

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 008**

51 Int. Cl.:
A01N 65/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06803714 .2**
96 Fecha de presentación: **14.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1928249**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **Macroperlas que contienen células secretoras que comprenden agarosa Seakem Gold, y sus usos**

30 Prioridad:
26.09.2005 US 720917 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2012

73 Titular/es:
**THE ROGOSIN INSTITUTE, INC.
21 MAIN STREET, 2ND FLOOR
HACKENSACK, NJ 07601, US**

72 Inventor/es:
**GAZDA, Lawrence y
SMITH, Barry**

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 379 008 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

Macroperlas que contienen células secretoras que comprenden agarosa Seakem Gold, y sus usos

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes provisionales Serie nº 60/629.227, presentada el 17 de noviembre de 2004, y Serie nº 60/720.917, presentada el 26 de septiembre de 2005.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere a métodos para mejorar la calidad y cantidad de macroperlas de agarosa que contienen células secretoras revestidas con agarosa. Esto se logra vía el uso de agarosa Seakem Gold descrita *más abajo*.

ANTECEDENTES Y TÉCNICA ANTERIOR

10 Ahora se ha confirmado que la terapia de sustitución de islotes es un enfoque viable para el tratamiento de pacientes con diversos trastornos. Estos incluyen pacientes con cáncer que sufren evisceración abdominal superior (Tzakis, et al., *Lancet* 336: 402-405 (1990)); pancreatitis (Clayton, et al., *Transplantation* 76: 92-98 (2003); Farney, et al., *Surgery* 110: 427-437 (1991); Fontes, et al., *Transplant Proc* 24: 2809 (1992); Obenholzer, et al., *Transplantation* 69: 1115-1123 (2000); Robertson, et al., *Diabetes* 50: 47-50 (2001)), y pacientes insulino dependientes, en los que el
15 trasplante de islotes es una opción terapéutica (Goss, et al., *Transplantation* 74: 1761-1766 (2002); Ricordi, et al., *Transplantation* 75: 1524-1527 (2003); Ryan, et al., *Diabetes* 50: 710-719 (2001); Shapiro, et al., *N. Engl. J. Med* 343: 230-238 (2000)).

Debido a la utilidad de los islotes en terapia, como se indica *más arriba*, hay por supuesto interés a la hora de
20 desarrollar formas para aislarlos. Aunque hay muchos informes sobre el aislamiento de islotes usando el método automatizado (Brandhorst, et al., *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes* 103 Supl. 2: 3-14 (1995); Cui, et al., *Cell Transplant* 6: 48-54 (2001); Marchetti, et al., *Transplantation* 52: 209-213 (1991); Miyamoto, et al., *Cell Transplant* 7: 397-402 (1998); Nielsen, et al., *Comp. Med.* 52: 127-135 (2002); Swanson, et al., *Hum. Immunol* 62: 73 9-749 (2001); Toomey, et al., *Brit. J. Surg.* 80: 240-243 (1993); Toso, et al., *Cell Transplant* 9: 297-305 (2000); Wennberg, et al., *Transplant. Proc.* 33: 2537 (2001)), el aislamiento de islotes sigue siendo notoriamente difícil. Por ejemplo, Bosta, et al.,
25 *J. Investig Med* 43: 555-566 (1995); Krickhahn, et al., *Cell Transplant* 11: 827-838 (2002); Krickhahn, et al., *Ann Transplant* 6: 48-54 (2001), O'Neil, et al., *Cell Transplant* 10: 235-246 (2001), y White, et al., *Horm. Metab. Res* 31: 579-524 (1999), discuten problemas con respecto a esto.

La fabricación de microperlas que contienen células secretoras y/u orgánulos, tales como células cancerosas, islotes, etc., es bien conocida. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 6.818.230; 6.808.705; RE 38.027; 30 6.303.151; 6.224.912; 5.888.497, y 5.643.569, así como la solicitud de patente U.S. publicada 2005/0096561, todas las cuales se incorporan como referencia.

La agarosa se usa para encapsular los materiales biológicos en estos documentos de patente, después de lo cual las estructuras resultantes se encapsulan adicionalmente con una segunda capa de agarosa.

35 Aquellos familiarizados con la agarosa reconocerán que hay muchos tipos y variedades de este material disponibles. Seakem Gold, uno de tales tipos de agarosa, se describe en la patente U.S. nº 4.983.268, cuya descripción se incorpora como referencia.

Existe una necesidad continua de versiones mejoradas de los materiales descritos primeramente en las patentes y en la solicitud expuestas *más arriba*. Ahora se ha encontrado que la agarosa Seakem Gold da como resultado un producto que es inesperadamente superior a los productos de la técnica anterior.

40 Los detalles de la invención se exponen en la descripción que sigue:

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

La Figura 1 da información sobre los niveles de glucosa diaria media para animales de ensayo y de control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS**EJEMPLO 1**

45 Se aislaron islotes según la metodología expuesta en Gazda, et al., publicada en la Solicitud de Patente 2006/0121445, publicada el 8 de junio de 2006, Serie Número 11/273.737, que se incorpora como referencia en su totalidad. Sin embargo, se debería de mantener en mente que son posibles y se pueden usar otras metodologías para aislar islotes, ya que la invención no depende del método de aislamiento particular.

