga a 2000 rpm durante diez minutos, se retira el medio, y el sedimento resultante se resuspende en el medio que queda en el tubo. La muestra puede colocarse en un congelador a -50°C antes del análisis de ADN.

10

A placas Falcon 1001 no adherentes o placas adherentes (Falcon 3003) se añaden 3 ml de suspensión celular y 12 ml de Medio 199. Además, se añaden 0,2 ml de antibiótico/antimicótico a cada placa. Las placas se colocan en una incubadora a 37°C y CO₂ al 2%. Las células se cultivan durante dos a siete días.

15

Como alternativa, el método descrito anteriormente se altera del siguiente modo. Después de la etapa de adición de 30 ml de solución de Hank + CaCl₂ al parénquima testicular picado, en lugar de añadir 33 mg de colagenasa, se añaden 30 mg de tripsina (de solución madre a 2 mg/ml) y 0,6 mg de DNasa (de solución madre a 1 mg/ml) y la suspensión se transfiere a un matraz tal como un matraz Erlenmeyer. El matraz se coloca en un baño de agua con agitación durante 30 minutos a 37°C. Después de esta etapa, la suspensión se transfiere a un tubo de centrífuga de 50 ml y las células se lavan tres veces con solución de Hank + CaCl₂. Las células se resuspenden en 40 ml de glicina 1 M + EDTA 2 mM que contiene inhibidor de tripsina de soja al 0,01% + 0,8 ml de DNasa. La suspensión se incuba durante diez minutos a temperatura ambiente. Después de la etapa de incubación, las células se lavan tres veces por centrifugación con solución de Hank + CaCl₂. Después de la última centrifugación, las células se suspenden en 40 ml de solución de Hank + CaCl₂ + 0,2 mg de DNasa (solución madre a 1 mg/ml) y 40 mg de colagenasa. La suspensión se transfiere a un matraz tal como un matraz Erlenmeyer y se agita en un baño de agua a 37°C durante diez minutos.

20

25

Después de transferir las células a un tubo de centrífuga de 50 ml, las células se lavan tres veces con solución de Hank. Se añaden treinta ml de Medio 199 al sedimento y las células se resuspenden y se vierten a través de un recolector celular de 500 micrómetros en un vaso de precipitados. El paso de las células se facilita empujando suavemente con el émbolo de una jeringa de 10 ml. Se vierten 20 ml adicionales de Medio 199 sobre las células y se repite el proceso. Las células se resuspenden en un volumen final de 50 ml y pueden examinarse bajo un microscopio de contraste de fases para la presencia e integridad de las células de Sertoli.

30

Para el análisis del contenido de ADN (véase el Ejemplo 2), se retiran 2 ml de suspensión celular a un tubo de centrífuga de plástico pequeño, se centrifuga a 2000 rpm durante diez minutos, se retira el medio y el sedimento resultante se resuspende en el medio que queda en el tubo. Las células se almacenan en un congelador a -50°C.

35

Placas no adherentes reciben 5 ml de células más 10 ml adicionales de Medio 199. Placas adherentes reciben 3 ml de células y 12 ml de Medio 199. Todas las placas reciben 0,2 ml de antibiótico/antimicótico y las placas se incuban a 37°C y CO₂ al 2%.

40

Las células de Sertoli porcinas se transfectan mediante el método de lipofectina con los vectores de expresión detallados en el Ejemplo 1 o mediante el sistema retroviral descrito en el Ejemplo 3. Las células de Sertoli porcinas transfectadas se trasplantan en el espacio subcapsular renal de ratas Wistar-Furth como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los injertos se ensayan como se ha descrito en el Ejemplo 2.

45

Ejemplo 5

Se alteran genéticamente células de Sertoli de ratón, de rata, y porcinas para que expresen el gen del factor IX humano. Las construcciones usadas para transfectar las células de Sertoli contienen el gen del factor IX humano bajo el control de un promotor tal como el promotor de CMV, el promotor del gen de la transferrina de rata, de ratón o porcina, el promotor del gen de la transferrina humana, el promotor del gen del FSHR de rata, de ratón o porcino, y el promotor del gen del FSHR humano.

