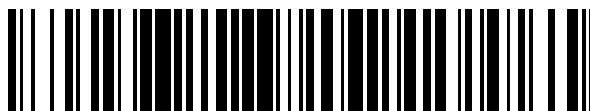


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 123**

51 Int. Cl.:
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07765405 .1**
- 96 Fecha de presentación: **13.06.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2029727**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Dispositivo celular con una matriz de colágeno revestida de alginato, proceso para su formación y utilizaciones**

30 Prioridad:
16.06.2006 US 814404 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.08.2012

73 Titular/es:
**FMC BIOPOLYMER AS
TOMTEGT. 36
3013 DRAMMEN, NO**

72 Inventor/es:
**DUFRANE, Denis;
GIANELLO, Pierre Rene Raymond y
MELVIK, Jan Egil**

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbietta, Pablo

ES 2 386 123 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**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a dispositivos celulares que comprenden una matriz de colágeno, capa celular y capa de alginato gelificado, los procesos para la producción de los dispositivos, los métodos para implantarlos y los métodos de tratamiento de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 En muchas enfermedades, la terapia celular -la implantación de células vivas en el cuerpo- podría resultar una alternativa simple y de poco riesgo al reemplazo total de un órgano. Estos tipos de terapias podrían también permitir el uso eficiente de los órganos donados, cuya escasez es crítica. Más aún, mientras que es obvio que el empleo de tejidos humanos puede prevenir problemas relacionados con el rechazo de las células, existe interés en el desarrollo de dispositivos celulares que también podrían emplear células provenientes de otros animales, como por ejemplo cerdos.

15 Un área de interés es el implante de islotes pancreáticos a pacientes que padecen diabetes de tipo I con el fin de producir insulina. Un dispositivo diseñado correctamente podría permitir un control estrecho de la emisión de insulina, permitiendo así una buena regulación de los niveles sanguíneos de glucosa.

20 Es probable que la terapia celular usando células autólogas (propias) o no afines (alogénicas, xenogénicas) solo tenga éxito clínico si las células sobreviven en el punto del trasplante y están protegidas contra el rechazo inmune. Con el paso de los años se han introducido muchas técnicas de trasplante celular para alcanzar estos objetivos, siendo eliminadas después de una evaluación y análisis de los datos más cuidadosos.

25 En cuanto al rechazo, se ha demostrado que la encapsulación permite el trasplante de células sin inmunosupresión. En esta técnica, las células se rodean con una membrana semipermeable que permite el intercambio libre de oxígeno, nutrientes y metabolitos previniendo simultáneamente el paso de las células y sustancias de alto peso molecular, tales como inmunocitos, anticuerpos y factores del complemento.

30 Sin embargo, existen varias limitaciones a la hora de implementar esta terapia. Por ejemplo, la supervivencia celular depende de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno en el punto del trasplante. Este último podría requerir de neovascularización en el punto de implante, un proceso que requiere mucho tiempo. Más aún, los dispositivos celulares podrían sufrir rupturas después de varias semanas del trasplante y/o presentar respuestas inmunosupresoras, limitando así la disponibilidad a largo plazo y/o la recuperación de los dispositivos.

35 Además, el empleo de células provenientes de donadores no humanos presenta retos adicionales. Se sabe que los tejidos y células porcinas están infectados con retrovirus endógenos. Los genomas de todas las especies porcinas domesticadas estudiadas hasta la fecha contienen copias integradas múltiples de un retrovirus endógeno tipo C conocido como retrovirus endógeno porcino (PERV). La transmisión de infecciones retrovirales xenogénicas a los recipientes de xenoinjertos causa inquietudes particulares, ya que se sabe que los retrovirus ocasionan infecciones persistentes permanentes. Por lo tanto, el desarrollo de mejores dispositivos celulares resulta especialmente importante, ya que podrían reducir o eliminar el riesgo de la contaminación PERV y permitir el empleo de material celular porcino en diversos usos terapéuticos.

40 Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar nuevos dispositivos celulares para su uso en el implante de diversos tipos de células que no posean estos riesgos y desventajas asociados. La presente invención aborda éstas y otras necesidades.

Breve descripción de las figuras

45 En la Figura 1 se muestran islotes porcinos microencapsulados en alginato teñidos con ditizona.

50 En la Figura 2 se muestran los dispositivos celulares que contienen islotes porcinos.

55 En la Figura 3 se muestra el trasplante de los islotes porcinos encapsulados en alginato bajo la cápsula renal (A) y bajo la piel (B).

60 En la Figura 4 se muestra el protocolo seguido durante el trasplante.

65 En la Figura 5 se muestra el curso de la glucosa sanguínea en ayunas (FBG) antes y después del trasplante a primates diabéticos con cápsulas vacías (simuladas), islotes porcinos no encapsulados (Ctrl+) e islotes porcinos encapsulados (Cápsulas). El área de sombreado ligero representa el intervalo de FBG para monos diabéticos, el área sombreada más oscura corresponde al intervalo de monos normoglucémicos.

En la Figura 6 se muestra la eliminación del injerto a las 6 semanas después del trasplante bajo la cápsula renal de primates diabéticos, sin señales de fibrosis del injerto (A y B). Pueden observarse los islotes porcinos encapsulados con ditizona después de la explantación del injerto (C).

5 En la Figura 7 se muestra el curso de la glucosa sanguínea en ayunas (FBG) antes y después del trasplante a primates diabéticos con cápsulas vacías (simuladas), islotes porcinos no encapsulados (Ctrl+), islotes porcinos encapsulados (cápsulas) y dispositivos celulares monocapa (MCD). El área de sombreado ligero representa el intervalo de FBG para monos diabéticos y el área sombreada más oscura corresponde al intervalo de monos normoglucémicos.

10 En la Figura 8 se muestra el curso de la glucosa sanguínea en ayunas después del trasplante de un dispositivo celular monocapa (primates 5-8) en comparación con los islotes porcinos microencapsulados (n=4) (Figura 8, gráfico inferior) y el control positivo (islotes porcinos no encapsulados) y las cápsulas vacías (simuladas) (Figura 8, gráfico superior).

15 En la Figura 9 se muestra el curso del peso corporal después del trasplante de un dispositivo celular monocapa (primates 5-8) en comparación los islotes porcinos microencapsulados (n=4) (Figura 9, gráfico superior) y el control positivo (islotes porcinos no encapsulados) y las cápsulas vacías (simuladas) (Figura 9, gráfico inferior).

20 En la Figura 10 se muestra el curso de la puntuación beta (medidas integradas de glucosa sanguínea en ayunas/glucosuria 24 h/glucosuria 2 h después de alimentos/poliuria/polidipsia) después del trasplante de islotes porcinos encapsulados en MCD en comparación con los islotes porcinos microencapsulados durante 24 semanas.

25 En la Figura 11 se muestra el curso de la puntuación beta (medidas integradas de glucosa sanguínea en ayunas/glucosuria 24 h/glucosuria 2 h después de alimentos/ poliuria/ polidipsia) después del trasplante de islotes porcinos encapsulados en MCD en comparación con los islotes porcinos microencapsulados durante 54 semanas (la primera flecha indica el trasplante; la segunda flecha indica el retrasplante en los primates 5 y 8).

30 En la Figura 12 se muestra el curso del péptido C porcino y el curso de la glucosa sanguínea en ayunas en el primate nº 8 después del primer y segundo trasplante de islotes porcinos encapsulados en MCD (la primera flecha indica el trasplante; la segunda flecha indica el retrasplante en primates 5 y 8).

35 En la Figura 13 se muestran los niveles de anticuerpos IgM antiporcinos, IgG antiporcinos y anti-gal después del trasplante de las microcápsulas (izquierda) y MCD (derecha).

40 En la Figura 14 se muestra MCD 34 semanas después del trasplante (A) y 34 semanas después de la explantación (B, C). En las Figuras 15D y 15E se muestra el dispositivo después de la explantación con tinción vWF (D) y tinción con azul de toluidina (E). En la Figura 15F se muestra la incisión donde se implantó subcutáneamente un nuevo MCD (Figura 15E).

45 En la Figura 15 se muestran los cursos de la hemoglobina glucosilada de cinomolgus diabéticos inducidos con STZ antes de la inducción de diabetes (media de cuatro semanas antes del trasplante), justo antes del trasplante (semana 0) y cada cuatro semanas después de ocho semanas después del trasplante.

50 En la Figura 16 se muestra la recolonización de la matriz de la fascia lata después de 1 mes (A) y 3 meses (B) del implante.

55 En la Figura 17 se muestra la inmunotinción para el factor von Willebrandt que indica el proceso de revascularización de la fascia lata (la flecha indica los vasos).

60 En la Figura 18 se muestran las glándulas paratiroides humanas después de picarse (A) y justo después del trasplante subcutáneo (en los animales Ctrl+) (B).

65 En la Figura 19 se muestran las glándulas paratiroides después de la encapsulación antes del trasplante de los injertos formados por el 5º nivel como 1: nivel de alginato; 2: Fascia lata; 3: glándula paratiroidea; malla de poliéster; 5: alginato.

En la Figura 20 se muestra el trasplante del dispositivo de encapsulación en tejidos subcutáneos de ratas Wistar.

70 En la Figura 21 se muestra el curso del calcio sanguíneo después del trasplante del dispositivo celular con o sin la glándula paratiroidea humana encapsulada en el tejido subcutáneo de ratas Wistar (la flecha indica el tiempo correspondiente de la eliminación de la glándula paratiroidea de ratas nativas que induce una disminución significativa en el nivel de calcio en suero).

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención ofrece un dispositivo celular que comprende:

- (a) una matriz de colágeno que tiene un primer lado y un segundo lado;
- 5 (b) una primera capa celular absorbida sobre el primer lado de la matriz de colágeno; y
- (c) una primera capa de alginato gelificado y una segunda capa de alginato gelificado; donde la primera capa de alginato gelificado cubre completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular; y donde la segunda capa de alginato gelificado cubre completamente el segundo lado de la matriz de colágeno.

10

La presente invención ofrece además un proceso para formar un dispositivo celular de la invención, que comprende:

- 15 la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- la formación de la primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular; y
- 20 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno.

20

Además, la presente invención ofrece un proceso de formación de un dispositivo celular de la invención que comprende:

- 25 la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- la colocación del soporte estructural sobre la primera capa celular;
- 30 la formación de la primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno, la primera capa celular y el soporte estructural; y
- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno.

30

35 La presente invención ofrece además un proceso de formación de un dispositivo celular de la invención que comprende:

- la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- 40 la formación de la primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular;
- la colocación del soporte estructural sobre el segundo lado de la matriz de colágeno; y
- 45 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno y el soporte estructural.

40

45 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno y el soporte estructural.

45

En algunas realizaciones, el proceso comprende:

- 50 la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- la formación de la primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular;
- 55 la formación de una segunda capa celular sobre el segundo lado de la matriz de colágeno; y
- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno y la segunda capa celular.

55

60 Además, la presente invención ofrece un proceso para la formación de un dispositivo celular de la invención que comprende:

- la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- 65 la formación de la primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular;

65

- la formación de una segunda capa celular sobre el segundo lado de la matriz de colágeno;
- 5 la colocación del soporte estructural sobre la segunda capa celular; y
- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno, la segunda capa celular y el soporte estructural.
- 10 La presente invención ofrece además un proceso para la formación de un dispositivo celular de la invención, que comprende:
- 15 el tratamiento del primer lado de una matriz de colágeno tratada químicamente, liofilizada y esterilizada con una suspensión de células del islote pancreático para formar una primera capa celular, donde la matriz de colágeno tiene un primer lado y un segundo lado;
- la colocación de una malla sobre la primera capa celular;
- la sujeción de la malla a la matriz de colágeno;
- 20 la colocación de una solución de un alginato sobre el primer lado de la matriz de colágeno de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno, la primera capa celular y la malla;
- la gelificación de la solución de un alginato para formar una primera capa de alginato gelificado mediante el contacto con una solución que comprende unos 50mM a unos 200mM de iones de calcio;
- 25 el lavado de la primera capa de alginato gelificado con una solución que no contiene calcio;
- la colocación de una solución de un alginato sobre el segundo lado de la matriz de colágeno;
- 30 la gelificación de la solución de un alginato para formar una segunda capa de alginato gelificado mediante la inmersión en una solución que comprende unos 50mM a unos 200mM de iones de calcio;
- el lavado de la segunda capa de alginato gelificado con una solución sin calcio; y
- 35 después de la formación de la primera y segunda capas de alginato gelificado, el equilibrio del dispositivo celular en una solución de 1,8mM de iones de calcio.
- También se describe un método de implante de un dispositivo celular que comprende el implante de uno o más dispositivos celulares de la invención a un paciente que lo requiere.
- 40 También se describe un método para el tratamiento de diabetes o para la regulación de los niveles de glucosa sanguínea en un paciente que lo requiere. Este método comprende la implantación de uno o más dispositivos celulares de la invención, donde la primera capa celular comprende células del islote pancreático. En algunas realizaciones, el paciente padece diabetes de Tipo I.
- 45 Además, en la presente invención se ofrece un dispositivo celular de la invención para el empleo en un método de tratamiento de la diabetes o la regulación de los niveles de glucosa sanguínea, donde la primera capa celular comprende células del islote pancreático.
- 50 También se describe un método para el tratamiento del hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio sanguíneo en un paciente que lo requiere, que comprende la implantación de uno o más dispositivos celulares de la invención, donde la primera capa celular comprende células o tejido paratiroideo.
- Además, la presente invención ofrece un dispositivo celular de la invención para el empleo en un método para el tratamiento del hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio sanguíneo, donde la primera capa celular comprende células o tejido paratiroideo.
- 55 Asimismo, la presente invención ofrece un dispositivo celular para el empleo en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 60 Además, la presente invención ofrece un equipo para la implantación de uno o más dispositivos en un paciente que lo requiere, que comprende uno o más dispositivos celulares.
- La presente invención también ofrece un equipo para el empleo en un método de tratamiento de la diabetes o para la regulación de los niveles de glucosa sanguínea que comprende uno o más dispositivos celulares, en donde la primera capa celular comprende células del islote pancreático.
- 65

Además, la presente invención comprende un equipo para el empleo en un método de tratamiento del hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio sanguíneo que comprende uno o más dispositivos celulares, donde la primera capa celular comprende células o tejido paratiroideo.

Descripción detallada de la invención

5

Definiciones

En el presente, el término "alrededor" significa más o menos 10% del valor.

10 En el presente, el término "alginato" se refiere a las sales de ácido algínico. El ácido algínico, que se obtiene de las algas marinas, es un ácido poliurónico formado por uno o dos ácidos urónicos: ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico. El cociente de ácido malurónico a ácido gulurónico varía con factores tales como la especie de alga marina, la edad de la planta y la parte del alga marina (por ejemplo, tallo, hoja). El ácido algínico es sustancialmente insoluble en agua. Forma sales solubles en agua con los metales alcalinos, como por ejemplo sodio, potasio y litio; magnesio; amonio; y los cationes de amonio sustituidos derivados de aminas inferiores, como metilamina, etanolamina, dietanolamina, y trietanolamina. Las sales son solubles en medios acuosos a un pH mayor de 4, pero se convierten al ácido algínico cuando se disminuye el pH a menos de alrededor de un pH 4. Se forma un alginato termoirreversible insoluble en agua en presencia de iones formadores de geles, por ejemplo, calcio, bario, estroncio, zinc, cobre(+2), aluminio y mezclas de los mismos en concentraciones apropiadas. Los geles de alginato pueden solubilizarse mediante el remojo en solución de cationes solubles o agentes quelantes para los iones formadores de geles, por ejemplo EDTA, citrato y similares.

25 Las sales de alginato insolubles en agua, en las que el catión principal es calcio, se encuentran en las hojas y tallos de las algas marinas de la clase Phaeophyceae, entre las cuales se encuentran *Fucus vesiculosus*, *Fucus spiralis*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Alaria esculenta*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Laminaria japonica*, *Durvillea antarctica*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria longicuris*, *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*, *Laminaria cloustoni* y *Saragassum sp.* Se conocen bien los métodos de recuperación del ácido algínico y sus sales solubles en agua, especialmente alginato de sodio, a partir de fuentes naturales, y se describen, por ejemplo, en Green, patente estadounidense nº 2.036.934 y Le Gloahec, patente estadounidense nº 2.128.551. Los alginatos adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, las series Pronova UP y SLM (NovaMatrix, FMC Corp., Oslo, Noruega).

35 En el presente, el término "polímero de alginato" se refiere a un alginato, alginato modificado o una combinación de los mismos.