Tras el aislamiento y evaluación, los páncreas adecuados se procesaron posteriormente. Se eliminó la grasa y el

tejido conectivo de las glándulas, y después el conducto pancreático principal se canuló con una aguja de extremo romo de 16 g, de acero inoxidable. Se perfusionó una disolución de HBSS que contiene colagenasa P, a una concentración de 1,5-2,0 g/l, a una velocidad de 50 ml/mm, a 30°C, para proporcionar 2 ml de disolución por gramo del peso del páncreas.

- 5 El páncreas se cubrió entonces con 500 ml de HBSS y PS al 2%, junto con 200 ml de disolución de colagenasa, a 30°C. La circulación externa de agua a 39°C calentó lentamente el órgano hasta 37°C, y mantuvo la temperatura del digestato a 36-37°C. Cuando los órganos parecieron disociados, y ofrecieron poca resistencia a la presión manual (después de un tiempo total de alrededor de 10-20 minutos, y 5-10 minutos después de alcanzar 37°C), se detuvo la digestión.
- 10 El digestato recogido se centrifugó entonces, los sobrenadantes se aspiraron, y el pelete resultante se suspendió en PS al 10% y una disolución conservante de órganos. Los islotes se purificaron entonces en Ficoll discontinuo, con gradientes de densidad de 1,105, 1,095, 1,085 y 1,05 g/cm³, HBSS más PS al 2%, en tubos de 50 ml. Los tubos se centrifugaron a 650 g a 4°C y se recogieron las capas que contenían islotes, y se lavaron tres veces en HBSS más PS al 10%, después de lo cual se purificaron a mano del tejido sin islotes con la ayuda de un microscopio de disección. Los islotes se suspendieron de nuevo, y se usaron dos muestras de 0,5 ml para contar el rendimiento de los islotes.

El rendimiento medio de diez páncreas ensayados fue 130.000 NIE (número de islotes equivalentes), con una media de 1.101 NIE por gramo de tejido digerido. La pureza, en todos los casos, fue alrededor de 90%. Para 9 de los órganos, la viabilidad de los islotes fue mayor que 89%.

20 **EJEMPLO 2**

Después de aislamiento de los islotes, se determinaron varios parámetros, incluyendo la pureza y la viabilidad, como se menciona *más arriba*.

La pureza se evaluó tiñendo alrededor de 500 NIE con DTZ, durante diez minutos, y luego se llevó a cabo un análisis de imágenes estándar usando un microscopio de disección y una cámara digital.

- 25 La viabilidad se determinó tiñendo una muestra con diacetato de fluoresceína (FDA) y bromuro de etidio (EB). Para la elaboración, se añadieron alrededor de 500 NIE a 1 ml de RPMI, PS al 10%, y antibiótico/antimitótico ("A/A") al 1%. Entonces, se añadieron 20 µl de la tinción de FDA, que se había preparado con 10 mg de FDA y 1 ml de acetona, y 200 µl de EB, que se había preparado con 30 µl de EB y 1 ml de PBS. Los islotes se tiñeron, en la oscuridad, durante siete minutos, y luego se visualizaron y se fotografiaron muestras aleatorias de 10-50 islotes con un microscopio fluorescente, para determinar la viabilidad usando un análisis de imágenes estándar.

También se midió el contenido de insulina de los islotes, colocando aproximadamente 500 NIE en disolución de extracción alcohólica ácida (7,2 ml de HCl 1N, 400 ml de etanol desnaturalizado al 100%). Las muestras se almacenaron a -20°C, y se llevó a cabo un RIA de insulina.

Tabla 1

| Lote nº | Contenido de insulina (µu/500EIN) |
|---------|--------------------------------------|
| W1561 | 338,66 |
| 02109 | 1288,69 |
| Y8641 | 775,37 |
| 037360 | 402,59 |
| 0786 | 184,40 |
| Y8587 | 669,92 |
| W1102 | 590,05 |
| W1524 | ND |
| 039820 | ND |
| R2027 | 474,55 |

EJEMPLO 3

Éste, y los ejemplos que siguen, abordan la pregunta de si se pueden usar en macroperlas los islotes identificados como útiles y aislados como se describe.

- 5 Los islotes purificados se suspendieron de nuevo en RPMI1640 + PS al 10% + A/A al 1%, en un volumen de 2000 NIE/ml. Los islotes se distribuyeron uniformemente en tubos, de modo que cada tubo contuviera 1 ml de la suspensión a 2000 NIE.

Después de sedimentar por gravedad, los sobrenadantes se eliminaron, y se añadieron a cada muestra 0,5 ml de 1,5% de agarosa Seakem Gold, a 50°C, preparada en medio esencial mínimo más tampón HEPES al 2,5%, y se mezcló cuidadosamente. La suspensión se expulsó entonces por debajo de aceite mineral estéril, para preparar cuatro perlas con superficies lisas y distribuciones iguales de islotes.