50

Un vector de expresión que comprende un promotor que funciona en células de Sertoli de rata se une de forma funcional al ADNc para el ADNc del factor IX humano. El ADNc del factor IX humano se describe en Palmer *et al.*, 1989 *Blood* 73: 438-445. Inicialmente, se emplea el promotor de CMV. Las células de Sertoli de rata transfectadas se usan para el trasplante en ratas normales (controles) y en ratas deficientes del factor IX. Se ha desarrollado un modelo de ratón deficiente en factor IX para la terapia génica de la hemofilia B donde el gen del factor de coagulación IX (FIX) se ha alterado por recombinación homóloga. Wang, L. *et al.* 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 94 (21): 11563-11566. Se repite el mismo experimento usando células de Sertoli de cerdo en lugar de células de Sertoli de rata seguido de su trasplante en ratas. En un tercer experimento, se usan promotores específicos de células de Sertoli tales como los de los genes de la transferrina, la clusterina, o el receptor de FSH de rata unidos de forma funcional al ADNc para el factor IX humano para transfectar células de Sertoli de rata seguido de su trasplante en ratas. En un cuarto experimento, se usan promotores específicos de células de Sertoli tales como los de los genes de la transferrina, la clusterina, o el receptor de FSH de rata unidos de forma funcional al ADNc para el factor IX humano para transfectar células de Sertoli porcinas seguido de su trasplante en ratas.

55

60

65

ES 2 338 076 T3

Después del trasplante, el injerto se examina a intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 20, 30, 50, y 90 días y se ensaya para la producción de factor IX por inmunohistoquímica como se describe en Wang, L., 1997 *supra*.

Ejemplo 6

5

Las ratas Gunn son incapaces de la conjugación de la bilirrubina debido a un defecto genético en la UDP-glucuroniltransferasa. Como resultado, las ratas Gunn pueden usarse como modelo de deficiencia enzimática congénita para ensayar la actividad metabólica de células trasplantadas. Seppen J., *et al.*, 1997 *Hum. Gene Ther.* 8 (1): 21-36.

10

En este experimento, se transfectan células de Sertoli de ratón, de rata y porcinas con una construcción génica que tiene el gen de la bilirrubin UDP-glucuronosiltransferasa (B-UGT) (Seppen, J. 1997 *supra*) bajo el control de un promotor que funciona en ratas tal como el de los genes de la transferrina, la clusterina o el receptor de FSH de rata y se trasplantan en ratas Gunn.

15

Después de hallar células de Sertoli que expresan B-UGT que glucuronidan bilirrubina presentes en el medio de cultivo celular, las células se trasplantan bajo la cápsula renal y/o la cápsula hepática de ratas Gunn. Los animales que muestran una deficiencia en B-UGT corregida por el trasplante de células de Sertoli se detectan por la presencia de concentraciones séricas normales de bilirrubina y glucurónidos de bilirrubina en la bilis.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio del mismo y en el que dichas células de Sertoli crean un sitio inmunológicamente privilegiado para la producción de un medicamento para tratar una enfermedad en un sujeto causada por una deficiencia del factor biológico.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un mamífero.
- 10 3. El uso de la reivindicación 2, en el que dicho mamífero es un ser humano.
4. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho factor biológico es una hormona.
- 15 5. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho factor biológico es la insulina y dicha enfermedad es la diabetes mellitus.
6. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho factor biológico es el factor IX y dicha enfermedad es la hemofilia B.
- 20 7. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho factor biológico es la B-UGT y dicha enfermedad es la enfermedad de Crigler-Najjar (CN).
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho agente o medicamento tiene que introducirse en dicho sujeto por trasplante.
- 25 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichas células de Sertoli tienen que introducirse en dicho individuo en una dosificación que varía de 10^5 a 10^{10} células.
10. El uso de la reivindicación 8, en el que dicho trasplante es por xenoinjerto.
- 30 11. El uso de la reivindicación 8, en el que dicho trasplante es por aloinjerto.
12. Una composición farmacéutica que comprende células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio del mismo mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que dicho factor biológico es una hormona.
14. Un kit compartimentado que comprende un primer recipiente adaptado para contener células de Sertoli alteradas genéticamente para producir un factor biológico o intermedio del mismo.
- 40 15. El kit compartimentado de la reivindicación 14 que comprende adicionalmente un segundo recipiente adaptado para contener un vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la que las células de Sertoli comprenden células de Sertoli primarias.
- 45 17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la que las células de Sertoli comprenden una línea celular de Sertoli.
- 50
- 55
- 60
- 65