40 En el presente, el término "alginato modificado" incluye alginatos enlazados covalentemente a grupos o péptidos orgánicos. Por ejemplo, el alginato podría hacerse reaccionar con un grupo orgánico como óxido de alquileo, óxido de etileno u óxido de propileno, para formar un alginato de glicol. El glicol está enlazado al alginato a través de los grupos carboxilo. Típicamente, el alginato se hace reaccionar con óxido de propileno para formar alginato del glicol de propileno (PGA). La preparación del alginato de glicol de propileno se revela en Strong, patente estadounidense nº 3.948.881, Pettitt, patente estadounidense nº 3.772.266 y Steiner, patente estadounidense nº 2.426.125. Preferentemente, el alginato de glicol de propileno posee un índice de esterificación de alrededor del 40% a alrededor del 95%, y más preferentemente de alrededor del 70% a alrededor del 95%. También pueden emplearse mezclas de alginatos de glicol de propileno de diferentes pesos moleculares. Los iones de aluminio son adecuados para la gelificación de los alginatos de glicol.

50 Entre los péptidos adecuados para el enlace a los alginatos modificados se incluyen las secuencias de adhesión celular, incluyendo un péptido que tiene una o más secuencias RGD. En algunas realizaciones, el alginato modificado comprende un alginato enlazado covalentemente al menos a un péptido de adhesión celular. En algunas realizaciones, el alginato modificado comprende un alginato enlazado covalentemente al menos a un péptido de adhesión celular, donde el péptido de adhesión celular comprende RGD. En algunas realizaciones, los péptidos de adhesión celular comprenden RGD, YIGSR (SEQ ID NO: 1), IKVAV (SEQ ID NO:2), REDV (SEQ ID NO:3), DGEA (SEQ ID NO: 4), VGV APG (SEQ ID NO: 5), GRGDS (SEQ ID NO: 6), LDV, RGDV (SEQ ID NO: 7), PDSGR (SEQ ID NO: 8), RYVVLPR (SEQ ID NO: 9), LGTIPG (SEQ ID NO: 10), LAG, RGDS (SEQ ID NO: 11), RGDF (SEQ ID NO: 112), HHLGGALQAGDV (SEQ ID NO: 13), VTCG (SEQ ID NO: 14), SDGD (SEQ ID NO: 15), GREDBY (SEQ ID NO: 16), GRGDY (SEQ ID NO: 17), GRGDSP (SEQ ID NO: 18), VAPG (SEQ ID NO: 19), GGGGRGDSP (SEQ ID NO: 20) y GGGGRGDY (SEQ ID NO: 21) y FTLCDF (SEQ ID NO: 22). Las moléculas activas biológicamente para la adhesión celular u otra interacción celular pueden incluir EGF, VEGF, b-FGF, FGF, TGF, TGF-13 o proteoglicanos. En algunas realizaciones, los péptidos de enlace celular que comprenden RGD pueden tener una longitud de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos. Entre los péptidos de adhesión celular adecuados que comprenden RGD se encuentran, pero sin limitarse a ellos, Novatach RGD (NovaMatrix, FMC BioPolymer, Oslo, Noruega) y los revelados en la patente estadounidense nº 6.642.363, que se incorpora al presente en su totalidad como referencia. Muchas compañías ofrecen servicios de síntesis de péptidos, incluyendo Commonwealth Biotechnologies, Inc. de Richmond, Virginia, Estados Unidos de América. Pueden encontrarse técnicas de acoplamiento de péptidos a la cadena principal del alginato en la patente estadounidense nº 6.642.363.

65

- 5 En el presente, el término “un alginato acoplado a un péptido RGD” se refiere a un alginato que está covalentemente enlazado a un péptido que comprende RGD. Los alginatos acoplados a péptidos RGD adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, Novatach RGD (NovaMatrix, FMC BioPolymer, Oslo, Noruega) y los revelados en la patente estadounidense nº 6.642.363, que se incorpora al presente en su totalidad como referencia.
- 10 En el presente, el término “capa de alginato gelificado”, se refiere a un hidrogel de alginato que comprende un alginato, alginato modificado, o mezcla de los mismos, e iones formadores de geles. Preferentemente, el polímero de alginato está reticulado con los iones formadores de gel.
- 15 En el presente, el término “capa celular” se refiere a las células depositadas en un lado de la matriz de colágeno, que pueden estar absorbidas parcialmente en la matriz de colágeno, y en donde las células pueden ser células individuales, aglomerados o esferoides de células o fragmentos tisulares. En algunas realizaciones la capa celular es una monocapa.
- 20 En el presente, el término “pinza” se refiere a cualquier tipo de sujetador que puede emplearse para sujetar la matriz de colágeno al soporte estructural, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, pinzas, abrazaderas, tomillos o grapas. En algunas realizaciones podrán usarse dos o más pinzas. En algunas realizaciones la pinza es una sujeción única alrededor de los bordes del dispositivo. En algunas realizaciones, la pinza o pinzas están recubiertas con la capa de alginato gelificado.
- 25 En el presente, el término “pinzado” se refiere a la sujeción o aseguramiento de la matriz de colágeno al soporte estructural con una o más pinzas.
- 30 En el presente, el término “matriz de colágeno” se refiere a un material de colágeno que es una lámina continua de un material formado de colágeno.
- 35 En el presente, el término “cubre completamente”, en el contexto de la primera y segunda capa de alginato gelificado, significa que la capa de alginato cubre la superficie de tal forma que no existen espacios visibles en la cobertura, o tal forma que no se produce una pérdida de inmunogenicidad del dispositivo celular.
- 40 En el presente, el término “equilibrar” significa sumergir en un medio durante un cierto tiempo.
- 45 En el presente, el término “glucosa sanguínea en ayunas” se refiere al nivel de glucosa en sangre después de que el paciente haya ayunado durante ocho horas.
- 50 En el presente, el término “iones formadores de geles” se refiere a los iones que pueden formar un gel con el alginato, alginato modificado, o combinación de los mismos, o que no forman una sal soluble con el alginato, alginato modificado o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los iones formadores de geles comprenden los iones de calcio, estroncio o bario, o las mezclas de los mismos.
- 55 En el presente, el término “sitios de gelación” se refiere a los grupos funcionales en el alginato o alginato modificado que pueden interactuar con los iones formadores de geles a través de enlaces iónicos para facilitar la formación de un gel. Por ejemplo, un alginato posee sitios de gelación que son grupos carboxilato que pueden interactuar con los iones formadores de geles tales como iones de calcio.
- 60 En el presente, el término “sumergir” se refiere a la colocación del objeto en un medio líquido o el lavado del objeto en un medio líquido.
- En el presente, el término “medio líquido” incluye, pero sin limitarse a ello, disolventes, soluciones o suspensiones.
- En el presente, el término “material derivado de la fascia lata” se refiere a una fascia lata que se ha tratado para hacerla adecuada para la implantación; por ejemplo, mediante la eliminación del tejido conectivo suelto y el desengrasado del material.
- En el presente, el término “fascia lata humana” se refiere a una fascia lata proveniente de un ser humano. En algunas realizaciones, se extrae la fascia lata de un cadáver o de una persona viva.
- En el presente, el término “paciente” se refiere a cualquier animal, incluidos mamíferos, preferentemente monos, ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, ganado porcino, vacuno, ovino, caballos o primates, y más preferentemente humanos. En algunas realizaciones, el paciente es un adulto, niño o bebé. En algunas realizaciones el paciente es un mamífero. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.
- En el presente, el término “permeable a nutrientes” significa que el oxígeno, proteínas y nutrientes esenciales para la supervivencia de las células particulares pueden atravesar el soporte estructural.

En el presente, el término "regulación de los niveles de glucosa en sangre" significa el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre dentro de los parámetros para un individuo normal, no diabético de edad y peso similares.

5 En el presente, el término "regulación de los niveles de calcio en sangre" significa el mantenimiento de los niveles de calcio en sangre dentro de los parámetros para un individuo normal de edad y peso similares.

En el presente, el término "soporte estructural" se refiere a un material que imparte integridad física adicional al dispositivo.

10 Adicionalmente se entiende que determinadas características de la invención que, para su entendimiento, se describen en el contexto de realizaciones separadas, pueden también suministrarse en combinación en una realización única. Por el contrario, diversas características de la invención que, para ser breves, se describen en el contexto de una realización única, también pueden suministrarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada.

15 En un aspecto, la invención actual ofrece un dispositivo celular que comprende:

- (a) una matriz de colágeno que tiene un primer lado y un segundo lado;
- 20 (b) una primera capa celular absorbida sobre el primer lado de la matriz de colágeno; y
- (c) una primera capa de alginato gelificado y una segunda capa de alginato gelificado; donde la primera capa de alginato gelificado cubre completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular; y donde la segunda capa de alginato gelificado cubre completamente el segundo lado de la matriz de colágeno.

25 En algunas realizaciones, el dispositivo celular se ha esterilizado. En algunas realizaciones, el dispositivo celular se ha esterilizado mediante radiación gamma. En algunas realizaciones, la esterilización comprende irradiación γ , haz de electrones (E-beam), óxido de etileno, autoclave o una puesta en contacto del dispositivo con alcohol antes de la adición de un componente líquido o la puesta en contacto con gases NO_x , o esterilización por plasma de hidrógeno gaseoso.

30 En algunas realizaciones, el dispositivo celular posee un bajo contenido de endotoxinas. En algunas realizaciones, el dispositivo celular posee un nivel de endotoxinas inferior a 100 UE/g, inferior a 90 UE/g, inferior a 80 UE/g, inferior a 70 UE/g, inferior a 60 UE/g, inferior a 50 UE/g, inferior a 40 UE/g, inferior a 30 UE/g, inferior a 20 UE/g, inferior a 10 UE/g, inferior a 5 UE/g o inferior a 1 UE/g.

35 En algunas realizaciones, se esteriliza el alginato o alginato modificado de la primera o segunda capa de alginato gelificado. En algunas realizaciones, se esteriliza el alginato o alginato modificado de la primera o segunda capa de alginato gelificado mediante radiación gamma. En algunas realizaciones, la esterilización comprende irradiación γ , haz de electrones (E-beam), óxido de etileno, autoclave o una puesta en contacto del dispositivo con alcohol antes de la adición de un componente líquido o la puesta en contacto con gases NO_x , o esterilización por plasma de hidrógeno gaseoso.

40 En algunas realizaciones, el alginato o alginato modificado de la primera o segunda capa de alginato gelificado posee un bajo un bajo contenido de endotoxinas. En algunas realizaciones, el alginato o alginato modificado de la primera o segunda capa de alginato gelificado posee un nivel de endotoxinas inferior a 100 UE/g, inferior a 90 UE/g, inferior a 80 UE/g, inferior a 70 UE/g, inferior a 60 UE/g, inferior a 50 UE/g, inferior a 40 UE/g, inferior a 30 UE/g, inferior a 20 UE/g, inferior a 10 UE/g, inferior a 5 UE/g o inferior a 1 UE/g.

45 En algunas realizaciones, el dispositivo celular comprende además una segunda capa celular absorbida sobre el segundo lado de la matriz de colágeno, donde la segunda capa de alginato gelificado cubre completamente la segunda capa celular.

50 Existe una amplia variedad de células apropiadas para el empleo de acuerdo con los dispositivos celulares descritos en el presente, como comprenderán los expertos en el campo de implantación celular. Las células apropiadas (autólogas, alogénicas, xenogénicas) incluyen, por ejemplo, hepatocitos, todo tipo de células madre, células productoras de insulina que incluyen las células derivadas de células madre de cualquier origen (por ejemplo, células del islote pancreático, células beta pancreáticas aisladas, células del insulinoma, etc.), células productoras de hormonas endocrinas (por ejemplo, paratiroidea, tiroidea, suprarrenales, etc.) y cualesquiera células transgénicas que secreten agentes terapéuticos, como proteínas u hormonas para el tratamiento de enfermedades u otras condiciones, y células transgénicas que secreten agentes diagnósticos. En algunas realizaciones, la proteína comprende el factor VIII (factor de coagulación VIII). En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende células del islote pancreático, células hepáticas, células neurales, células endoteliales vasculares, células tiroideas, células suprarrenales, células del timo y células del ovario. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende células seleccionadas del grupo formado por células del islote pancreático, células mesenquimales

- 5 pluripotenciales, células paratiroideas y células tiroideas. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende células seleccionadas entre el grupo formado por células del islote pancreático y células paratiroideas. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende células del islote pancreático. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende células mesenquimales pluripotenciales transgénicas modificadas para expresar factor de crecimiento o factor de coagulación VIII. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende células mesenquimales pluripotenciales. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende tejidos de cualquiera de las células aquí descritas. En algunas realizaciones, la segunda capa celular puede comprender independientemente cualquiera de las realizaciones aquí enumeradas para las células.
- 10 En algunas realizaciones, las células comprenden células provenientes de un ser humano o cerdo. En algunas realizaciones, las células comprenden células provenientes de un ser humano, lechón recién nacido o un cerdo adulto. En algunas realizaciones, las células comprenden células provenientes de un ser humano. En algunas realizaciones, las células comprenden células provenientes de un lechón recién nacido o un cerdo adulto. En algunas realizaciones, las células comprenden células provenientes de un lechón recién nacido. En algunas realizaciones, las células comprenden células provenientes de un cerdo adulto. En algunas realizaciones, las células del islote pancreático comprenden células provenientes de un ser humano o cerdo. En algunas realizaciones, las células del islote pancreático comprenden células provenientes de un ser humano, lechón recién nacido o un cerdo adulto. En algunas realizaciones, las células del islote pancreático comprenden células provenientes de un ser humano. En algunas realizaciones, las células del islote pancreático comprenden células provenientes de un lechón recién nacido o un cerdo adulto. En algunas realizaciones, las células del islote pancreático comprenden células provenientes de un lechón recién nacido. En algunas realizaciones, las células del islote pancreático comprenden células provenientes de un cerdo adulto.
- 15 En algunas realizaciones, la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata. En algunas realizaciones, la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana. Por ejemplo, podría obtenerse la fascia lata de donadores seleccionados siguiendo las normas comunes de la *European Association of Musculo Skeletal Transplantation* (EAMST, Viena, 1997) (Asociación Europea de Trasplantes Musculo-esqueléticos). Los donadores pueden seleccionarse haciendo una revisión de la historia clínica, incluidos los factores de riesgo para las encefalopatías espongiformes subagudas. Podrán realizarse los análisis serológicos mínimos, que incluyen la detección de VIH-1 y 2 y VLTH 1, hepatitis B y C y sífilis. Podría evitarse el empleo de un aloinjerto si los resultados indican el riesgo de transmisión de estos agentes. La obtención podría hacerse en un quirófano o un depósito adecuado de cadáveres. Todos los instrumentos y equipo usados para la obtención deberán esterilizarse. La fascia lata podrá lavarse con una solución salina fisiológica estéril a temperatura ambiente hasta que se realice el transporte al banco de tejidos.
- 20 En general, la fascia lata se despoja de sus tejidos conectivos sueltos externos incluyendo tejido adiposo, vasos y nervios. En algunas realizaciones, la matriz de colágeno humana se trata químicamente (detergentes disolventes) como se describió anteriormente en Dufrane D, *et ál.*, "Physical and chemical processing for a human dura mater substitute", *Biomaterials*, 2002, 23(14):2979-88, que se incorpora aquí íntegramente como referencia. En el presente, el término "tratamiento químico" significa que el material se ha sometido a tratamiento químico con el fin de mejorar su idoneidad para el implante; por ejemplo, mediante el desengrase del material, inactivación de los priones, y/o mejora de su inmunogenicidad. Los especialistas en este campo conocen dichos tratamientos químicos adecuados, incluido, pero sin limitarse al mismo, el tratamiento químico desarrollado por el Banco de Tejidos Universitario que se describe más adelante. La relación entre la fascia lata y las soluciones químicas es alrededor de 0,2 g/cm² de fascia lata por litro de solución. En primer lugar, las piezas se desengrasan extensamente en tres baños de acetona absoluta seguidos de dos baños de etanol a 70°C. A continuación, se inactivan los priones con hidróxido de sodio (1N) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se obtuvo la reducción en la inmunogenicidad mediante la coagulación de proteínas, la precipitación de ácidos nucleicos y la degradación de la membrana celular con cloruro de sodio (7% p/v) durante 1 hora y peróxido de hidrógeno (7% p/v) durante 15 horas. Después de cada procedimiento, se lavan intensamente los pedazos de fascia lata con un flujo continuo de agua destilada (6 l/min).
- 25 En algunas realizaciones, la matriz de colágeno es un material sometido a tratamiento químico donde dicho tratamiento químico comprende sumergir el material en un disolvente desengrasante. En algunas realizaciones, la matriz de colágeno es un material que se somete a tratamiento químico, donde el tratamiento químico comprende sumergir el material en un disolvente desengrasante y poner el material en contacto con una solución alcalina. En algunas realizaciones, la matriz de colágeno es un material que se somete a tratamiento químico, donde dicho tratamiento químico comprende:
- 30 sumergir el material en un disolvente desengrasante;
- 35 poner el material en contacto con una solución alcalina; y
- 40 poner el material en contacto con una solución de sal, agente oxidante, o mezcla de los mismos.
- 45 Los álcalis adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, álcalis fuertes como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. Los disolventes desengrasantes adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, acetona, etanol u otro
- 50
- 55
- 60
- 65

alcohol. Los agentes oxidantes adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos. Las sales adecuadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de estroncio, o cloruro de bario.