Las macroperlas se retiraron, y se lavaron dos veces (RPMI + PS al 5% + A/A al 1%). Estas macroperlas se cultivaron en la misma disolución, en una atmósfera de CO₂ al 5% humedecida, durante 5-7 días, después de lo cual se lavaron, tres veces, en RPMI + A/A al 1%, seguido de la aplicación de una segunda capa de agarosa. Para esto, se transfirieron 0,5 ml de agarosa al 5% en MEM, más tampón HEPES a 60°C, vía una pipeta, a una cuchara de plástico estéril, y cada macroperla se hizo girar 3-5 veces para producir un segundo revestimiento uniforme de agarosa. Después de transferir a aceite mineral estéril para producir una superficie lisa, las macroperlas se retiraron, se lavaron dos veces en RPMI + PS al 2,5% + A/A al 1%, y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% humedecido más aire.

Se determinó que las macroperlas que contenían los islotes encapsulados permanecían viables durante más de 6 meses, en cuyo tiempo los radioinmunoensayos revelaron que siguieron produciendo buenos niveles de insulina.

EJEMPLO 4

Este ejemplo describe experimentos que demuestran la capacidad de los islotes porcinos para funcionar *in vivo*.

Se usaron ratones CB17-PrKdc <scid>/J diabéticos machos, no obesos, de 7-9 semanas. Después de una semana de aclimatación, los animales recibieron 275 mg/kg de estreptozotocina, que induce la diabetes. Nueve días más tarde, cuando sus niveles de glucemia tenían una media de más de 480 mg/dl, se comenzó la terapia con insulina.

En el día 34-35 después de la administración de estreptozotocina, los animales recibieron aproximadamente 1000 NIE de islotes porcinos, que se trasplantaron en un coágulo de sangre, según Bowen, et al., *Aust J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58:441-447 (1980), incorporado como referencia. Brevemente, los islotes se pelletizaron de la suspensión y se aspiraron los medios. Entonces, se extrajeron alrededor de 5-10 µl de sangre del animal, se añadieron a los islotes, y se permitió que coagulara. Los animales receptores se anestesiaron con volúmenes iguales de quetamina (167 mg/dl), xilazina (33 mg/ml) y disolución salina. La mezcla se administró subcutáneamente, a una dosis de 0,5 ml/100 g. Se hizo una pequeña incisión en el lado izquierdo para exponer el riñón y se usó un microscopio de disección para hacer una pequeña incisión en la cápsula del riñón. La cápsula se separó entonces del riñón, los islotes/coágulo se colocaron bajo la cápsula, se cerró la incisión, y se dejó que los animales se recuperaran.

Se realizaron nefrectomías en los animales, 38-39 días después del trasplante. De forma breve, después de la anestesia, se expuso el riñón que llevaba el injerto, los vasos sanguíneos renales se ligaron, y se quitó el riñón de cada animal. Cinco días más tarde, los animales se sacrificaron, y los páncreas se recogieron para una confirmación histológica de la destrucción completa de células beta de los islotes.

Las muestras de tejido se colocaron en formación tamponada neutra al 10%, durante 24 horas, y luego se transfirieron a alcohol etílico al 70%.

Después de esto, los tejidos se embebieron en parafina y se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina y eosina. El páncreas y las secciones de riñón injertadas se tiñeron para insulina, y después se estudiaron las células que contenían glucagón, usando métodos estándar.

Todos los ratones se volvieron normoglucémicos después del injerto de los islotes. Después de la nefrectomía, todos los ratones se hicieron hiperglucémicos, en cuatro días.

EJEMPLO 5

Este ejemplo describe experimentos que se diseñaron para determinar el grado en el que las perlas de agarosa revestidas con agarosa, hechas de diferentes agarosas, provocaron reacción tisular, es decir, inflamación, en los animales receptores.

Se usaron dos razas de ratas, es decir, ratas Wistar y Sprague Dawley. Se ensayó un total de 29 ratas (14 Wistar,

ES 2 379 008 T3

15 Sprague Dawley). Se usaron tres ratas de cada raza para ensayar las perlas de agarosa Seakem Gold revestidas de agarosa de la invención. Se usaron tres de cada raza para ensayar tipos de agarosa FMC HGT(P) y Amresco. Para ensayar agarosa Sigma HV, se usaron dos ratas Wistar, así como cuatro ratas Sprague Dawley. Finalmente, para ensayar perlas de agarosa Sigma LV, se usaron tres ratas Wistar, como lo fueron dos ratas Sprague Dawley.

- 5 Se implantó un total de 60 perlas vacías de cada tipo en las cavidades peritoneales de las ratas, con dos excepciones. Dos ratas Sprague Dawley recibieron 54 ó 59 perlas de agarosa Sigma HV. Las ratas se observaron durante 3 meses, y después se sacrificaron. Se retiraron diversos órganos para estudiar la inflamación (bazo, hígado, riñón, músculo esquelético, páncreas, y mesenterio).

- 10 Los tejidos se evaluaron según la inflamación usando estándares aprobados por la American College of Veterinary Pathology. La evaluación usó una escala de 6 puntos para evaluar la inflamación, esencialmente según lo siguiente:

0 = normal

1 = mínima (inflamación menor de 10%)

2 = leve (inflamación de 10-25%)

3 = moderada (inflamación de 25-50%)

- 15 4 = notable (inflamación de 50-75%)

5 = severa (inflamación más de 75%)

Los tejidos para cada animal se evaluaron, y después se promediaron. Los resultados aparecen más abajo:

Puntuaciones medias de gravedad por tejido

| Wistar | | | | | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Invención | FMC HGT(P) | Sigma HV | Amresco | Sigma LV |
| Bazo | 1,0 | 1,7 | 1,3 | 1,0 | 0,7 |
| Hígado | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 1,0 | 0,7 |
| Riñón | 0,3 | 0,7 | 0,3 | 0,5 | 0,7 |
| Músculo esquelético | 0,5 | 1,3 | 1,7 | 0,0 | 2,5 |
| Páncreas | 1,7 | 1,7 | 1,3 | 2,5 | 2,0 |
| Mesenterio | 2,3 | 3,0 | 2,0 | 2,5 | 3,3 |
| TOTAL | 5,8 | 8,7 | 6,9 | 7,5 | 9,9 |
| Puntuación Global | 19 | 36 | 25 | 24 | 20 |

- 20 Puntuaciones medias de gravedad por tejido

| Sprague Dawley | | | | | |
|---------------------|-----------|----------|----------|---------|----------|
| | Invención | FMC HGTP | Sigma HV | Amresco | Sigma LV |
| Bazo | 1,3 | 2,0 | 2,3 | 2,3 | 2,0 |
| Hígado | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| Riñón | 1,0 | 0,7 | 1,0 | 1,3 | 0,0 |
| Músculo esquelético | 1,3 | 1,0 | 1,5 | 1,5 | 1,0 |
| Páncreas | 1,7 | 1,3 | 1,7 | 2,3 | 1,0 |
| Mesenterio | 2,3 | 3,0 | 3,0 | 2,3 | 1,5 |

| | | | | | |
|-------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| TOTAL | 7,6 | 8,0 | 10,2 | 9,7 | 5,5 |
| Puntuación Global | 15 | 24 | 29 | 22 | 27 |

Suma de las puntuaciones medias de gravedad para cada raza

| Wistar + Sprague Dawley | | | | | |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Invencción | FMC HGTP | Sigma HV | Amresco | Sigma LV |
| Bazo | 2,3 | 3,7 | 3,7 | 3,3 | 2,7 |
| Hígado | 0,0 | 0,3 | 1,0 | 1,0 | 0,7 |
| Riñón | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,8 | 0,7 |
| Músculo esquelético | 1,8 | 2,3 | 3,2 | 1,5 | 3,5 |
| Páncreas | 3,3 | 3,0 | 3,0 | 4,8 | 3,0 |
| Mesenterio | 4,7 | 6,0 | 5,0 | 4,8 | 4,8 |
| TOTAL | 13,6 | 16,6 | 17,2 | 17,2 | 15,4 |
| Puntuación Global | 34 | 60 | 54 | 46 | 47 |

Las perlas de agarosa revestidas de agarosa de la invención fueron claramente las menos inflamatorias.

- 5 Se llevaron a cabo estudios adicionales de inflamación en perros, comparando las perlas de la invención con perlas hechas de agarosa FMC HGT(P) (agarosa FMC HGTP), y revestidas con ella. Nuevamente, las perlas de agarosa revestidas con agarosa de la invención fueron menos inflamatorias.

10 En un estudio adicional, los perros recibieron perlas de agarosa revestidas con agarosa de la invención, que contenían islotes porcinos. Los animales se sacrificaron después de 2,5 años, y sólo se observó una mínima inflamación. En comparación con animales de control sin implante, el peritoneo y el mesenterio parecían notablemente normales.

EJEMPLO 6

En estos experimentos, las macroperlas de agarosa Seakem Gold que contienen islotes, que se habían cultivado *in vitro*, se compararon con macroperlas de control (vacías).

- 15 Se prepararon islotes encapsulados en agarosa Seakem, como se describe en el Ejemplo 3, *más arriba*.

Como animales, se usaron doce ratas BB macho, espontáneamente diabéticas. Todos los animales tenían 10-15 semanas, y habían mostrado signos de diabetes clínica durante 3-16 días.

20 A los 20-21 días después de llegar, las ratas BB se anestesiaron con quetamina/xilacina/NaCl, administrado subcutáneamente, a una dosis de 2,2-2,3 ml/kg de peso corporal. Después de anestesiarnos, los animales recibieron un implante de macroperlas que contienen islotes, a una dosis equivalente a 1,0 veces la necesidad diaria de insulina, o un número comparable de macroperlas vacías.

25 Tras el implante, se observó a los animales, registrándose observaciones clínicas diarias, que incluyen el estado general (bueno, aceptable, o malo), peso corporal, glucemia, glucosuria, y cetonuria. Se recogieron muestras de suero a lo largo del estudio, para ser usadas para determinar insulina, glucagón, y péptido C porcino. Para medir estos parámetros, se usaron radioinmunoensayos. También se llevaron a cabo ensayos de tolerancia intraperitoneal a la glucosa.