5 En algunas realizaciones, se esteriliza la matriz de colágeno. En algunas realizaciones, la matriz de colágeno es un material esterilizado por irradiación gamma En algunas realizaciones, la esterilización comprende irradiación γ , haz de electrones, óxido de etileno, autoclave o puesta en contacto de la espuma con alcohol antes de la adición del componente líquido o puesta en contacto con gases NO_x , esterilización por plasma con hidrógeno gaseoso. En algunas realizaciones, la matriz de colágeno comprende un colágeno que posee un bajo contenido de endotoxinas. En algunas realizaciones, la matriz de colágeno comprende un material con un contenido de endotoxinas de menos de 100 UE/g, menos de 90 UE/g, menos de 80 UE/g, menos de 70 UE/g, menos de 60 UE/g, menos de 50 UE/g, menos de 40 UE/g, menos de 30 UE/g, menos de 20 UE/g, menos de 10 UE/g, menos de 5 UE/g o menos de 1 UE/g.

15 En algunas realizaciones, la matriz de colágeno es un material tratado por liofilización.

En algunas realizaciones, la matriz de colágeno tiene alrededor de 0,1 mm a unos 3 mm, alrededor de 0,1 mm a unos 0,2 mm, alrededor de 0,5 mm a unos 2 mm, alrededor de 0,5 mm a unos 1,5 mm de espesor.

20 En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con peso molecular promedio de 4 kD a unos 300 kD. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con un peso molecular promedio de unos 50 kD a alrededor de 300 kD, alrededor de 150 kD a unos 250 kD, alrededor de 75 kD a unos 150 kD, o alrededor de 10 kD a unos 75 kD. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con un peso molecular promedio de menos de unos 75 kD, menos de unos 50 kD o menos de unos 40 kD.

25 En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un cociente de manuronato a guluronato igual o mayor de 1. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato proveniente de *Macrocystitis purifera*.

30 En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato, alginato modificado, o mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato modificado. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato modificado con una secuencia de adhesión celular. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato acoplado con un péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD).

35 En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente cationes multivalentes. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de estroncio, iones de bario, iones de calcio o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio.

40 En algunas realizaciones, el cociente de alginato a iones de calcio en cada lado del dispositivo celular comprende entre 1,5 ml a unos 2,5 ml de una solución al 3% de alginato por cm^2 por cada 30 ml de una solución al 100mM de iones de calcio.

45 En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 0,01 g a alrededor de 1 g, alrededor de 0,01 a unos 0,9 g, alrededor de 0,01 a unos 0,8 g, alrededor de 0,01 a unos 0,7 g, alrededor de 0,01 a unos 0,6 g, alrededor de 0,01 g a unos 0,5 g, alrededor de 0,01 g a unos 0,4 g, alrededor de 0,01 g a unos 0,3 g, alrededor de 0,01 g a unos 0,2 g, o alrededor de 0,02 g a unos 0,2 g de polímero de alginato por cm^2 .

50 En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 0,5% w/v a unos 7% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente alrededor de 1% p/v a unos 7% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 2% p/v a unos 6% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 3% p/v a unos 5% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 2,5% p/v a unos 3,5% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden

independientemente unos 4,5% p/v a unos 5,5% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 3% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 5% p/v por peso de alginato. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 5% p/v por peso de Pronova SLM₂₀ (NovaMatrix, FMC Biopolymer, Noruega). En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente unos 5% p/v por peso de Pronova SLM₁₀₀ (NovaMatrix, FMC Biopolymer, Noruega). En algunas realizaciones, el dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende una concentración fisiológica de iones formadores de gel. En algunas realizaciones, el dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende una concentración fisiológica de iones de calcio. En algunas realizaciones, el dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende alrededor de 1,8mM de iones de calcio.

En algunas realizaciones, cada lado del dispositivo celular tiene un área de aproximadamente 1 cm² a unos 4 cm², 0,5 cm² a unos 3 cm², 1 cm² a unos 3 cm², 0,5 cm² a unos 2 cm², 1 cm² a unos 2 cm², ó 0,5 cm² a unos 2,5 cm². En algunas realizaciones, cada lado del dispositivo celular tiene un área de aproximadamente 1 cm².

En algunas realizaciones, el dispositivo celular comprende adicionalmente un soporte estructural. El soporte estructural puede proporcionar al dispositivo celular una mejor integridad física, que puede a su vez mejorar la longitud de tiempo en que el dispositivo continúa siendo viable después de la implantación. Más aún, las mejoras en la integridad física podrían permitir una mejor recuperación del dispositivo después de la implantación. El soporte estructural podría estar hecho de cualquier material que imparta una mejor integridad física al dispositivo. En algunas realizaciones, el soporte estructural es poliéster. El soporte estructural puede colocarse en cualquiera de los lados del dispositivo, o puede rodear los bordes del mismo. En algunas realizaciones, la primera o segunda capa de alginato gelificado cubre completamente el soporte estructural, si fuese necesario con el fin de ofrecer inmunogenicidad.

En algunas realizaciones, el dispositivo celular comprende adicionalmente un soporte estructural situado en la primera capa celular, donde:

la primera capa de alginato gelificado cubre completamente el soporte estructural; y
el soporte estructural es permeable a los nutrientes.

En algunas realizaciones, un soporte estructural [es] colocado sobre el segundo lado de la matriz de colágeno, donde la segunda capa de alginato gelificado cubre completamente el soporte estructural. En algunas realizaciones, el dispositivo celular comprende además un soporte estructural colocado en la segunda capa celular, donde:
la segunda capa de alginato gelificado cubre completamente el soporte estructural; y

el soporte estructural es permeable a los nutrientes.

El soporte estructural puede darle al dispositivo celular una mejor integridad física, que puede a su vez mejorar la longitud de tiempo en que el dispositivo continúa siendo viable después de la implantación. Más aún, las mejoras en la integridad física podrían permitir una mejor recuperación del dispositivo después de la implantación. El soporte estructural podría estar hecho de cualquier material que imparta una mejor integridad física al dispositivo. En algunas realizaciones, el soporte estructural es poliéster.

Cuando el soporte estructural cubre el lado de la matriz de colágeno que contiene una capa celular, deberá diseñarse el soporte de manera que permita el paso de nutrientes a la capa celular. En algunas realizaciones, el apoyo estructural comprende una malla

En algunas realizaciones, la malla tiene una apertura de la misma de unas 10 µm a aproximadamente 1 mm. En algunas realizaciones, la malla tiene una apertura de la misma de unas 20 µm a aproximadamente 500 µm. En algunas realizaciones, la malla tiene una apertura de la misma de unas 300 µm.

En algunas realizaciones, el dispositivo celular comprende además una o más pinzas para fijar el soporte estructural a la matriz de colágeno. En algunas realizaciones, el dispositivo celular comprende además una o más pinzas para fijar el soporte estructural a la matriz de colágeno. En algunas realizaciones, el dispositivo celular comprende además dos o más pinzas para fijar el soporte estructural a la matriz de colágeno.

Se sabe que el fallo de los dispositivos encapsulados debido a problemas de estabilidad puede ocasionar la destrucción del dispositivo por los linfocitos y macrófagos y fibrosis. Por ejemplo, en un estudio en primates (Dufrane *et ál.*, Transplantation vol 81, 9:2006: pág 1345), se demostró que >92% de islotes encapsulados no están caracterizados por sobrecrecimiento celular y 13% de las cápsulas se rompen a los 180 días después del trasplante. Esto indica que la mayoría de las cápsulas que contienen islotes porcinos se recuperan a los 6 meses después del trasplante sin inmunosupresión, lo que demuestra la estabilidad de las cápsulas. Si las cápsulas no son estables, se induce una reacción inmunológica y la mayoría de las cápsulas son destruidas por los linfocitos y macrófagos y

- 5 fibrosis. De forma similar, en un modelo de ratas Wistar (Dufrane *et ál.* Biomaterials 2006, vol. 27: pág. 3201) se demostró que >91% del volumen inicial de cápsulas se recupera después de transcurridos 30 días desde la implantación en tejidos subcutáneos, así como en los espacios capsulares renales. En comparación, después del implante al peritoneo, solo se encontró el 67% del volumen inicial, debido a la fibrosis capsular. Por lo tanto, cuando un dispositivo es inestable, pueden surgir problemas significativos al tratar de recuperar el dispositivo del paciente.
- 10 En algunas realizaciones puede recuperarse el dispositivo. En este contexto particular, el término “recuperable” significa que menos de un 10% de los dispositivos celulares se rompen o muestran signos de fibrosis después de un periodo de 30 días o superior. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10% de los dispositivos celulares se rompen o muestran signos de fibrosis después de un periodo de 60 días o superior. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10% de los dispositivos celulares se rompen o muestran signos de fibrosis después de un periodo de 90 días o superior.
- 15 En algunas realizaciones, la primera y segunda capas de alginato gelificado no son degradables.
- En algunas realizaciones, la primera y segunda capas de alginato gelificado no se degradan en fluidos fisiológicos a temperaturas fisiológicas durante un mes. En este contexto, “no se degradan en fluidos fisiológicos” significa que menos del 80% en peso del alginato se disuelve bajo las condiciones fisiológicas.
- 20 En algunas realizaciones:
- la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata; y
- 25 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio o una combinación de los mismos.
- En algunas realizaciones:
- 30 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio o una combinación de los mismos.
- 35 En algunas realizaciones:
- la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata; y
- 40 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato y cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio o una combinación de los mismos.
- En algunas realizaciones:
- 45 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato y cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio o una combinación de los mismos.
- 50 En algunas realizaciones:
- la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- 55 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato modificado y cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio o una combinación de los mismos.
- 60 En algunas realizaciones:
- la matriz de colágeno comprende un material derivado la fascia lata humana; y
- 65 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio de aproximadamente 75 kD a alrededor de 150 kD.

En algunas realizaciones:

5 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio menor de 75 kD.

En algunas realizaciones:

10 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio menor de unos 50 kD.

En algunas realizaciones:

15 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio menor de unos 40 kD.

En algunas realizaciones:

20 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio.

En algunas realizaciones:

25 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio de aproximadamente 4 kD a alrededor de 300 kD.

En algunas realizaciones:

35 un soporte estructural colocado sobre la primera capa celular; y una o más pinzas fijan el soporte estructural a la matriz de colágeno; donde:

la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;

40 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio; y

la primera capa de alginato gelificado cubre completamente el soporte estructural y es permeable a los nutrientes.

En algunas realizaciones:

50 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y

la primera capa celular comprende alrededor de 20.000 a unas 40.000 células del islote pancreático;

55 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio comprendido entre unos 4 kD y aproximadamente 300 kD;

60 el dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende unos 1,8mM de iones de calcio;

un soporte estructural colocado sobre la primera capa celular; y

una o más pinzas fijan el soporte estructural a la matriz de colágeno;

65 donde:

- la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- 5 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio;
- la primera capa de alginato gelificado cubre completamente el soporte estructural y es permeable a los nutrientes;
- 10 el soporte estructural comprende una malla de poliéster.
- En algunas realizaciones:
- un soporte estructural colocado sobre la primera capa celular; y
- 15 dos o más pinzas fijan dicho soporte estructural a la matriz de colágeno;
- donde:
- 20 dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- dichas primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio; y
- 25 dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural y es permeable a los nutrientes.
- En algunas realizaciones:
- 30 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- la primera capa celular comprende alrededor de 20.000 a unas 40.000 células del islote pancreático;
- 35 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio comprendido entre unos 4 kD y aproximadamente 300 kD;
- el dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende unos 1,8mM de iones de calcio;
- 40 un soporte estructural colocado sobre la primera capa celular; y
- dos o más pinzas fijan el soporte estructural a la matriz de colágeno;
- donde:
- 45 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- la capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio;
- 50 la primera capa de alginato gelificado cubre completamente el soporte estructural y es permeable a los nutrientes; y
- el soporte estructural comprende una malla de poliéster.
- Proceso de formación de un dispositivo celular y productos de estos procesos*
- 55 Los procesos proporcionados en el presente podrán emplearse para producir cualquiera de las realizaciones de los dispositivos celulares descritos anteriormente, incluidas diversas combinaciones y subcombinaciones de las realizaciones.
- 60 La presente invención ofrece además un proceso para la formación de un dispositivo celular de la invención que comprende:
- la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- 65 la formación de la primera capa del alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular; y

- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno.
En algunas realizaciones, el proceso comprende:
- 5 la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- la colocación del soporte estructural en la primera capa celular;
- 10 la formación de la primera capa del alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno, la primera capa celular y el soporte estructural; y
- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno.
- 15 En algunas realizaciones, el proceso comprende:
- la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- 20 la formación de la primera capa del alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular;
- la colocación del soporte estructural sobre el segundo lado de la matriz de colágeno; y
- 25 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno y el soporte estructural.
- En algunas realizaciones, el proceso comprende:
- 30 la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- la formación de la primera capa del alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular;
- 35 la formación de la segunda capa celular sobre el segundo lado de la matriz de colágeno; y
- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno y la segunda capa celular.
- 40 En algunas realizaciones, el proceso comprende:
- la formación de la primera capa celular sobre el primer lado de la matriz de colágeno;
- 45 la formación de la primera capa del alginato gelificado de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular;
- la formación de la segunda capa celular sobre el segundo lado de la matriz de colágeno; la colocación del soporte estructural en la segunda capa celular; y
- 50 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno, la segunda capa celular y el soporte estructural.
- En algunas realizaciones, el proceso comprende:
- 55 el tratamiento del primer lado de una matriz de colágeno tratada químicamente, liofilizada y esterilizada con una suspensión de células del islote pancreático para formar una primera capa celular, donde la matriz de colágeno tiene un primer lado y un segundo lado;
- 60 la colocación de una malla en la primera capa celular;
- la fijación de la malla a la matriz de colágeno
- la colocación de una solución de un alginato sobre el primer lado de la matriz de colágeno de manera que cubra completamente el primer lado de la matriz de colágeno, la primera capa celular y la malla;

la gelificación de la solución de un alginato para formar la primera capa de alginato gelificado mediante la puesta en contacto con una solución que comprende entre aproximadamente 50mM y aproximadamente 200mM de iones de calcio;

5 el lavado de la primera capa de alginato gelificado con una solución que no contiene calcio;

la colocación de una solución de un alginato sobre el segundo lado de la matriz de colágeno;

10 la gelificación de la solución de un alginato para formar una segunda capa de alginato gelificado mediante la inmersión en una solución que comprende entre aproximadamente 50mM y aproximadamente 200mM de iones de calcio;

el lavado de la segunda capa de alginato gelificado con una solución que no contiene calcio;

15 después de la formación de la primera y segunda capas de alginato gelificado, la puesta en equilibrio del dispositivo celular en una solución de 1,8mM de iones de calcio.

En algunas realizaciones de los procesos, la primera capa de alginato gelificado se forma siguiendo los siguientes pasos:

20 la colocación de una solución de un alginato sobre el primer lado de la matriz de colágeno de manera que cubra completamente primero el segundo lado de la matriz de colágeno y la primera capa celular; y

la gelificación de la solución de un alginato mediante la puesta en contacto de la solución de alginato con una solución de iones formadores de geles;

25 (ii) la segunda capa de alginato gelificado se forma siguiendo los pasos dados a continuación:

la colocación de una solución de un alginato sobre el segundo lado de la matriz de colágeno de manera que cubra completamente el segundo lado de la matriz de colágeno; y

30 la gelificación de la solución de un alginato mediante la puesta en contacto de la solución de alginato con una solución de iones formadores de geles;

35 Podrá emplearse una sal o combinación de sales que proporcione los iones formadores de geles o una mezcla de iones formadores de geles deseados, como por ejemplo los iones formadores de geles. Entre los iones formadores de geles adecuados para la formación de cada capa gelificada figuran los cationes multivalentes, preferentemente los cationes divalentes y/o trivalentes. Para los alginatos, los cationes polivalentes adecuados incluyen, por ejemplo, calcio(2+), bario(2+), estroncio(2+), hierro(2+), zinc(2+), cobre(2+) y aluminio(3+). Los cationes preferidos son cationes metálicos divalentes, más preferentemente el catión calcio(2+). En algunas realizaciones, los iones formadores de iones se seleccionan del grupo formado por iones de estroncio, iones de bario, iones de calcio y combinaciones de los mismos.

45 Puede calcularse la concentración de iones formadores de geles requeridos para saturar 100% de los sitios gelificantes del polímero de alginato mediante principios reconocidos. Por ejemplo, cuando está presente una cantidad suficiente de iones formadores de geles, tal como iones de calcio, para reaccionar con todos los sitios disponibles de gelificación (por ejemplo, unidades de ácido L-gulurónico en el caso del alginato), el alginato está saturado al 100%. Se considera que, por ejemplo, la cantidad de catión que se requiere para saturar completamente los sitios de gelificación del alginato es 1 mol de catión divalente por 2 moles de ácido L-gulurónico en el alginato o 1 mol de catión trivalente por 3 moles de ácido L-gulurónico en el alginato cuando se usa sólo un catión divalente o sólo un catión trivalente en la gelación. Cuando se emplea una mezcla de catión o cationes divalentes y un catión o cationes trivalentes, pueden determinarse las cantidades requeridas para saturar el alginato, ya que un catión divalente ocupa dos sitios de gelación y un catión trivalente ocupa tres sitios de relación. Así cualquier cantidad menor a esta se considera una cantidad menor que la requerida para saturar completamente los sitios de gelación del alginato.