Noventa y siete días después del implante, se llevaron a cabo necropsias completas en los animales. Los animales se anestesiaron y se desangraron, y se expusieron las cavidades peritoneales.

30 A lo largo del período de 97 días del estudio, los seis animales que habían recibido las perlas de agarosa Seakem que contienen islotes no necesitaron la administración de insulina. Esto contrasta con los animales que recibieron macroperlas vacías. A estos animales se les administró insulina exógena, empezando dos días después del

comienzo del estudio, debido a que los niveles de glucemia aumentaron hasta 300-500 mg/dl. Dos de estos animales de control fueron encontrados muertos en el tercer día del estudio, presumiblemente debido a deficiencia de insulina.

5 Los niveles de glucemia diaria media fueron significativamente menores en los animales que recibieron las perlas de agarosa Seakem que contienen islotes, en comparación con los controles. También, los seis animales de ensayo mostraron un intervalo muy estrecho de desviaciones de glucemia diaria, incluso sin terapia con insulina.

10 Después de un mes, estos animales que habían recibido los islotes se hicieron moderadamente hiperglucémicos, pero mostraron excursiones glucémicas limitadas (alrededor de 100 mg/dl). Esto contrasta con los controles, que mostraron una variación extrema, de aproximadamente 400-500 mg/dl, a pesar de la administración de 2-3 U/día de insulina exógena.

15 Se llevaron a cabo ensayos iniciales de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en todos los animales, a fin de confirmar el diagnóstico clínico de diabetes tipo I. Este ensayo también se llevó a cabo 8 y 90 días después de los trasplantes. Cinco días antes de los trasplantes, no era evidente una respuesta a la exposición a la glucosa, pero en el octavo día después del trasplante los receptores de las macroperlas que contienen islotes mostraron una respuesta acusada a la exposición a la glucosa, es decir, una elevación inicial en la glucemia, seguido de una vuelta a la normoglucemia. Igualmente, la hiperglucemia no se inhibió en animales que habían recibido las macroperlas vacías, a pesar de la terapia con insulina concurrente, como se describe *más arriba*. A los 90 días después del implante, se llevó a cabo otro ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. La glucemia del valor inicial se restableció nuevamente para ratas que habían recibido las macroperlas con los islotes, pero los niveles de glucemia de partida fueron considerablemente mayores, es decir, aproximadamente 400 mg/dl. Las ratas que habían recibido macroperlas vacías no pudieron restablecer la glucemia del valor inicial.

20 Los ensayos para determinar el péptido C porcino no detectaron el péptido en los animales del estudio antes del implante, o en receptores de macroperlas vacías. Por el contrario, el péptido se detectó de forma normal en el suero de ratas implantadas con macroperlas que contienen islotes, a un nivel medio de 0,880 a 0,249 ng/ml a los 21 días después del implante, y a 0,662 a 0,160 ng/dl al final del estudio.

25 Los animales del estudio también se evaluaron para determinar la glucosuria, cetonuria, y la necesidad de administrar bicarbonato. No hubo diferencias significativas antes del implante; sin embargo, después de éste, los receptores con macroperlas con islotes experimentaron episodios significativamente menores de glucosuria (37 de 56 muestras, frente a 67 de 81) y cetonuria (20 de 64 muestras, frente a 32 de 54). La necesidad de terapia con bicarbonato también se redujo significativamente (2 tratamientos, frente a 26).

EJEMPLO 7

Los experimentos a continuación demuestran que las macroperlas con agarosa Seakem que atrapan islotes se pueden cultivar *in vitro* durante períodos de tiempo prolongados, y todavía siguen siendo funcionales.

35 En estos experimentos, se usó un conjunto de 12 ratas BB diabéticas, que satisficieron los mismos criterios que las ratas en el Ejemplo 6 *más arriba*, así como se usaron 23 ratas Wistar-Furth, de 7 semanas. Este segundo grupo de ratas sirvió como controles normales.

A cinco de estas ratas Wistar-Furth se les inyectó, a través de la vena de la cola, 65 mg/kg de estreptozotocina, para inducir diabetes. Cuando se observaron dos lecturas de glucemia consecutivas > 500 mg/dl, las ratas comenzaron a recibir terapia con insulina, como se describe *más abajo*.

40 Los animales se anestesiaron 20-21 días después de su llegada, usando una dosis de 0,1 ml/100 g de quetamina (60 mg/ml)/xilazina (6 mg/ml)/butarfenol (3 mg/ml), administrada intramuscularmente.

45 Tras la anestesia, todas las ratas BB recibieron perlas de agarosa Seakem que contienen islotes, como se describe *más arriba*. Las ratas se dividieron en tres grupos de 4, y recibieron macroperlas que se habían cultivado *in vitro* durante 9 semanas, 40 semanas, o 67 semanas. La cantidad de macroperlas administradas fue equivalente a 1,0x la necesidad de insulina diaria del animal.

Cinco de las ratas Wistar-Furth recibieron macroperlas que se habían cultivado *in vitro* durante 7,8-11,5 semanas, a la misma dosis que las ratas BB. Esto es aproximadamente 45-49 macroperlas por rata Wistar-Furth, y 56-60 por rata BB.