55 Para el alginato, la resistencia de los geles formados mediante la reacción de alginato con cationes polivalentes está relacionada con el peso molecular del alginato, el contenido de ácido gulurónico ("contenido G") del alginato y el posicionamiento de los ácidos gulurónico y manurónico en la cadena polimérica. En algunas realizaciones, el contenido G del alginato para el gel es adecuadamente al menos de aproximadamente un 30%, aproximadamente entre unos 40% y unos 90%, o aproximadamente entre unos 50% y unos 80%. El alginato derivado de, por ejemplo, *Lessonia trabeculata*, y de los tallos de *Laminaria hyperborea*, tiene un alto contenido G.

65 Puede calcularse la cantidad de catión divalente, por ejemplo el calcio, necesaria para la reacción estequiométrica con estos bloques G para cada tipo de alginato teniendo en cuenta que se requieren dos unidades de ácido gulurónico más un catión divalente para crear un reticulado iónico. En la siguiente tabla se muestra la cantidad de calcio requerido para la saturación estequiométrica de una solución de alginato de sodio al 1%:

	Fuente de alga marina	%G	nMca
	<i>Laminaria hyperborea</i> (tallo)	70	14-16
5	<i>Laminaria hyperborea</i> (hoja)	54	11-13
	<i>Lessonia trabeculata</i>	68	13-15
10	<i>Macrocystis pyrifera</i>	39	8-9

En Shapiro, patente estadounidense nº 6.334.968, Tabla 1, columna 16, línea 49 a columna 17, línea 18, se presenta una lista de diversos alginatos comerciales, sus propiedades y sus fuentes, que se incorpora al presente íntegramente como referencia. Las mezclas o combinaciones de alginatos, por ejemplo, alginatos de diversos pesos moleculares y/o contenido G, pueden usarse para formar la primera o segunda capa de alginato gelificado.

La saturación completa (100%) de los sitios de gelación ocurre cuando la composición contiene 1 mol de catión divalente por 2 moles de unidades de ácido L-gulurónico. Por ejemplo, se requiere una solución de aproximadamente 15mM de ión calcio para saturar al 100% una solución al 1% de alginato de sodio extraído de los tallos de *Laminaria hyperborea*, se requiere una solución de calcio de aproximadamente 12mM para saturar al 100% una solución al 1% de alginato de sodio extraído de las hojas (fronda) de *Laminaria hyperborea*, y se requiere una solución de iones de calcio de aproximadamente 14mM para saturar al 100% una solución al 1% de alginato de sodio extraído de *Lessonia trabeculata*.

En algunas realizaciones, cada uno de los procesos comprende además la fijación del soporte estructural a la matriz de colágeno.

En algunas realizaciones, la solución de iones formadores de gel comprende entre unos 50mM y unos 200mM de iones formadores de gel. En algunas realizaciones, la solución de iones formadores de gel comprende unos 100M de iones formadores de gel.

En algunas realizaciones, cada uno de los procesos comprende además el lavado del dispositivo celular en una solución libre de iones formadores de geles después de formar la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado.

En algunas realizaciones, cada uno de los procesos comprende además equilibrar el dispositivo celular en una solución de iones de calcio de 1,8mM después del procesamiento. En algunas realizaciones, cada uno de los procesos comprende además equilibrar el dispositivo celular en una solución que comprende una concentración fisiológica de cationes multivalentes después del procesamiento.

La presente invención comprende además productos de los procesos descritos en el presente.

Métodos de empleo de los dispositivos celulares

En los métodos y usos se pueden emplear todas las realizaciones de los dispositivos celulares y los productos de los procesos aquí descritos anteriormente, incluidas varias combinaciones y sub-combinaciones de las realizaciones.

La presente invención ofrece un método de implantación de un dispositivo celular, que comprende la implantación de uno o más dispositivos celulares de la invención en un paciente que los requiere. La técnica descrita en el presente puede usarse en una variedad de diferentes tipos de células como aquí se describe. El tipo de célula seleccionada variará con el uso terapéutico particular. Los dispositivos celulares pueden implantarse mediante diversos métodos reconocidos por los especialistas en este campo. Por ejemplo, los dispositivos celulares pueden implantarse por diversos métodos reconocidos por los especialistas en el campo, como subcutánea o quirúrgicamente en varios órganos, músculos, tejidos o el lumen de un órgano. Los dispositivos celulares pueden implantarse en diversos tejidos, entre los que se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, el retroperitoneo, el espacio properitoneo, el mesenterio, el espacio sub capsular renal, el peritoneo y el espacio intramuscular.

En algunas realizaciones, se implantan uno o más dispositivos celulares subcutáneamente. En algunas realizaciones, se implantan tres o cuatro de los dispositivos celulares en el paciente.

En algunas realizaciones, menos de aproximadamente un 10% de los dispositivos celulares se rompen aproximadamente a las 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 semanas después del implante. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente un 10% de los dispositivos celulares no muestran signos de fibrosis después de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22 semanas después del implante.

- 5 En algunas realizaciones, se implanta un número terapéuticamente efectivo de células. El número de células necesario para el tratamiento de un trastorno específico variará dependiendo del trastorno o trastornos específicos que se están tratando, el tamaño, la edad y el patrón de respuesta del individuo, la gravedad del trastorno o trastornos, la opinión del clínico a cargo del tratamiento, el método de administración y el objetivo de la administración, como por ejemplo la profilaxis o la terapia. La expresión "cantidad efectiva" se refiere al número de células que provocan la respuesta biológica o medicinal buscada por un investigador, veterinario, médico u otro clínico, en un tejido, sistema, animal, individuo, paciente o ser humano. La respuesta biológica o médica deseada podría incluir la prevención del trastorno en un individuo (por ejemplo, la prevención del trastorno en un individuo que presenta predisposición a dicho trastorno, pero que no padece o presenta todavía la patología o sintomatología de la enfermedad). La respuesta biológica o médica deseada podría también incluir la inhibición del trastorno en un individuo que padece o presenta la patología o sintomatología del trastorno (esto es, la detención o desaceleración de un mayor desarrollo de la patología y/o sintomatología). La respuesta biológica o médica deseada también puede incluir la mejora del trastorno en un individuo que padece o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad (esto es, la inversión de la patología o sintomatología).
- 10
- 15 Teóricamente, el número de células del islote que se requieren para alcanzar la dependencia de la insulina es de unos 10.000 islotes por kg de grasa corporal en un recipiente diabético humano. Sin embargo, se sabe que se requieren 100.000 células, aproximadamente el 10% del número total de islotes en un páncreas humano normal, para alcanzar el control de la glucosa sanguínea. Se piensa que el trasplante subcutáneo de los dispositivos celulares de la invención podría reducir significativamente el número de islotes requeridos para alcanzar el control de la glucosa sanguínea.
- 20
- 25 Podrían implantarse uno o más dispositivos en un paciente para alcanzar una cantidad terapéuticamente efectiva de células. Además, si se desea, el número de células podría dividirse entre una primera capa celular y una segunda capa celular. En algunas realizaciones, la primera capa celular u, optativamente, la segunda capa celular comprenden independientemente unas 5.000 células o más. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende entre unas 5.000 y unas 300.000 células, entre unas 5.000 y unas 200.000 células, entre unas 5.000 y unas 100.000 células, entre unas 10.000 y unas 100.000 células, entre unas 5.000 y unas 60.000 células, entre unas 10.000 y unas 60.000 células, o entre unas 20.000 y unas 40.000 células. En algunas realizaciones, la segunda capa celular comprende entre unas 5.000 y unas 300.000 células, entre unas 5.000 y unas 200.000 células, entre unas 5.000 y unas 100.000 células, entre unas 5.000 y unas 60.000 células, entre unas 10.000 y unas 60.000 células, entre unas 20.000 y unas 60.000, o entre unas 20.000 y unas 40.000 células. En algunas realizaciones, la primera capa celular comprende entre unas 5.000 y unas 300.000 células, entre unas 5.000 y unas 200.000 células, entre unas 5.000 y unas 100.000 células, entre unas 10.000 y unas 100.000 células, entre unas 5.000 y unas 60.000 células, entre unas 10.000 y unas 60.000 células, entre unas 20.000 y unas 60.000, o entre unas 20.000 y unas 40.000 células por cm^2 . En algunas realizaciones, la segunda capa celular comprende entre unas 5.000 y unas 300.000 células, entre unas 5.000 y unas 200.000 células, entre unas 5.000 y unas 100.000 células, entre unas 10.000 y unas 100.00 células, entre unas 5.000 y unas 60.000 células, entre unas 10.000 y unas 60.000 células, entre unas 20.000 y unas 60.000, o entre unas 20.000 y unas 40.000 células por cm^2 .
- 30
- 35
- 40
- 45 En algunas realizaciones, se implantan tres o cuatro dispositivos celulares en el paciente, donde la capa celular comprende células del islote pancreático.
- 50 La presente invención ofrece además un método de tratamiento de la diabetes o regulación de los niveles de glucosa sanguínea en un paciente que lo requiere, y comprende la implantación de uno o más dispositivos celulares de la invención, donde la primera capa celular comprende células del islote pancreático. La presente invención ofrece un dispositivo celular de la invención para el empleo en un método de tratamiento de la diabetes, o regulación de los niveles de glucosa sanguínea, donde la primera capa celular comprende células del islote pancreático.
- 55 En algunas realizaciones, se controlan durante diez semanas o más los niveles de glucosa sanguínea en ayunas del paciente. En algunas realizaciones, se controlan durante hasta veinticuatro semanas los niveles de glucosa sanguínea en ayunas del paciente.
- 60 La presente invención ofrece además un método de tratamiento del hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio en sangre en un paciente que así lo requiere, y comprende la implantación de uno o más dispositivos celulares de la invención, donde la primera capa celular comprende células o tejido paratiroideo. La presente invención ofrece un dispositivo celular de la invención para el empleo en un método de tratamiento del hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio sanguíneo, donde la primera capa celular comprende células o tejido paratiroideo.
- 65 En algunas realizaciones, no se observó contaminación PERV después de unas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 semanas de la implantación, donde la primera capa celular comprende células provenientes de cerdos.
- La presente invención ofrece además un dispositivo celular para el empleo en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

La presente invención ofrece además un equipo para la implantación de uno o más dispositivos en un paciente que los requiere, lo que comprende uno o más dispositivos celulares.

5 La presente invención ofrece además un equipo para el empleo en un método de tratamiento de la diabetes o regulación de los niveles de glucosa sanguínea que comprende uno o más dispositivos, donde la primera capa comprende células del islote pancreático.

10 La presente invención ofrece además un equipo para el empleo en un método de tratamiento del hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio en sangre que comprende uno o más dispositivos, donde la primera capa celular comprende células o tejido paratiroideo.

Preferentemente, dicho dispositivo celular posee un nivel de endotoxinas inferior a 100 UE/g.

15 Preferentemente, dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata.

Más preferentemente, dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana.

Preferentemente, dicha matriz de colágeno es un material esterilizado por radiación gamma.

20 Preferentemente, dicha matriz de colágeno es un material que se trata químicamente, donde dicho tratamiento químico comprende:

sumergir el material en un disolvente desengrasante;

25 poner en contacto dicho material con una solución de un álcali; y

poner en contacto dicho material con una solución de una sal, agente oxidante o mezcla de los mismos.

30 Preferentemente, dicha matriz de colágeno es un material tratado por liofilización.

Preferentemente, dicha matriz de colágeno tiene aproximadamente 0,1 mm a unos 3 mm de espesor.

35 Preferentemente, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con un peso molecular comprendido entre unos 4 kD y unos 300 kD, más preferentemente entre unos 150 kD y unos 250 kD, y aún más preferentemente entre unos 75 kD y unos 150 kD.

40 Preferentemente, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con un cociente de manuronato a guluronato igual o superior a aproximadamente 1.

Preferentemente, dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden un alginato obtenido de *Macrocystitis purifera*.

45 Preferentemente, dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato, alginato modificado o mezcla de los mismos.

Preferentemente, dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato.

50 Preferentemente, dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato acoplado con un péptido RGD.

55 Preferentemente, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de estroncio, iones de bario o una combinación de los mismos.

60 Preferentemente, la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio. Preferentemente, dicha primera capa de alginato gelificado comprende alrededor de 0,02 g a unos 0,2 g de polímero de alginato por cm^2 .

Preferentemente, dicho dispositivo celular está en equilibrio en una solución que comprende unos 1,8mM de iones de calcio.

65 Preferentemente, el dispositivo celular tiene entre 1 cm^2 y 4 cm^2 .

Preferentemente, el dispositivo celular comprende además un soporte estructural.

Preferentemente, el dispositivo celular comprende además un soporte estructural, donde dicho soporte estructural está colocado en la primera capa celular;

donde:

- 5 dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural; y
dicho soporte estructural es permeable a nutrientes.
- 10 Preferentemente, dicho soporte estructural comprende poliéster.
Preferentemente, dicho soporte estructural comprende una malla.
Preferentemente, dicha malla tiene una apertura de tamiz de unos 10 μm a aproximadamente 1 mm, más preferentemente, entre unos 20 μm y unos 500 μm , aún más preferentemente, unos 300 μm .
- 15 Preferentemente, el dispositivo celular comprende además un soporte estructural colocado sobre dicho segundo lado de la dicha matriz de colágeno, donde dicha segunda capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural
- 20 Preferentemente, el dispositivo celular comprende además una o más pinzas para asegurar dicho soporte estructural a dicha matriz de colágeno.
Preferentemente, dicha primera capa celular comprende entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 300.000 células.
- 25 Preferentemente, el dispositivo celular, donde dicha primera capa celular comprende células seleccionadas entre las del grupo formado por células de islote pancreático, células mesenquimales pluripotenciales, células paratiroideas, células tiroideas, células hepáticas, células neurales, células del endotelio vascular, células tiroideas, células suprarrenales, células del timo, o células ováricas.
- 30 Preferentemente, la primera capa celular comprende células del islote pancreático o células paratiroideas.
Preferentemente, la primera capa celular comprende células del islote pancreático.
- 35 Preferentemente, dicha primera capa celular comprende entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 40.000 células del islote pancreático por cm^2 .
- 40 Preferentemente, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático derivadas de un ser humano, lechón recién nacido o un cerdo adulto.
Preferentemente, el dispositivo celular comprende además una segunda capa celular absorbida en dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno, donde dicha segunda capa de alginato gelificado cubre completamente dicha segunda capa celular.
- 45 Preferentemente, el dispositivo celular comprende además un soporte estructural colocado sobre dicha segunda capa celular, donde:
dicha segunda capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural; y
- 50 dicho soporte estructural es permeable a nutrientes.
Preferentemente, dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- 55 dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio, o una combinación de los mismos.
Preferentemente, dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- 60 dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato y cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio, o una combinación de los mismos.
Preferentemente, dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y

dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato modificado y cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo formado por iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio, o una combinación de los mismos.

- 5 Preferentemente, la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio de unos 4 kD a unos 300 kD.
- 10 Preferentemente, la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio de unos 75 kD a unos 150 kD.
- 15 Preferentemente, la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 75 kD.
- 20 Preferentemente, el dispositivo celular comprende:
un soporte estructural colocado sobre la primera capa celular;
dos o más pinzas para fijar dicho soporte estructural a dicha matriz de colágeno;
- 25 donde:
dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- 30 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio; y
dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural y es permeable a nutrientes.
- 35 Preferentemente, dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático, células mesenquimales pluripotenciales, células paratiroideas, células tiroideas, células hepáticas, células neurales, células del endotelio vascular, células tiroideas, células suprarrenales, células del timo, o células ováricas.
- 40 Preferentemente, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático.
Preferentemente, dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- 45 dicha primera capa celular comprende entre unas 20.000 y unas 40.000 células del islote pancreático;
dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio entre unos 4 kD y unos 300 kD;
- 50 dicho dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende unos 1,8mM de iones de calcio;
un soporte estructural colocado en dicha primera capa celular; y
dos o más pinzas que sujetan dicho soporte estructural a dicha matriz de colágeno; donde:
- 55 dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; dicha capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio;
dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural y es permeable a nutrientes; y
- 60 dicho soporte estructural comprende una malla de poliéster.
De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se ofrece un proceso para la formación de un dispositivo celular como se describe en el presente, el cual comprende:
- 65 la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;

la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular; y

5 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno.

Preferentemente, el proceso comprende:

10 la formación de dicha primera capa celular sobre el primer lado de dicha matriz de colágeno;

la colocación de dicho soporte estructural en dicha primera capa celular;

15 la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno, dicha primera capa celular y dicho soporte estructural; y

la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno.