50 Durante los experimentos, las ratas ganaron, de media, aproximadamente 75 g. Como resultado, en el día 97 tras el primer implante, se llevó a cabo un implante suplementario en ratas BB. La necesidad media de insulina antes del implante para las ratas fue 0,0083 U de insulina/g de peso corporal. Este valor condujo a un cálculo de que se necesitaban 17 macroperlas adicionales que contienen islotes para producir 39,19 mU de insulina por 24 horas. Como se explica *más abajo*, debido a que se retiraron 4 perlas de cada rata antes del segundo implante, se

administraron 21 macroperlas, cultivadas durante 19 días. Las ratas Wistar-Furth no recibieron un segundo implante.

Los diversos ensayos llevados a cabo en el Ejemplo 7 se llevaron a cabo aquí igualmente, usando los mismos métodos.

5 A los 201-202 días después del implante, se llevaron a cabo necroscopias completas, también como se describe *más arriba*.

10 En la figura 1 se muestran los niveles de glucemia diaria media. Tras el implante, la normogluemia (100-200 mg/dl) se restauró durante aproximadamente un mes en todas las ratas BB. Después de esto, se desarrolló hipergluemia moderada (200-400 mg/dl) en las ratas BB, y ésta persistió durante el resto del estudio. El desarrollo de hipergluemia moderada y el logro del peso corporal máximo se produjo contemporáneamente. El peso corporal permaneció consistente, mientras que los niveles de glucemia fluctuaron entre 300-400 mg/dl durante el resto del estudio. No se observaron diferencias en los niveles de glucemia diaria media entre los tres grupos de ratas que recibieron macroperlas de Seakem Gold que contienen islotes, independientemente de la duración del tiempo de cultivo *in vitro* para las perlas.

15 Las ratas Wistar-Furth, en las que se indujo diabetes, también presentaron normogluemia durante alrededor de un mes, después de lo cual se observó una hipergluemia moderada.

Se observó, *más arriba*, que tuvo lugar un segundo implante en ratas BB 97 días en el estudio. Este segundo implante no impactó en los valores de glucemia diaria.

20 También se evaluó el péptido C porcino, y se detectó en los 3 grupos de ratas BB. Durante los primeros 88 días de los experimentos, el nivel de péptido C porcino medio disminuyó desde 0,6-0,9 ng/ml hasta 0,2-0,4 ng/ml. En el día 116, tras el segundo implante, los niveles de péptido aumentaron hasta una media de 0,3-0,7 ng/ml, observándose un incremento de 40 veces en el fluido peritoneal en la necroscopia.

25 Se llevaron a cabo procedimientos de exposición a la glucosa a lo largo del período del estudio en todas las ratas que habían recibido implantes de macroperlas que contienen islotes. No se observaron diferencias en la capacidad de las macroperlas, cultivadas durante períodos de tiempo diferentes, para responder a la exposición a la glucosa tras el implante. Con mayor detalle, los niveles de glucemia de todas las ratas BB se duplicaron aproximadamente, desde el valor inicial de 100-200 mg/dl. La vuelta a la glucemia del valor inicial se produjo en 120 minutos en 10 de los 12 animales. Esta respuesta fue similar a la observada en animales Wistar-Furth normales.

30 Todos los animales del estudio se hicieron con el tiempo moderadamente hiperglucémicos, pero una exposición a la glucosa, en el día 105 después del transplante, mostró una elevación inicial en la glucemia, y después una vuelta a la glucemia del valor inicial. A los 200 días, tras el implante, sólo hubo un ligero incremento en la glucemia del valor inicial tras la administración de glucosa, y después una vuelta a la glucemia del valor inicial.

35 Los resultados en estos estudios, cuando se comparan con el trabajo de Jain et al., en Transplantation, *más arriba*, muestran que las perlas de agarosa que contienen islotes, en las que la agarosa es Seakem Gold, fueron inesperadamente mejores que las dadas a conocer por Jain et al. Por ejemplo, el 40% de los animales murieron hacia el día 200 en el informe de Jain et al., mientras que la tasa de mortalidad con las macroperlas de la invención fue cero. Además, los resultados logrados aquí se obtuvieron usando la mitad de las macroperlas dadas a conocer por Jain et al. Además, en resultados no ampliados aquí, tras la necroscopia, se determinaron los niveles de producción de insulina de las macroperlas recuperadas, y fue sustancialmente mayor que el de las macroperlas recuperadas tras la necroscopia, como se da a conocer por Jain et al.

40 **EJEMPLO 8**

Se llevaron a cabo experimentos para comparar la resistencia de las perlas de la invención frente a perlas obtenidas y revestidas con agarosa FMC HGT(P).

45 En estos ensayos, se colocaron individualmente perlas en un dispositivo de compresión, que tiene una plancha superior e inferior. La plancha superior se hizo mover hacia abajo, a una velocidad de 12 pulgadas por minuto (30,48 centímetros por minuto) y las perlas se comprimieron hasta que se rompieron. Se determinó la fuerza de la compresión (compresión máxima) en lbf.

para HGT(P), la compresión máxima osciló desde 0,714 lbf hasta 3,183 lbf, con una media de 1,958, y una desviación estándar de 0,5444. Para los productos de la invención, el intervalo fue 2,322 lbf a 6,418 lbf, con una media de 4,282, y una desviación estándar de 1,096.