20 Preferentemente, el proceso comprende:

la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;

25 la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular;

la colocación de dicho soporte estructura sobre dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno;

y

30 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno y dicho soporte estructural.

Preferentemente, el proceso comprende:

35 la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;

la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular;

40 la formación de dicha segunda capa celular sobre dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno;

y

45 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno y dicho soporte estructural.

Preferentemente, el proceso comprende:

50 la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;

la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular;

55 la formación de dicha segunda capa celular sobre dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno;

la colocación de dicho soporte estructural sobre dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno; y

60 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno y dicho soporte estructural.

Preferentemente, el proceso comprende la sujeción de dicho soporte estructural a dicha matriz de colágeno.

Preferentemente, el proceso comprende:

65 (i) la formación de dicha capa de alginato gelificado siguiendo los pasos:

- la colocación de una solución de un alginato en dicho primer lado de dicha matriz de colágeno de manera que cubra completamente el primer segundo lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular; y
- 5 la gelificación de dicha solución de un alginato mediante la inmersión de la solución de alginato en una solución de iones formadores de geles;
- (ii) dicha segunda capa de alginato gelificado se forma siguiendo los pasos:
- 10 la colocación de una solución de un alginato en dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno; y
- la gelificación de dicha solución de un alginato mediante la inmersión de la solución de alginato en una solución de iones formadores de geles.
- 15 Preferentemente, dicha solución de iones formadores de geles comprende entre unos 50mM y unos 200mM de iones formadores de geles.
- Preferentemente, el proceso comprende el lavado del dispositivo celular en una solución libre de iones formadores de geles después de la formación de dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado.
- 20 Preferentemente, el proceso comprende el equilibrado del dispositivo celular en una solución de 1,8mM de iones de calcio después del procesamiento.
- 25 Preferentemente, dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático, células mesenquimales pluripotenciales, células paratiroideas y células tiroideas.
- Preferentemente, dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático.
- 30 Preferentemente, el proceso comprende:
- el tratamiento del primer lado de una matriz de colágeno tratada químicamente, liofilizada y esterilizada con una suspensión de células del islote pancreático para formar una primera capa celular, donde dicha matriz de colágeno posee un primer lado y un segundo lado;
- 35 la colocación de una malla sobre dicha primera capa celular;
- la sujeción de dicha malla a dicha matriz de colágeno;
- 40 la colocación de una solución de un alginato sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno; dicha primera capa celular, y dicha malla;
- la gelificación de dicha solución de un alginato para formar una primera capa de alginato gelificado mediante la inmersión en una solución que comprende entre 50mM y 200mM de iones de calcio;
- 45 el lavado de la primera capa de alginato gelificado con una solución que no contiene calcio;
- la colocación de una solución de un alginato sobre dicha segunda capa de dicha matriz de colágeno;
- 50 la gelificación de dicha solución de un alginato para formar una segunda capa de alginato gelificado mediante la inmersión en una solución que comprende entre aproximadamente 50mM y aproximadamente 200mM de iones de calcio;
- el lavado de dicha segunda capa de alginato gelificado con una solución sin calcio; y después de la formación de dichas primera y segunda capas de alginato gelificado el equilibrado del dispositivo celular en una solución de 1,8mM de iones de calcio.
- 55 Preferentemente, los niveles de glucosa sanguínea en ayunas de dicho paciente se controlan durante diez semanas o más.
- 60 Preferentemente, los niveles de glucosa sanguínea en ayunas de dicho paciente se controlan durante veinticuatro semanas.
- Preferentemente, uno o más de dichos dispositivos celulares se implantan subcutáneamente.
- 65 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se ofrece un dispositivo celular como se describe en el presente para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se ofrece un dispositivo celular como el que se describe en el presente para su uso en un método de tratamiento de la diabetes o regulación de los niveles de glucosa sanguínea. donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se ofrece un dispositivo celular como aquí se describe, para el uso en un método de tratamiento de hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio en sangre, donde dicha primera capa celular comprende células paratiroideas.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se ofrece un equipo para la implantación de uno o más dispositivos a un paciente que los necesita, que comprenden uno o más dispositivos celulares como aquí se describen.

Ejemplos

15 Con el fin de que la invención revelada en el presente se entienda más eficientemente, a continuación se ofrecen ejemplos. Deberá entenderse que estos ejemplos son solo ilustraciones y no deberán considerarse como limitantes de la invención en forma alguna.

Ejemplo 1

20

Aislamiento de las células del islote pancreático de cerdos

25 Se obtuvieron páncreas de cerdos adultos Landrace (>200 kg, n=10) en el matadero local (Centre A de Marbaix, Louvain-la-Neuve, Sr. Collignon) y se aislaron los islotes de la siguiente forma. Las técnicas de aislamiento y purificación se describen en las secciones de Dufrane D, *et ál.*, "Impact of porcine islet size on cellular structure and engraftment after transplantation: adult versus young pigs", *Pancreas*. 2005, 30(2):138-47; y Dufrane D. *et ál.*, "Parameters favouring successful adult pig islet isolations for xenotransplantation in "pig-to-primate" model", *Xenotransplantation*, 2006, 13:1-11, y ambos se incorporan íntegramente al presente como referencias.

30 Las colas del páncreas de donadores porcinos adultos se digirieron usando un método de digestión estática modificado como se describe en O'Neil, *et ál.*, "The isolation and function of porcine islets from market weight pigs", *Cell Transplant*. 2001, 10:235-246, que se incorpora íntegramente al presente como referencia. El páncreas se instiló con un volumen de 2 ó 3 veces (ml/gr) de Liberase PI (Roche/Boehringer Mannheim, 0,5 mg/ml) disuelto en una solución modificada de UW-M. Se inyectó el páncreas con el fin de obtener una distensión adecuada, se colocó en un frasco Nalgene estéril de 1 litro y se digirió mediante incubación estática a 37°C durante 50 min. Se finalizó la digestión mediante la adición de Ham-F10 + 20% NCS basándose en la inspección visual de la glándula. Se filtró la suspensión celular a través de un tamiz de acero inoxidable con un tamaño de poro de 1000 µm y se diluyó con Ham-F10 + 20% NCS. Siguiendo los datos anteriores obtenidos en el aislamiento de islotes humanos, el tejido digerido se pasó sobre un lecho de perlas de vidrio de 6 mm y a través de un tamiz de acero inoxidable 500. El efluente tisular se recogió con 3 ó 4 litros de Ham-F10 + 10% NCS frío en tubos cónicos de 250 ml y se centrifugó a 700 rpm a 4°C. Los islotes, células y residuos recogidos después de la columna de pre-purificación (un promedio de 8 tubos) se centrifugaron a 4°C (630 g durante 3 minutos). Todas las píldoras celulares se reunieron en un tubo y se suspendieron en 200 ml de medio Ham-F10.

45 De esta suspensión se tomaron alícuotas de 100 µl para evaluar los resultados de la digestión después de la tinción con ditizona (véase Resultado del Aislamiento). Las células se centrifugaron a 4°C (280 g durante 5 min), se eliminó el sobrenadante y se suspendieron las células en 75 ml de soluciones de Ficoll Eurocollins (Mediatech, Hemdon, Estados Unidos de América) para la purificación en tubos en gradiente (ref. nalg3122-0250; VWR International, Leuven, Bélgica).

50 Los islotes aislados mediante el método estático se purificaron a 4°C con un gradiente discontinuo Ficoll Euro-Collins. Se colocó la píldora celular pos-digestión, suspendida en 75 ml de solución Ficoll Euro-Collins (densidad = 1,1 g/cm³), en un tubo de fondo plano. Después se añadieron secuencialmente gradientes más bajos de Ficoll (50 ml de 1,096 g/cm³, 50 ml de 1,060 g/cm³ y 20 ml de medio Ham-F10). Después de la centrifugación de los tubos en gradiente a 856 g durante 17 min, se recogieron los islotes en las interfaces 1,1/1,096 y 1,096/1,060. Los islotes de cada una de las interfaces se suspendieron en 2 tubos que contenían 50 ml de suero Ham-F10 + 10% NCS. Los tubos se centrifugaron a 280 g durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con 150 ml de medio Ham-F10. Se repitió este procedimiento 3 veces y, finalmente, los islotes se suspendieron en 200 ml de medio Ham-F10 para el estudio de resultados del aislamiento.

60

Ejemplo 2

Preparación de un dispositivo celular que comprende islotes porcinos y la preparación de cápsulas comparativas de islotes porcinos

65 Preparación de las cápsulas para comparación:

Se prepararon cápsulas que contenían islotes porcinos como comparación. Los islotes porcinos recién aislados se encapsularon en una matriz de alginato SLM 100 (Lote 110064, FMC BioPolymer, Drammen, Noruega) que contenía una alta concentración de ácido manurónico (High-M, 56%). Se diluyó el alginato liofilizado (viscosidad: 174 mPas; endotoxina < 25 UE/g), en un tampón de lavado MOPS IX (Inotech Encapsulation AG, Dottikon, Suiza) a una concentración de 1% p/v. Las células del islote porcino se suspendieron en alginato a una concentración de 10.000 células del islote/ml, y se hizo la encapsulación usando el dispositivo Inotech Encapsulation AG (número de serie: LS-01.005; Dottikon, Suiza).

La calidad de la cápsula se evaluó por microscopía (con una muestra de 100 cápsulas) con el fin de determinar el diámetro de la cápsula y el porcentaje de cápsulas malformadas y rotas (ver Figura 1).

Preparación del dispositivo celular

Se obtuvo la fascia lata de donadores seleccionados siguiendo las normas comunes de la European Association of Musculo Skeletal Transplantation (EAMST, Viena, 1997) (Asociación Europea de Trasplantes Musculoesqueléticos). Los donadores pueden seleccionarse considerando una revisión de la historia médica, incluidos los factores de riesgo con respecto a las encefalopatías espongiiformes subagudas. Se pueden llevar a cabo pruebas serológicas mínimas, que incluyen la detección de VIH-1 y 2 y VLTH-1, hepatitis B y C y sífilis. El empleo de un aloinjerto puede excluirse si los resultados presentan un riesgo de transmisión de estos agentes. La obtención debe hacerse en un quirófano o instalaciones de depósito de cadáveres adecuadas. Todos los instrumentos y equipo de obtención deberán ser esterilizados. La fascia lata puede lavarse con una solución salina fisiológica esterilizada a temperatura ambiente hasta que se transporte al banco de tejidos.

La fascia lata se despojó mecánicamente de su tejido conectivo externo suelto, incluidos el tejido adiposo, los vasos y los nervios. El material restante se cortó en pedazos muy pequeños (1 cm²) y se lavó usando lavado por pulsos. La matriz de colágeno humano se trató químicamente (detergentes disolventes) y físicamente (irradiación gamma), como se ha descrito previamente en Dufrane D, *et ál.*, "Physical and chemical processing for a human dura mater substitute", *Biomaterials*, 202; 23(14):2979-88, que se incorpora al presente íntegramente como referencia. El tratamiento químico desarrollado por el Banco Universitario de Tejidos está compuesto por una serie de pasos múltiples. La relación entre la fascia lata y las soluciones químicas fue de 0,2 g/cm² de fascia lata por litro de solución. Inicialmente, los pedazos se desengrasaron extensamente en tres baños de acetona absoluta seguidos por dos baños de etanol a 70°C. A continuación, y se inactivaron los priones con hidróxido de sodio (1N) a temperatura ambiente durante 1 hora. La reducción de la inmunogenicidad se obtuvo mediante la coagulación de las proteínas, la precipitación de ácidos nucleares y la degradación de la membrana celular con cloruro de sodio (7% p/v) durante 1 hora y peróxido de hidrogeno (7% p/v) durante 15 horas. Después de cada procedimiento, se lavaron intensamente los pedazos de la fascia lata con un flujo continuo de agua destilada (6 l/min). Adicionalmente, los aloinjertos se liofilizaron durante tres días consecutivos (vacío de trabajo 1 x 10⁻⁶ Hg, temperatura de conservación de -30°C y temperatura del refrigerante de -196°C). La humedad residual final, medida previamente en otras muestras (por análisis gravimétrico a 100°C) para el mismo liofilizador fue de <1% del peso seco final. El tejido se envasó en una bolsa de plástico doble y se esterilizó con radiación gamma a 25.000 Gy (IBA Mediris, Fleurus, Bélgica). Después, el injerto fue almacenado a temperatura ambiente.

Los islotes porcinos recién aislados se colocaron en una matriz de colágeno humano tratada y liofilizada. Se colocó un filtro de poliéster (apertura del tamiz 300 µm, Spectrum Laboratories Inc., C.A, Estados Unidos de América) sobre la capa celular y se fijó con una pinza de titanio (Ethicon Endo Surgery Inc.; Johnson and Johnson Company, OH, Estados Unidos de América). Usando una jeringa de 1 ml se colocó la matriz de alginato SLM 100 (Lote 304051; FMC BioPolymer, Drammen, Noruega) 3% p/v y fue reticulada durante 5 minutos en una solución tampón de lavado de CaCl₂ 100mM MOPS IX (Inotech Encapsulation AG, Dottikon, Suiza). El dispositivo celular de una capa (MCD, de sus siglas en inglés) se lavó después dos veces con un tampón MOPS IX sin calcio durante 4 minutos y el MCD se cultivó durante toda la noche (véase a continuación). Después del cultivo, se eliminó el medio y el MCD se lavó con tampón MOPS IX sin calcio durante 2 minutos. Después del reticulado, se eliminó la solución de calcio y se lavó dos veces con una solución de MOPS IX. Se puso una matriz de alginato SLM 1 p/v adicional en contacto con una matriz de colágeno humano y fue reticulada en la forma descrita previamente. El dispositivo celular de una capa (MCD) se lavó dos veces con un tampón MOPS IX sin calcio durante 4 minutos.

Cultivo de las cápsulas y MCD antes del trasplante:

El mejor régimen de cultivo para obtener la estabilidad óptima de los islotes encapsulados porcinos fue el cultivo en 17 ml CMRL 1066 a 1,8mM CaCl₂ durante 18 horas, en un matraz tratado de cultivo no tisular de 75 cm² a una concentración de 10.000 cápsulas 1 matraz en un medio sin suero (Dufrane D., *et ál.*, "Six month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: Proof of Concept", *Transplantation*, 2006, 81(9):1345-53, que se incorpora íntegramente al presente como referencia).

Ejemplo 3

Implante de dispositivos celulares que comprenden islotes porcinos a monos Cynomolgus y comparación con islotes porcinos microencapsulados

5 Se alojaron monos Cynomolgus (3-6 años de edad; 4-6 kg) siguiendo las directrices del Ministerio de Agricultura y Cuidados Animales de Bélgica. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Cuidados Animales local de la Universidad Católica de Louvain. Se diluyó estreptozotina (STZ) esterilizada por filtración (Sigma, Bornem, Bélgica) en 100mM de citrato de sodio a 25 mg/ml (pH 4,5) y se administró por vía intravenosa durante 5 minutos a los primates (en la vena femoral) a 50 mg/kg de peso. Se evaluó la función hepática antes, y después de una y 4 semanas después de la inyección de STZ mediante la evaluación del aspartato aminotransferasa sérica (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en suero, mientras que la función renal fue evaluada mediante la creatinina plasmática (Kodak Ektachem DTSC 11; Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY, Estados Unidos de América). La función endocrina pancreática se evaluó en los mismos puntos de tiempo monitorizando la glucosa sanguínea en suero en ayunas (durante la noche) (FBG) y haciendo las pruebas de tolerancia a la glucosa por vía intravenosa (IVGTI). La IVGTT se inició después del ayuno durante la noche mediante una inyección de bolo por vía intravenosa de 0,5 g/kg de peso corporal con 50% p/v de glucosa. Se tomaron muestras de sangre después de la administración de glucosa a los 0,1, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos a los primates. Se determinaron las concentraciones de glucosa en suero usando Kodak Ektachem DT60 II (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY, Estados Unidos de América). Para cada IVGTT se calcularon el área bajo la curva de glucosa (ABC) (integrada entre 0 y 90 minutos) comparada con la concentración media antes de IVGTT (-5 min) y el valor de glucosa K (entre 1 y 30 min). Se midieron, en suero, los niveles de C-péptido humano e insulina (en primates) usando un equipo de radioinmunoanálisis (RIA) siguiendo el protocolo del fabricante (Lico Research, Nuclilab BV, BB EDE, Países Bajos). Dufrane D, *et ál.*, "Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity", *Transplantation*, 2006, 81(1):36-45, que se incorpora al presente íntegramente como referencia

Todos los animales tratados con STZ mostraron las características clínicas de T1DM, entre las que figuran poliuria (intervalo: 380-100 ml), polidipsia (intervalo: 870-2160 ml), pérdida de peso (una reducción media del 27% del peso inicial después de 4 semanas de inducción de la diabetes), hiperglucemia persistente en ayunas (intervalo: 153-483 mg/dl), glucosuria (1000 mg/dl), prueba de tolerancia intravenosa patológica a la glucosa (IVGTT, para la absorción de glucosa, secreción de insulina y C-péptido) y hemoglobina glucosilada mayor del 13%. Se indujo la diabetes con estreptozotocin (50 mg/kg) 4-8 semanas antes del trasplante (Figura 4).