50 Claramente, las perlas de la invención fueron más resistentes que las de otras perlas revestidas con agarosa-agarosa.

Los ejemplos anteriores describen diversas características de la invención, que se refieren a las macroperlas de

agarosa que contienen células secretoras, revestidas con agarosa, en las que la agarosa usada es agarosa Seakem Gold.

5 Como se expone aquí, el término "macroperla" se refiere a una estructura que es esencialmente esférica, con un diámetro desde alrededor de 4 hasta alrededor de 10-12 mm, lo más preferible desde alrededor de 6 hasta alrededor de 8 mm de diámetro. La segunda capa de agarosa tiene preferiblemente un grosor de alrededor de 0,05 a alrededor de 5 mm, más preferiblemente un grosor de alrededor de 0,5 mm a alrededor de 5 mm, incluso más preferiblemente de alrededor de 1,0 a alrededor de 3 mm, y lo más preferible un grosor de alrededor de 1,0 a alrededor de 2,0 mm. La segunda capa de agarosa puede ser, aunque no es necesario, agarosa Seakem Gold.

10 "Macroperlas" se usa como una estructura preferida; sin embargo, cualquier estructura de agarosa sólida que encapsule células secretoras, y esté revestida preferiblemente con una segunda capa de agarosa, es una característica de la invención.

15 Las células secretoras pueden variar. Se puede encapsular cualquier célula u orgánulo que produzca un producto secretor deseable. Los islotes, células cancerígenas, y células madre son ejemplos de los tipos de materiales que pueden ser usados de esta manera. Cada perla puede contener un número variable de orgánulos celulares; para islotes, por ejemplo, desde alrededor de 50 hasta alrededor de 5000 islotes, más preferiblemente desde alrededor de 100 hasta alrededor de 2500 islotes, incluso más preferiblemente desde alrededor de 250 hasta alrededor de 1000, y lo más preferible desde alrededor de 475 hasta alrededor de 550 islotes. Se prefiere muy especialmente alrededor de 500 islotes.

Otros aspectos de la invención serán claros para el experto, y no es necesario ampliarlos adicionalmente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una perla de agarosa que contiene células secretoras, revestida con agarosa, que comprende:
- 5 (a) suspender células secretoras en una primera agarosa, en el que dicha primera agarosa tiene un contenido de sulfato menor que 0,2% en peso pero mayor que cero, un contenido de piruvato de 0-0,1% en peso, un contenido de nitrógeno de 0-0,2% en peso, y forma un gel que tiene una resistencia de gel a una concentración de 1,0% en peso de al menos 1200 g/cm², ausencia sustancial de unión a ADN en tampón de tris-acetato 0,7M o menos, y una electroendosmosis a una concentración de 1,0% en peso de 0,05 o menos,
- 10 (b) formar una perla a partir de dichas células secretoras suspendidas de la etapa (a),
- (c) incubar dicha perla de la etapa (b) en aire humidificado, y
- (d) revestir dicha perla de la etapa (c) con una segunda agarosa, para formar una perla de agarosa que contiene células secretoras, revestida con agarosa.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además hacer girar dicha perla de la etapa (c) en agarosa al 5%, poner en contacto con aceite mineral dicha perla que se hizo girar, y lavar dicha perla que se hizo girar para formar dicha perla de agarosa que contiene células secretoras, revestida con agarosa.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las células secretoras son islotes.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dichos islotes son islotes seleccionados de un grupo que consiste en islotes humanos, islotes bovinos e islotes porcinos.
- 20 5. El método de la reivindicación 3, en el que dicha perla contiene de alrededor de 50 a alrededor de 5000 islotes, preferiblemente de alrededor de 100 a alrededor de 2500 islotes, lo más preferible alrededor de 475 a alrededor de 550 islotes.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha perla es una macroperla con un diámetro de alrededor de 4 mm a alrededor de 12 mm, preferiblemente de alrededor de 4 mm a alrededor de 10 mm, más preferiblemente de alrededor de 4 mm a alrededor de 8 mm, lo más preferible de alrededor de 6 mm a alrededor de 8 mm.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, que comprende revestir dicha perla con una capa de agarosa de alrededor de 0,05 mm a alrededor de 5,0 mm, preferiblemente de alrededor de 1,00 mm a alrededor de 3,0 mm, lo más preferible de alrededor de 1,00 mm a alrededor de 2,0 mm.
8. Una perla de agarosa que contiene células secretoras, revestida con agarosa, en la que la agarosa de la perla de agarosa que contiene células secretoras tiene un contenido de sulfato menor que 0,2% en peso pero mayor que cero, un contenido de piruvato de 0-0,1% en peso, un contenido de nitrógeno de 0-0,2% en peso, y forma un gel que tiene una resistencia de gel a una concentración de 1,0% en peso de al menos 1200 g/cm², ausencia sustancial de unión a ADN en tampón de tris-acetato 0,7M o menos, y una electroendosmosis a una concentración de 1,0% en peso de 0,05 o menos.
- 30 9. La perla de agarosa que contiene células secretoras revestida con agarosa de la reivindicación 8, en la que dicha perla contiene islotes.
10. La perla de agarosa que contiene células secretoras revestida de agarosa de la reivindicación 9, en la que dichos islotes son islotes seleccionados de un grupo que consiste en islotes humanos, islotes bovinos e islotes porcinos.
- 40 11. La perla de agarosa que contiene células secretoras revestida con agarosa de la reivindicación 9, que contiene de alrededor de 50 a alrededor de 5000 islotes, preferiblemente de alrededor de 100 a alrededor de 2500 islotes, lo más preferible de alrededor de 475 a alrededor de 550 islotes.
- 45 12. La perla de agarosa que contiene células secretoras revestida con agarosa de la reivindicación 9, que tiene un diámetro de alrededor de 4 mm a alrededor de 12 mm, preferiblemente de alrededor de 4 mm a alrededor de 10 mm, más preferiblemente de alrededor de 4 mm a alrededor de 8 mm, lo más preferible de alrededor de 6 mm a alrededor de 8 mm.
13. La perla de agarosa que contiene células secretoras revestida con agarosa de la reivindicación 8, en la que dicha perla está revestida con una capa de agarosa de alrededor de 0,05 mm a alrededor de 5,0 mm, preferiblemente de alrededor de 1,00 mm a alrededor de 3,0 mm, lo más preferible de alrededor de 1,00 mm a