Trasplante:

Después de la anestesia, se administraron a cada animal 15.000 islotes microencapsulados equivalentes a (IEQ)/kg de cuerpo recipiente, obtenidos con una jeringa de 10 ml. Se administró a los animales en el control positivo la misma cantidad de islotes porcinos no encapsulados bajo la cápsula renal. El animal en el control negativo recibió un volumen de cápsulas vacías correspondiente al volumen de 15.000 EQ/kg de islotes porcinos encapsulados (una media de 7 ml). Cada uno de los injertos se trasplantó bajo la cápsula de un riñón por primate. En el modelo preclínico cerdo-a-primate hemos demostrado que perlas de alginato simples pueden proteger los islotes de cerdo adulto contra el xenorechazo. Sin embargo, no demostramos que los islotes de cerdo adulto encapsulados puedan controlar la diabetes en monos cinomolgus tratados con STZ. Basándonos en nuestros estudios anteriores, decidimos trasplantar islotes de cerdo adulto microencapsulados con alginato bajo las cápsulas renales de monos cynomolgus con diabetes inducida con STZ.

Se hizo el trasplante de islotes porcinos encapsulados con alginato bajo la cápsula renal de monos cynomolgus diabéticos por inducción con STZ con el fin de comparar estos resultados con los obtenidos previamente en animales no diabéticos (Figura 3, A, bajo la cápsula renal). Los MCD se colocaron subcutáneamente (Figura 3, B). El trasplante se hizo siguiendo el protocolo mostrado en la Figura 4. A continuación se muestran los grupos experimentales.

Grupos experimentales y protocolo:

- I. Control positivo (Ctrl+): se hizo el trasplante a dos animales de 20.000 IEQ/kg de islotes porcinos no encapsulados bajo la cápsula renal.
- II. Control simulado: se hizo el trasplante a dos animales de un volumen medio de 16 ml de cápsulas de alginato vacías bajo la cápsula renal.
- III. Animales tratados: se hizo el trasplante a cuatro animales de islotes porcinos encapsulados bajo la cápsula renal.

El primate 1 recibió 24.327 IEQ/kg, lo que corresponde a 14 ml de volumen de injerto.

El primate 2 recibió 15.985 IEQ/kg, lo que corresponde a 12 ml de volumen de injerto.

El primate 3 recibió 31.750 IEQ/kg, lo que corresponde a 17 ml de volumen de injerto.

5 El primate 4 recibió 28.385 IEQ/kg, lo que corresponde a 15 ml de volumen de injerto.

IV. Animales tratados: se hizo el trasplante a cuatro animales de un MCD por vía subcutánea

El primate 5 recibió 28.905 IEQ/kg, lo que corresponde a 3 MCD.

10

El primate 6 recibió 27.210 IEQ/kg, lo que corresponde a 4 MCD.

El primate 7 recibió 33.333 IEQ/kg, lo que corresponde a 4 MCD.

15

El primate 8 recibió 33.568 IEQ/kg, lo que corresponde a 4 MCD.

A. Resultados con Cápsulas en comparación con Control

20 Se observó una elevación significativa de FBG después de la inducción de la diabetes (con STZ) y antes del trasplante (Figura 5: Semana -4 hasta Semana 0). No se observaron correcciones de FBG en los monos cynomolgus que recibieron trasplantes con cápsulas vacías (n=2) o islotes porcinos no encapsulados (n=2), confirmando así la validez de nuestro modelo in vivo. En estos animales, no se observó corrección de la poliuria, polidipsia, glucosuria (1000 mg/dl) y pérdida de peso corporal (-30% entre las Semanas 0 y 10/12). Entre las semanas 10 y 12 después del trasplante, todos los animales presentaron hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}) de

25 >13%. Fueron entonces sacrificados y se extrajeron los injertos y los páncreas. Las cápsulas vacías que se extrajeron de los animales simulados no demostraron reacciones contra un cuerpo extraño ni se observaron indicaciones de supervivencia de los islotes porcinos en los riñones trasplantados con islotes porcinos no encapsulados.

30 Los páncreas de los Cynomolgus diabéticos inducidos con STZ se fijaron y tiñeron con respecto a la insulina para determinar la densidad del volumen de islotes residuales por histomorfometría. Se encontró que una media de 97% de la densidad del volumen de los islotes había sido destruida después de más de 14 semanas de inducción de la diabetes.

35 Después del trasplante de islotes porcinos encapsulados, se observó una reducción significativa de FBG una semana después del xenotrasplante (Figura 5). La reducción en FBG estuvo asociada con dos primates (primates 3 y 4) con una reducción significativa de la glucosuria. durante la primera semana después del trasplante (1000 a 100 mg/dl). Además, se observó una reducción significativa en la polidipsia (-60% del volumen antes del trasplante) y poliuria (-67% del volumen antes del trasplante) durante la primera semana después del trasplante. Entre dos y seis

40 semanas después del trasplante, se observaron el aumento progresivo de FBG, poliuria, polidipsia y glucosuria (1000 mg/dl). Se decidió entonces extraer los islotes porcinos encapsulados después de 6 semanas del trasplante con el fin de estudiar la calidad de la remoción del injerto. Después de la explantación del injerto, no se observó ninguna indicación de fibrosis del injerto (Figura 6: A y B) y menos del 5% de las cápsulas extraídas estaban rotas y caracterizadas por sobrecrecimiento celular (Figura 6C). Una media del 60% de las cápsulas recuperadas después

45 de la explantación del injerto estaban formadas por islotes de ditizona (Figura 6C). Sin embargo, usando microscopía electrónica se demostró la presencia de necrosis en islotes centrales con sufrimiento celular en muchas cápsulas (no se muestran los datos). Por lo tanto, decidimos desarrollar un sistema de macroencapsulación de una capa usando alginato como la membrana protectora de los islotes xeno-porcinos.

50 Fueron necesarios varios intentos (no se muestran los datos) para obtener el diseño más apropiado y obtener un dispositivo celular de una capa (MCD). Ya que el MCD no puede implantarse fácilmente bajo la cápsula renal de los primates (espacio insuficiente y riesgo de trastornos al MCD), se trasplantó en el espacio subcutáneo. Seleccionamos este último ya que habíamos demostrado previamente en ratas que este lugar era biocompatible y también porque parece que el espacio subcutáneo es un lugar aplicable clínicamente.

55

B. Resultados con el MCD:

Después del trasplante, se corrigió la diabetes significativamente en los primates a los que se había trasplantado el MCD en comparación con los que recibieron islotes porcinos encapsulados bajo la cápsula renal (Figura 7). Se

60 observaron la regulación de la glucosa sanguínea en ayunas (entre 48-107 mg/dl, Figura 7), la reducción de la glucosuria (1000 mg/dl antes del trasplante a 0 mg/dl después del trasplante), y la reducción de la poliuria (>70%) y polidipsia (>70%).

65 Se alcanzó una mejora significativa en el control de la diabetes durante hasta 24 semanas en primates a los que se habían trasplantado islotes porcinos encapsulados en MCD (Figura 8, inferior). En comparación, se obtuvo un

control de menor duración de la glucosa sanguínea en ayunas en el caso de los islotes porcinos microencapsulados (menos de 2 semanas después del trasplante) (Figura 8, inferior).

5 Se estudió el curso del peso corporal después del trasplante del MCD (Primates 5-8) en comparación con islotes porcinos microencapsulados (n=4) y control positivo (islotes porcinos no encapsulados) y cápsula vacía (simulado) (Figura 9). Se alcanzó una mejora significativa en el peso corporal durante hasta 24 semanas en los primates a los que se trasplantaron islotes porcinos encapsulados en el MCD (Figura 9, superior). En comparación, se obtuvo una pequeña mejoría en el peso corporal con los islotes porcinos microencapsulados (Figura 9, superior).

10 Se estudió el curso de la puntuación beta (medidas integradas de glucosa sanguínea en ayunas/glucosuria 24 h/glucosuria 2 h después de alimentos/poliuria/polidipsia) después del trasplante de MCD (primates 5-8) en comparación con islotes porcinos microencapsulados (primates 1-4) (Figura 10). Antes del trasplante, la inducción de la diabetes provocó una reducción significativa de la puntuación beta (10 a 0 antes y después de la inducción de la diabetes, respectivamente) que corresponde a la diabetes con glucosuria, poliuria, polidipsia y elevación en la glucosa sanguínea en ayunas. Se obtuvo una mayor corrección MCD en comparación con los islotes porcinos microencapsulados (Figura 10). Por ejemplo, se corrigió la diabetes en los primates 5 y 9 durante hasta una media de 20 semanas después del trasplante. Se observó una disminución gradual de la función entre las semanas 24 y 34 después del trasplante (Figura 11). Entonces, se decidió re-trasplantar exactamente en la misma posición que el primer injerto. Nuevamente se controló la diabetes durante hasta 10 semanas después del re-trasplante (Figura 11).

20 Se siguió el curso del HbA_{1c} a partir del momento de la inducción de la diabetes mediante STZ (Figura 15). Los monos normoglucémicos mostraron un intervalo de HbA_{1c} entre 4,8% y 7,2%. Después del tratamiento con STZ, todos los primates diabéticos se caracterizaron por un HbA_{1c} de más del 13% (límite del equipo de detección repetido 4 veces antes del trasplante). No se observó corrección alguna del HbA_{1c} hasta 10-12 semanas en los primates que recibieron un trasplante de islotes porcinos no encapsulados (Ctrl+, media de dos primates) y cápsulas vacías (simulado, media de dos primates) (Figura 15), que confirmaron la ausencia o rechazo de los islotes y el estado de la diabetes. Los primates diabéticos adicionales no mostraron una corrección del HbA_{1c} hasta seis meses después de la inducción de la diabetes (HbA_{1c}>13%, n=4). Después del trasplante de islotes porcinos encapsulados (primates 1 a 4), no se obtuvo la medición de HbA_{1c} después del trasplante ya que todos los animales fueron sacrificados antes de transcurridas ocho semanas después del trasplante (Figura 15). Se tomó esta decisión ya que no se había observado una regulación significativa de FBG en estos casos después del trasplante (Figura 5).

35 Cuando los primates recibieron un trasplante con el MCD, se observó una reducción significativa de HbA_{1c} después de ocho semanas después del trasplante (Figura 15). Se confirmó esta reducción después de 12 y 16 semanas después del trasplante (Figura 15) y continuó durante hasta un máximo de 24 semanas. En dos casos, la disfunción del injerto estuvo relacionada con una re-elevación de HbA_{1c} hasta 34 semanas después del trasplante. Después del re-trasplante (en gris), se controló nuevamente la diabetes con una reducción significativa del HbA_{1c} (primate 5: HbA_{1c} de 9,6, 11,3 a las 42 semanas y 48 semanas, respectivamente; primate 8: HbA_{1c} de 7,4 y 8,5 a las 42 semanas y 48 semanas, respectivamente).

40 Se midió el curso del C-péptido porcino y el curso de la glucosa sanguínea en ayunas en el primate 8 después del primer y segundo trasplantes de islotes porcinos encapsulados en el MCD (Figura 12). Antes del trasplante, la inducción de la diabetes indujo una elevación significativa de la glucosa sanguínea en ayunas y ningún péptido-C porcino (la flecha indica el trasplante del injerto). En este mono, se corrigió la diabetes hasta una media de 22 semanas después del trasplante asociada con la detección del C-péptido porcino en el suero del primate. Se observó una disminución gradual entre las semanas 24 y 34 después del trasplante. Después se decidió re-trasplantar exactamente en el mismo lugar que para el primer injerto. Nuevamente se controló la diabetes hasta 10 semanas después del re-trasplante en presencia del C-péptido porcino.

50 Se obtuvo una respuesta humoral mediante el trasplante de islotes porcinos encapsulados (Figura 13). Aunque se observó un aumento de anticuerpos IgM e IgG antiporcinos en el suero del primate de los animales a los que se trasplantaron islotes porcinos en el MCD, los injertos funcionan hasta un máximo de 24 semanas después del trasplante. El re-trasplante de la matriz subcutánea vuelve a inducir una respuesta humoral que no induce la destrucción del injerto.

55 En el primate 8, se extrajeron los injertos 34 semanas después del trasplante al ocurrir la disfunción (Figura 14, A, B y C). Los injertos se extrajeron fácilmente sin ninguna fibrosis (sin infiltración de linfocitos ni macrófagos) y vasos circundantes (tinción vWF) (Figura 14, C), pero con necrosis de los islotes (tinción con azul de toluidina) (Figura 14, D). Los segundos injertos se colocaron en el mismo lugar (Figura 14, E (segundo MCD); Figura 14, F (lugar de reimplantación)).

60

Ejemplo 4

Revascularización de los dispositivos celulares después del implante

5 La fascia lata posee la capacidad de ser recolonizada mediante estructura vascular y mejora la oxigenación celular. Se preparó un dispositivo celular (MCD) de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 2, excepto en que no se añadieron células del islote al dispositivo. Después, se implantó subcutáneamente el MCD en el tejido muscular paravertebral de ratas Wistar (Figura 16). Después de la implantación de la fascia lata en el tejido muscular (Figura 16A, después de un mes), la fascia lata es recolonizada completamente esencialmente por estructura de vasos 3 meses después de la implantación (Figura 16B, después de tres meses). La inmunotinción para el factor de Willebrandt indica la revascularización de la fascia lata (la flecha indica vasos) (Figura 17).

Ejemplo 5

15 Preparación e implantación de los dispositivos celulares que comprenden células paratiroides

El dispositivo de encapsulación se desarrolló alternativamente para tratar pacientes con una función hipoparatiroidea asociada con un nivel muy bajo de calcio sanguíneo. El hipoparatiroidismo es causado por un déficit de la hormona paratiroidea (PTH), producida por las glándulas paratiroides, la cual regula los niveles de calcio sanguíneo.

20 Se preparó un dispositivo celular siguiendo un procedimiento análogo al usado para preparar el MCD en el Ejemplo 2, excepto en que se emplearon células paratiroides en lugar de los islotes. Se hicieron experimentos con un modelo de trasplante de humano a rata (ratas Wistar). Se extirparon los paratiroides de un paciente humano que padecía adenoma paratiroidea. Los paratiroides se picaron en pedazos pequeños de 3 mm x 3 mm (Figura 18A).

25 Se designaron tres grupos:

Animales Ctrl+: glándulas paratiroides no encapsuladas (Figura 18B);

30 Animales simulados: dispositivo de encapsulación sin glándulas paratiroides;

Animales tratados con glándulas paratiroides encapsuladas (Figura 19B).

35 Los dispositivos se trasplantaron subcutáneamente (Figura 20) a ratas Wistar. El trasplante de la glándula paratiroidea humana encapsulada demostró que el nivel de calcio en suero puede aumentarse significativamente (ratas 1 y 2) en comparación con la falta de corrección en el caso del trasplante de la glándula paratiroidea no encapsulada (Ctrl+, rechazo del injerto) y el dispositivo vacío encapsulado (simulado) (Figura 21).

Ejemplo 6

40 **(profético)**

Preparación e implante de dispositivos celulares que comprenden células tiroideas

45 Se preparó un dispositivo celular siguiendo un procedimiento análogo al empleado para preparar el MCD en el Ejemplo 2, excepto en que se emplearon células tiroideas en lugar de los islotes. Los experimentos se hicieron usando un modelo de trasplante de humano a rata (ratas Wistar). Los dispositivos se trasplantaron subcutáneamente a ratas Wistar.

50 Ejemplo 7

(profético)

55 Preparación e implante de dispositivos celulares que comprenden células mesenquimales pluripotenciales (MSC)

60 Se preparó un dispositivo celular siguiendo el método empleado para preparar el MCD en el Ejemplo 2, excepto en que se emplearon MSC (10 millones de células por 3 cm² de fascia lata). El MCD se cultivó durante una a dos semanas para inducir el enlace y la proliferación celular. Entonces, el dispositivo se trasplantó al tejido subcutáneo de un paciente.

Ejemplo 8

65 **(profético)**

Preparación de un dispositivo celular

El dispositivo celular se preparó siguiendo el método usado para preparar el MCD del Ejemplo 2, excepto en que se usó 5% Pronova SLM₂₀ (NovaMatrix, FMC Biopolymer, Noruega) en lugar de las soluciones SLM₁₀₀.

- 5 En esta solicitud se reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense 60/814,404, registrada el 16 de junio de 2006.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo celular que comprende:
- 5 (a) una matriz de colágeno que tiene un primer y un segundo lado;
- (b) una primera capa celular absorbida en dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;
- 10 y
- (c) una primera capa de alginato gelificado y una segunda capa de alginato gelificado; donde dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular; y donde la segunda capa de alginato gelificado cubre completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno.
- 15 2. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho dispositivo celular posee un nivel de endotoxinas inferior a 100 UE/g.
- 20 3. Un dispositivo celular de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata.
4. Un dispositivo celular de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana.
- 25 5. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha matriz de colágeno es un material esterilizado por radiación gamma.
6. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha matriz de colágeno es un material que se trata químicamente, donde dicho tratamiento químico comprende:
- 30 sumergir dicho material en un disolvente desengrasante;
- poner en contacto dicho material con una solución alcalina; y
- 35 poner en contacto dicho material con una solución de sal, agente oxidante o mezcla de los mismos.
7. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicha matriz de colágeno es un material tratado por liofilización.
- 40 8. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicha matriz de colágeno tiene un espesor comprendido entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 3 mm.
9. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con un peso molecular promedio de unos 4 kD a unos 300 kD.
- 45 10. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con un peso molecular promedio de unos 150 kD a unos 250 kD.
- 50 11. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con un peso molecular promedio de unos 75 kD a unos 150 kD.
- 55 12. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato con una relación entre manuronato y guluronato igual o superior a 1.
- 60 13. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden un alginato derivado de *Macrocystitis purifera*.
- 65 14. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato, un alginato modificado o una mezcla de los mismos.

15. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato.
- 5 16. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato enlazado a un péptido RGD.
- 10 17. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo que comprende iones de calcio, iones de estroncio, iones de bario o una combinación de los mismos.
- 15 18. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio.
19. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde dicha primera capa de alginato gelificado comprende unos 0,02 g a unos 0,2 g de polímero de alginato por cm^2 .
- 20 20. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde dicho dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende alrededor de 1,8mM de iones de calcio.
21. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde 1 cm^2 a unos 4 cm^2 [sic].
- 25 22. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende además un soporte estructural.
23. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende además un soporte estructural, donde dicho soporte estructural está colocado en la primera capa celular, donde:
- 30 dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural; y
dicho soporte estructural es permeable a nutrientes.
- 35 24. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 22, donde dicho soporte estructural comprende poliéster.
25. Un dispositivo celular de acuerdo con las reivindicaciones 23 ó 24, donde dicho soporte estructural comprende una malla.
- 40 26. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 25, donde dicha malla tiene una apertura de tamiz de unos $10 \mu\text{m}$ a unos 1 mm.
27. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 25, donde dicha malla tiene una apertura de tamiz de unos $20 \mu\text{m}$ a unos $500 \mu\text{m}$.
- 45 28. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 25, donde dicha malla tiene una apertura de tamiz de unos $300 \mu\text{m}$.
- 50 29. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende además un soporte estructural colocado sobre el segundo lado de dicha matriz de colágeno, donde dicha segunda capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural.
30. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, que comprende además una o más pinzas para fijar dicho soporte. estructural a dicha matriz de colágeno.
- 55 31. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde dicha primera capa celular comprende entre unas 5.000 y unas 300.000 células.
- 60 32. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde dicha primera capa celular comprende células seleccionadas entre las del grupo que comprende células del islote pancreático, células mesenquimales pluripotenciales, células paratiroides, células tiroideas, células hepáticas, células neurales, células del endotelio vascular, células tiroideas, células suprarrenales, células del timo y células del ovario.
33. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático o células paratiroides.

34. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático.
- 5 35. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, donde dicha primera capa celular comprende entre unas 20.000 y unas 40.000 células del pancreático por cm^2 .
36. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde dicha [sic] comprende células del islote pancreático derivadas de un humano, un lechón o un cerdo adulto.
- 10 37. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende además una segunda capa celular absorbida sobre dicha segunda capa de dicha matriz de colágeno, donde dicha segunda capa de alginato gelificado cubre completamente dicha segunda capa celular.
- 15 38. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 37, que comprende además un soporte estructural colocado sobre dicha segunda capa celular, donde:
- dicha segunda capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural; y
- 20 dicho soporte estructural es permeable a nutrientes.
39. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- 25 dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo que comprende iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio y una combinación de los mismos.
- 30 40. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato y cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo que comprende iones de calcio, iones de bario, 35 iones de estroncio o una combinación de los mismos.
41. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- 40 dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente un alginato modificado y cationes multivalentes seleccionados entre los del grupo que comprende iones de calcio, iones de bario, iones de estroncio o una combinación de los mismos.
- 45 42. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- 50 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio de unos 4 kD a unos 300 kD.
43. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- 55 la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio de unos 75 kD a unos 150 kD.
- 60 44. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- la matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana; y
- 65 la primera capa de alginato gelificado y la segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio inferior a unos 75 kD.
45. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:

- un soporte estructural colocado sobre dicha primera capa celular;
- dos o más pinzas para sujetar dicho soporte estructural a dicha matriz de colágeno;
- 5 donde:
- dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- 10 dicha capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio; y
- dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural y es permeable a los nutrientes.
- 15 46. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 45, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático, células mesenquimales pluripotenciales, células paratiroideas, células tiroideas, células hepáticas, células neurales, células del endotelio vascular, células tiroideas, células suprarrenales, células del timo y células del ovario.
- 20 47. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 45, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático.
48. Un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- 25 dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- dicha primera capa celular comprende entre unas 20.000 y unas 40.000 células de islote pancreático;
- 30 dicha primera capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio y un alginato con un peso molecular promedio de unos 4 kD a unos 300 kD.
- dicho dispositivo celular está equilibrado en una solución que comprende alrededor de 1,8mM de iones de calcio;
- 35 un soporte estructural colocado sobre dicha primera capa celular; y
- dos o más pinzas para fijar dicho soporte estructural a dicha matriz de colágeno;
- donde:
- 40 dicha matriz de colágeno comprende un material derivado de la fascia lata humana;
- dicha capa de alginato gelificado y segunda capa de alginato gelificado comprenden independientemente iones de calcio;
- 45 dicha primera capa de alginato gelificado cubre completamente dicho soporte estructural y es permeable a nutrientes; y
- dicho soporte estructural comprende una malla de poliéster.
- 50 49. Un proceso para la formación de un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, y 39 a 45, que comprende:
- 55 la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno; formando dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular; y
- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno.
- 60 50. Un proceso para la formación de un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, que comprende:
- la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;
- 65 la colocación de dicho soporte estructural sobre dicha primera capa celular;

la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno, dicha primera capa celular y dicho soporte estructural; y la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno.

- 5 51. Un proceso para la formación de un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 29, que comprende:
- la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;
- 10 la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular
- la colocación de dicho soporte estructural sobre dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno;
- 15 y
- la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno y dicho soporte estructural.
- 20 52. Un proceso para la formación de un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 37, que comprende:
- la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;
- la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular;
- 25 la formación de una segunda capa celular sobre el segundo lado de dicha matriz de colágeno;
- y
- 30 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno y dicha capa celular.
53. Un proceso para la formación de un dispositivo celular de acuerdo con la reivindicación 38, que comprende:
- 35 la formación de dicha primera capa celular sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno;
- la formación de dicha primera capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular;
- 40 la formación de una segunda capa celular sobre el segundo lado de dicha matriz de colágeno;
- la colocación de dicho soporte estructural sobre dicha segunda capa celular; y
- 45 la formación de una segunda capa de alginato gelificado de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno, dicha segunda capa celular y dicho soporte estructural.
54. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51 y la reivindicación 53, que comprende además la fijación de dicho soporte estructural a dicha matriz de colágeno.
- 50 55. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 54, donde:
- (i) dicha primera capa de alginato gelificado se forma siguiendo los pasos:
- 55 la colocación de una solución de un alginato sobre dicho primer lado de dicha matriz de colágeno de manera que cubra completamente el primer segundo lado de dicha matriz de colágeno y dicha primera capa celular; y
- la gelificación de dicha solución de un alginato mediante la inmersión de la solución de alginato en una solución de iones formadores de geles;
- 60 (ii) dicha segunda capa de alginato gelificado se forma siguiendo los pasos:
- la colocación de una solución de un alginato sobre el segundo lado de dicha matriz de colágeno de manera que cubra completamente dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno; y
- 65 la gelificación de dicha solución de un alginato mediante la inmersión de la solución de alginato en una solución de iones formadores de geles.

56. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 55, donde dicha solución de iones formadores de geles comprende unos 50mM a unos 200mM de iones formadores de geles.
57. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 56, que comprende además el lavado del dispositivo celular en una solución que no contiene iones formadores de geles después de la formación de dicha primera capa de alginato gelificado y dicha segunda capa de alginato gelificado.
58. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 57, que comprende además equilibrar el dispositivo celular en una solución 1,8mM de iones de calcio después del procesamiento.
59. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48 a 58, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático, células mesenquimales pluripotenciales, células paratiroides y células tiroideas.
60. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 58, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático.
61. Un proceso para la formación de un dispositivo celular, que comprende:
- el tratamiento del primer lado de una matriz de colágeno tratada químicamente, liofilizada y esterilizada con una suspensión de células del islote pancreático para formar una primera capa celular, donde dicha matriz de colágeno tiene un primer lado y un segundo lado;
- la colocación de una malla sobre dicha primera capa celular;
- la fijación de dicha malla a dicha matriz de colágeno;
- la colocación de una solución de un alginato sobre el primer lado de dicha matriz de colágeno de manera que cubra completamente dicho primer lado de dicha matriz de colágeno, dicha primera capa celular; y dicha malla; la gelificación de dicha solución de un alginato para formar una primera capa de alginato gelificado mediante la inmersión de una solución que comprende entre unos 50mM y unos 200mM de iones de calcio;
- el lavado de la primera capa de alginato gelificado con una solución que no contiene calcio;
- la colocación de una solución de un alginato sobre dicho segundo lado de dicha matriz de colágeno;
- la gelificación de dicha solución de alginato para formar una segunda capa de alginato gelificado mediante la inmersión en una solución que comprende entre unos 50mM y unos 200mM de iones de calcio;
- el lavado de la segunda capa de alginato gelificado con una solución que no contiene calcio; y
- después de la formación de dichas primera y segunda capas de alginato gelificado, equilibrar el dispositivo celular en una solución de 1,8mM de iones de calcio.
62. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
63. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 y 39 a 48 para su uso en un método de tratamiento de diabetes o regulación de los niveles de glucosa sanguínea, donde dicha primera capa celular comprende células del islote pancreático.
64. Un dispositivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y 39 a 46 para su uso en un método de tratamiento del hipoparatiroidismo o regulación de los niveles de calcio en sangre, donde dicha primera capa celular comprende células paratiroides.
65. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 64, donde los niveles de glucosa sanguínea en ayunas de dicho paciente se controlan durante diez semanas o más.
66. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 64, donde los niveles de glucosa sanguínea en ayunas de dicho paciente se controlan durante hasta veinticuatro semanas.
67. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 62 a 66, donde los mencionados uno o más dispositivos celulares se implantan subcutáneamente.
68. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 62 a 67, donde tres o cuatro dispositivos celulares se implantan en el paciente.

69. Un equipo para la implantación de uno o más dispositivos en un paciente que lo requiere, que comprende uno o más dispositivos celulares de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48.

Fig. J

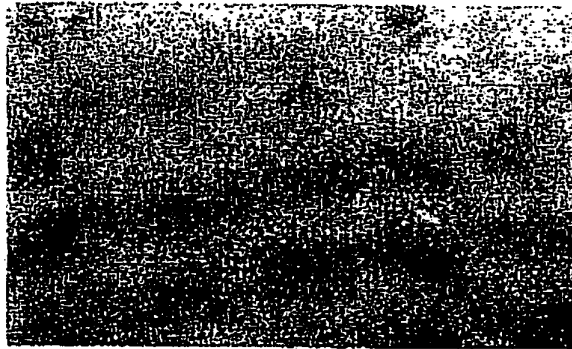


Fig. 2

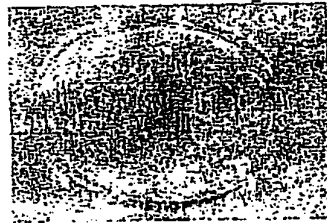


Fig. 3

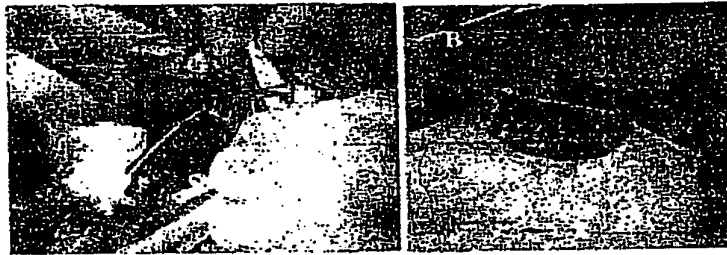


Fig. 4

Se siguió el siguiente protocolo (Figura 8):