alrededor de 2,0 mm.

14. Uso de las perlas de agarosa que contienen células secretoras revestidas con agarosa de la reivindicación 8, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección provocada por un funcionamiento alterado de las células secretoras.

5 15. Uso según la reivindicación 14, en el que dicha afección es diabetes insulino dependiente.

16. Uso según la reivindicación 14, en el que dicha perla contiene islotes.

17. Uso según la reivindicación 16, en el que los islotes son islotes seleccionados de un grupo que consiste en islotes humanos, islotes porcinos e islotes bovinos.

18. Uso según la reivindicación 14, en el que dichas perlas son para la colocación en la cavidad intraperitoneal.

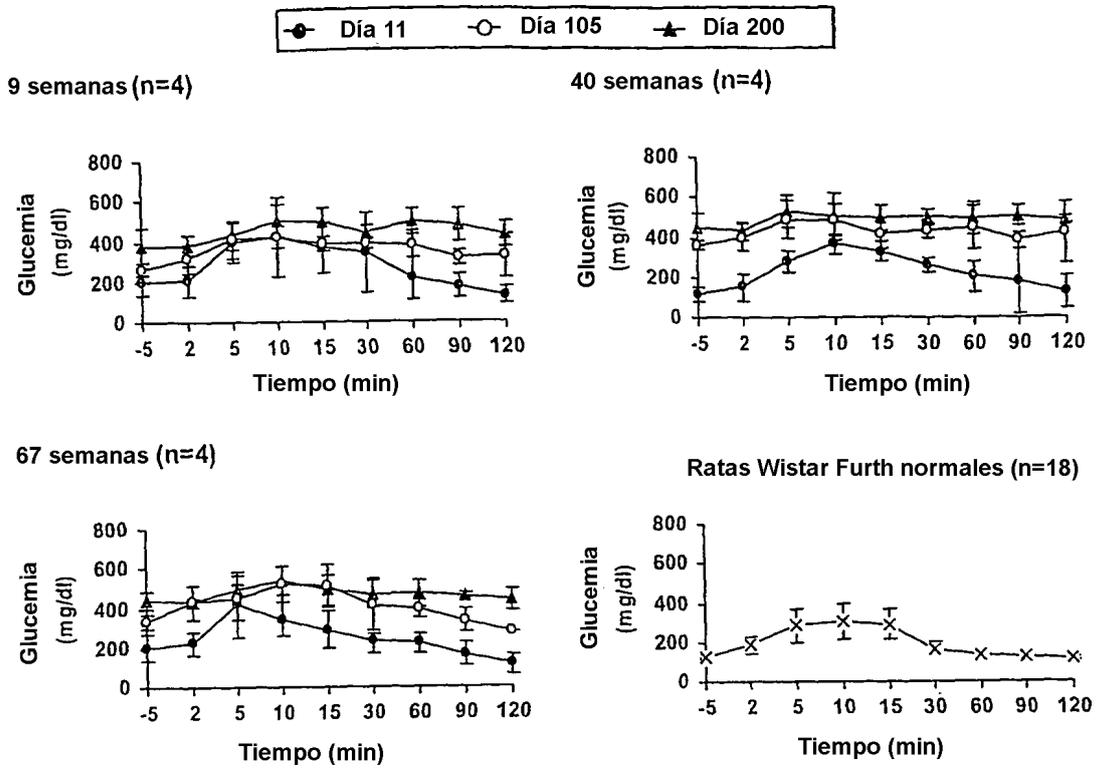


Fig. 1