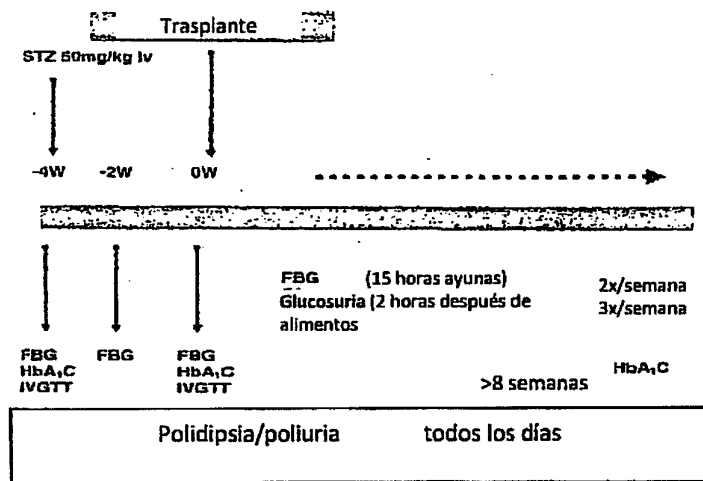


Fig. 5

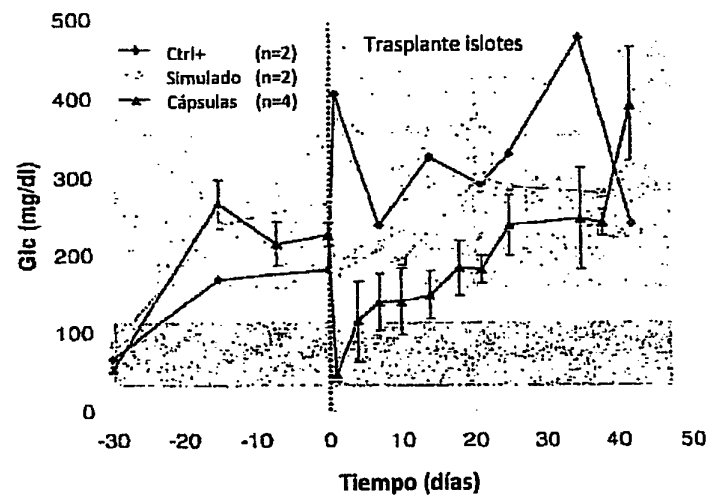


Fig. 6

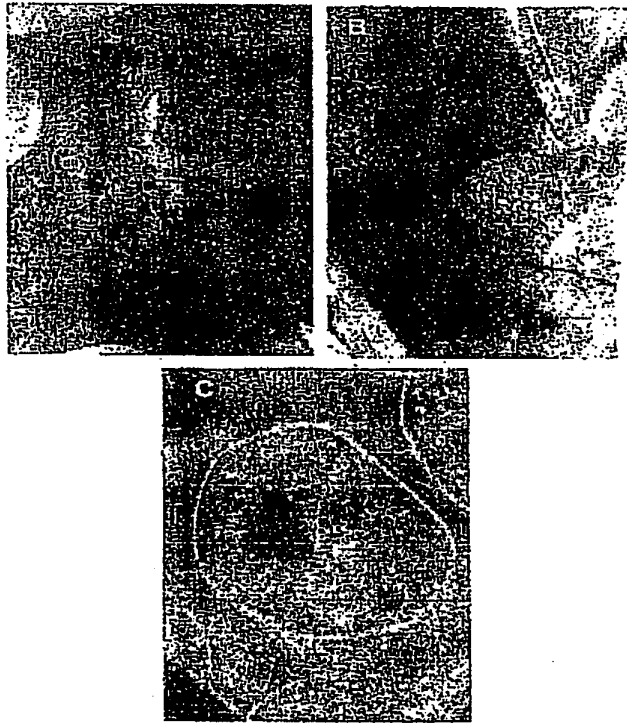


Fig. 7

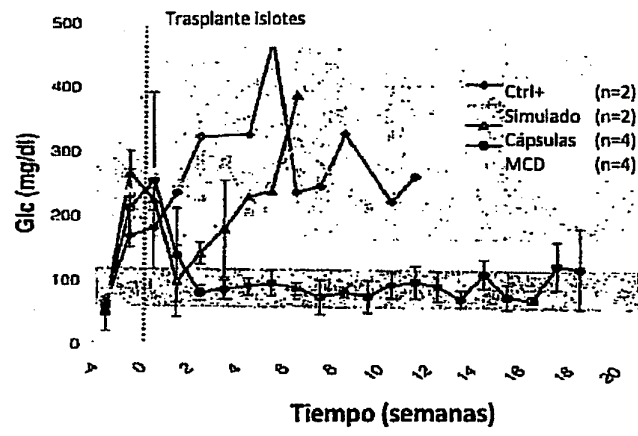


Fig. 8

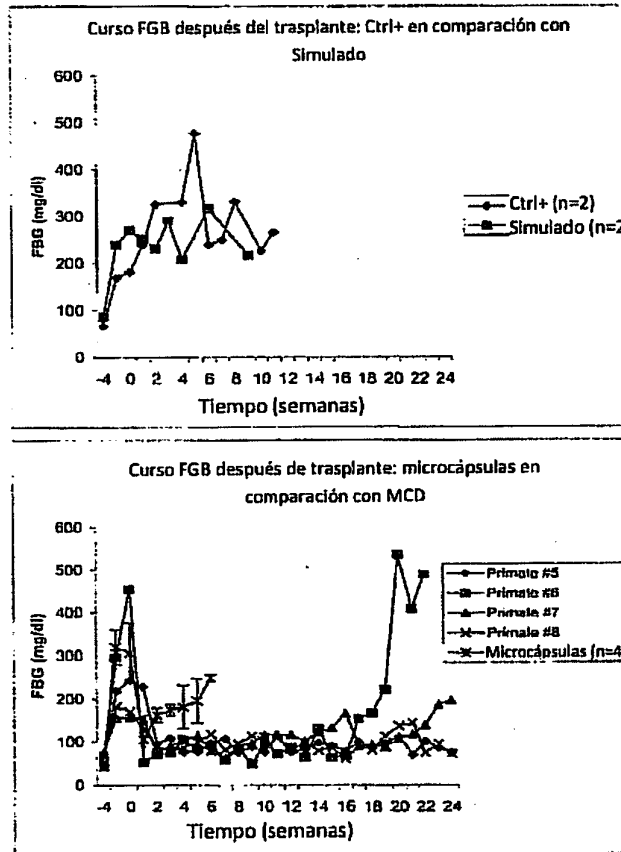


Fig. 9

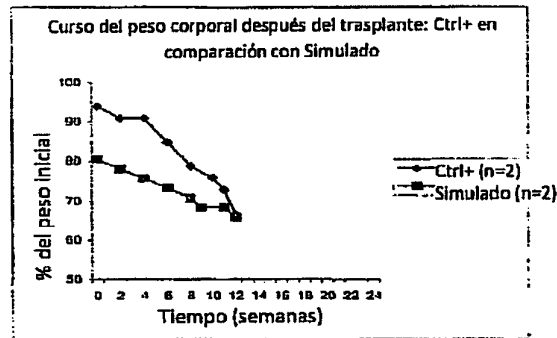
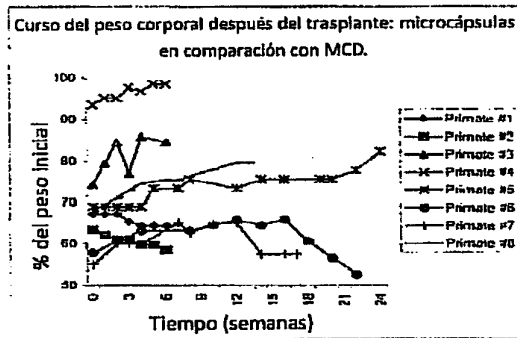


Fig. 10

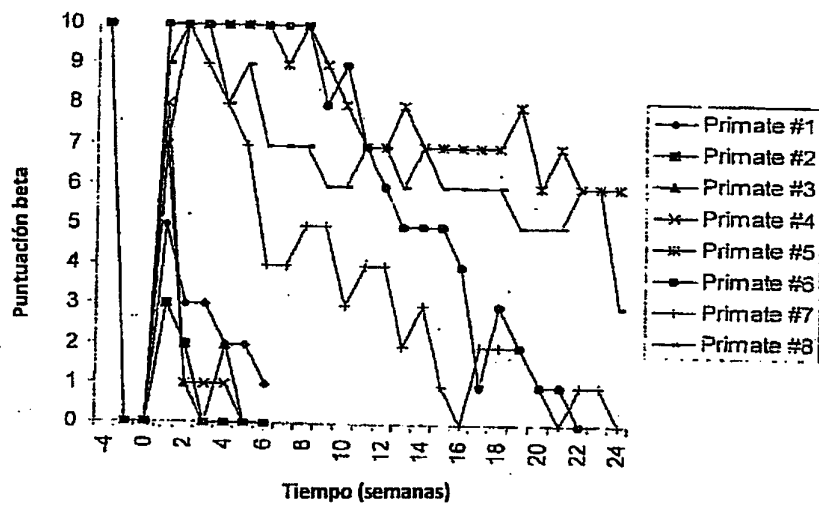


Fig. 11

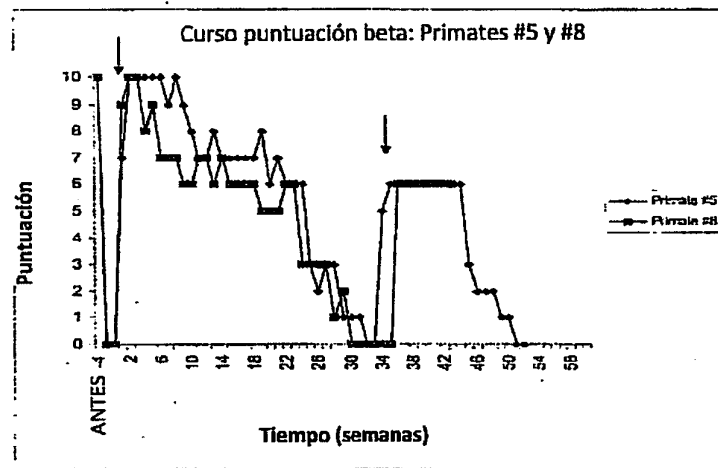


Fig. 12

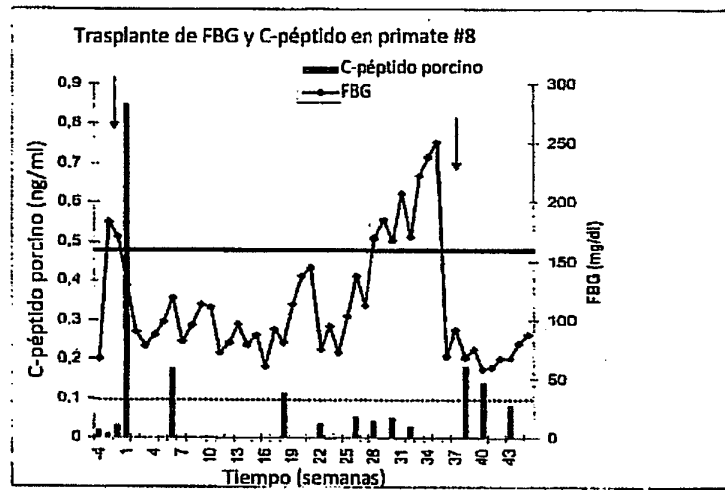


Fig. 13

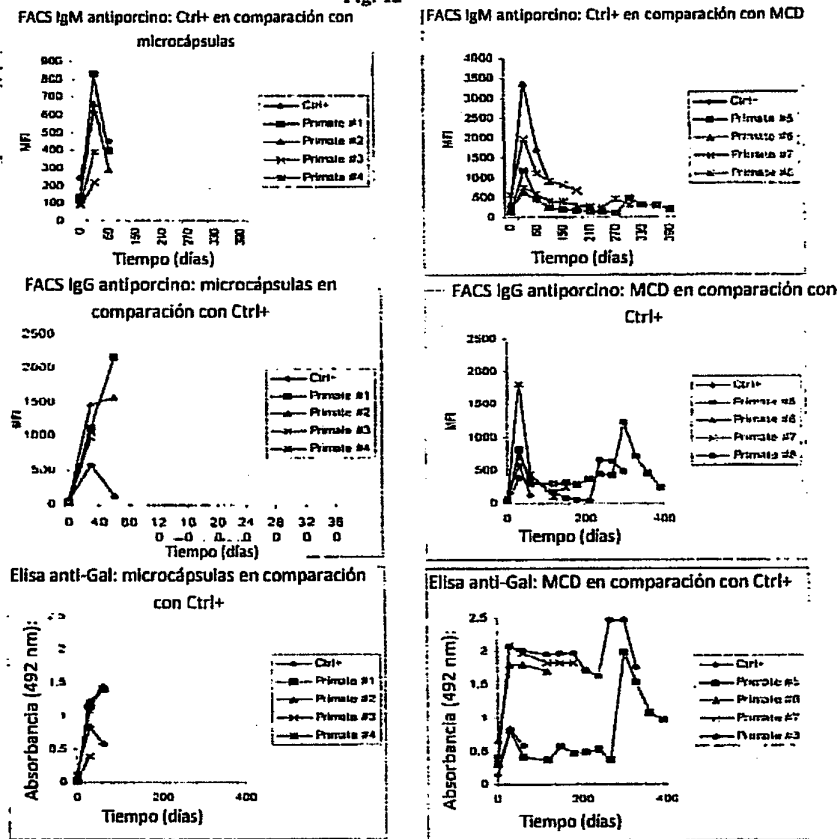


Fig. 14

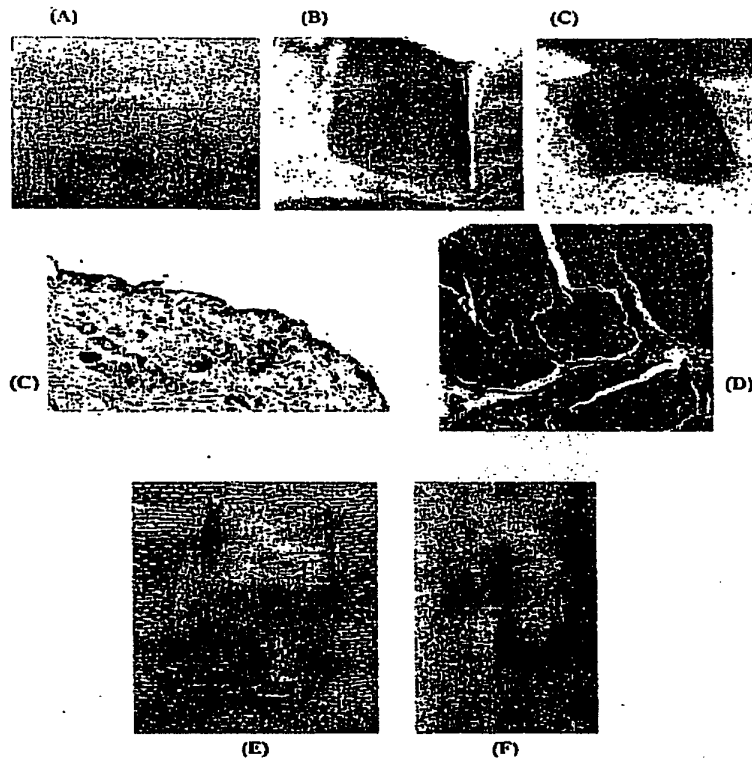


Fig. 15

	-4	0	8	12	16	20	24	30	34	42	48	54
Ctrl+	5.4	>13	>13	>13								
Simul.	4.8	>13	>13	>13								
#1	5.8	>13										
#2	5.8	>13										
#3	5.6	>13										
#4	5.4	>13										
#5	6.1	>13	12.8	9.4	6.4	6.6	8.2	10.4	>13			
#6	4.3	>13	9.6	8.2	8.3	>13	>13					
#7	6.5	>13	10.8	9.5	9.8	10.4	12.5					
#8	7.2	>13	10.3	8.3	7.5	6.7	7.2	10.4	12.9			

Fig. 16



Fig. 17

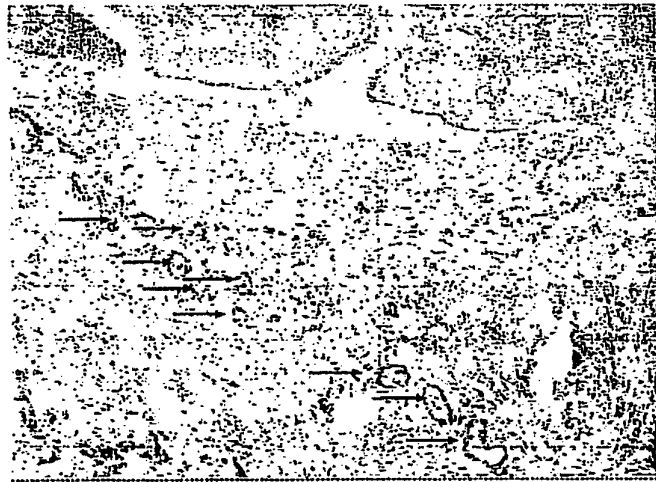


Fig. 18

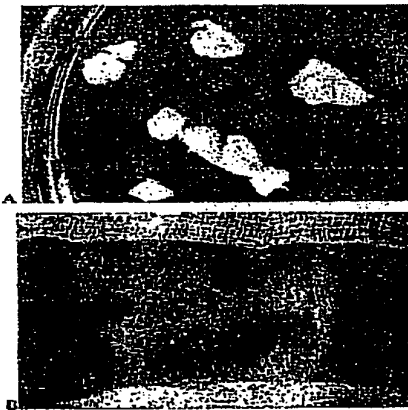


Fig. 19

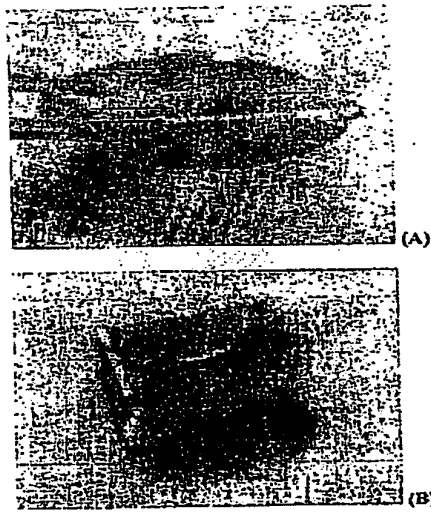
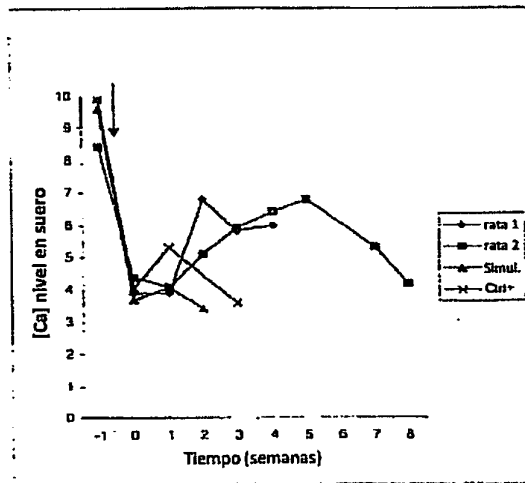


Fig. 20



Fig. 21



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FMC Biopolymer AS
 Dufrane, Denis
 Melvik, Jan E.
 Gianello, Pierre R.R.

<120> ALGINATE COATED, COLLAGEN MATRIX CELLULAR DEVICE, PREPARATIVE
 METHODS, AND USES THEREOF

<130> 60564W0

<150> US 60/814,404
 <151> 2006-06-16

<160> 22

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cell Adhesion Peptide 1

<400> 1

Tyr Ile Gly Ser Arg
 1 5

<210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cell Adhesion Peptide 2

<400> 2

Ile Lys Val Ala Val
 1 5

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cell Adhesion Peptide 3

<400> 3

Arg Glu Asp Val

1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cell Adhesion Peptide 4

<400> 4
Asp Gly Glu Ala
1

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cell Adhesion Peptide 5

<400> 5
Val Gly Val Ala Pro Gly
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cell Adhesion Peptide 6

<400> 6
Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cell Adhesion Peptide 7

<400> 7
Arg Gly Asp Val
1

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Cell Adhesion Peptide 8

<400> 8

Pro Asp Ser Gly Arg
 1 5

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Cell Adhesion Peptide 9

<400> 9

Arg Tyr val val Leu Pro Arg
 1 5

<210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Cell Adhesion Peptide 10

<400> 10

Leu Gly Thr Ile Pro Gly
 1 5

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Cell Adhesion Peptide 11

<400> 11

Arg Gly Asp Ser
 1

<210> 12
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 12

<400> 12

Arg Gly Asp Phe

1

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 13

<400> 13

His His Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 14

<400> 14

Val Thr Cys Gly

1

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 15

<400> 15

Ser Asp Gly Asp

1

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 16

<400> 16

Gly Arg Glu Asp Val Tyr
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 17

<400> 17

Gly Arg Gly Asp Tyr
1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 18

<400> 18

Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 19

<400> 19

Val Ala Pro Gly
1

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Cell Adhesion Peptide 20

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cell Adhesion Peptide 21
<400> 21

Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Tyr
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cell Adhesion Peptide 22
<400> 22

Phe Thr Leu Cys Phe Asp
1 5