

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 575**

51 Int. Cl.:

A61L 27/54 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

B01D 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2011** **E 11727550 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014** **EP 2575914**

54 Título: **Membrana funcionalizada para cámara de encapsulación de células que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico y órgano bioartificial que comprende dicha membrana**

30

Prioridad:

04.06.2010 FR 1002371

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.09.2014

73

Titular/es:

**ASSOCIATION POUR LES TRANSFERTS DE
TECHNOLOGIE DU MANS (50.0%)
Technopôle de l'Université, 20 rue Thalès de Milet
72000 Le Mans, FR y
CENTRE EUROPÉEN D'ETUDE DU DIABÈTE
(50.0%)**

72

Inventor/es:

**LEGEAY, GILBERT;
SIGRIST, SÉVERINE y
COUDREUSE, ARNAUD**

74

Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 497 575 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

Membrana funcionalizada para cámara de encapsulación de células que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico y órgano bioartificial que comprende dicha membrana.

La presente invención se refiere a los órganos bioartificiales implantables en el organismo de un paciente y que se presentan en forma de dispositivos que encapsulan células secretoras de sustancias de interés terapéutico.

El tratamiento de patologías que precisan de un aporte continuo de sustancias de interés terapéutico al organismo ha hecho que sea necesaria la creación de dispositivos que se puedan implantar en el organismo del paciente y que sean capaces de liberar dichas sustancias de forma eficaz, en ocasiones durante largos periodos de tiempo.

Para cubrir dicha necesidad se han desarrollado órganos bioartificiales que contienen células productoras de una o varias sustancias de interés terapéutico. Las células contenidas en un órgano bioartificial se encuentran confinadas en espacios internos, o cámaras de encapsulación, delimitadas por, como mínimo, una membrana semipermeable. Dicha membrana semipermeable debe permitir la difusión de sustancias de interés terapéutico hasta las células diana del organismo del paciente, y a la vez debe ser impermeable a los anticuerpos y a las células inmunitarias de dicho paciente.

Un órgano bioartificial es un dispositivo que contiene, como mínimo, una cámara de encapsulación constituida, como mínimo, por una membrana semipermeable; dicha cámara de encapsulación está destinada a contener células secretoras de una sustancia de interés terapéutico.

La sustancia de interés terapéutico puede ser un neurotransmisor, una hormona, un factor de crecimiento o una citocina; por ejemplo, y sin carácter limitativo, insulina, hormona de crecimiento o calcitonina.

Un ejemplo de este tipo de dispositivo se describe en la Solicitud Internacional WO 02/060409 que se centra más especialmente en el desarrollo de membranas semipermeables con propiedades mecánicas y de permeabilidad selectiva mejoradas para la fabricación de órganos bioartificiales que consisten en una cámara de encapsulación de células productoras de una sustancia activa. Cuando se implanta en el paciente, dicho órgano bioartificial permite la liberación de la sustancia activa y el tratamiento del paciente.

Una dificultad que se ha encontrado tras la implantación de dicho tipo de dispositivo es la duración relativamente corta de su eficacia, que es debida a la falta de oxigenación de las células encapsuladas en la cámara de encapsulación así como su inactivación a causa de citocinas de bajo peso molecular producidas por las células inmunitarias del paciente receptor.

Sigrist y otros han mejorado la viabilidad de los islotes pancreáticos encapsulados en una cámara de encapsulación constituida por una membrana semipermeable de poliácridonitrilmetalilsulfonato de sodio (membrana "AN69" de la empresa HOSPAL) al añadir en el interior de dicha cámara, el factor de crecimiento de las células epiteliales (VEGF). Tras la implantación de un órgano bioartificial en ratones, constituido por la cámara de encapsulación que se ha descrito, la difusión de VEGF a los tejidos próximos al implante ha facilitado la angiogénesis alrededor de dicho implante (J. of Vascular Research, 2003, 40(4):359-67 y Cell Transplantation, 2003, vol.12, pp.627-635).

Sin embargo, esta técnica tiene límites en lo que respecta a la débil difusión de VEGF a través de las paredes de la cámara y en la importancia de inducir la angiogénesis lo más rápido posible a partir de la implantación del órgano bioartificial.

La patente USA 5,262,055 propone un páncreas artificial constituido por una cámara de encapsulación dotada de una membrana inmunoprotectora y que contiene islotes pancreáticos en una matriz de polímero termosensible; el contenido de la cámara de encapsulación se puede renovar tras la implantación gracias a dos tubos finos que unen el interior de la cámara de encapsulación con el exterior del organismo del paciente. El carácter inmunoprotector de la membrana semipermeable se lo confiere la impermeabilidad de dicha membrana que evita la entrada de células del sistema inmunitario en el dispositivo. Dicha patente también propone incluir, en la matriz de polímero termosensible, micropartículas de polímeros que permitan la liberación de agentes activos destinados a inducir la vascularización o a inhibir la actividad macrofágica alrededor de la cámara de encapsulación. El doble inconveniente de este dispositivo es la localización de las micropartículas de polímeros en el interior de la cámara de encapsulación (difusión débil a través de la membrana semipermeable) y la liberación y posterior acumulación no deseada del polímero que constituye las micropartículas en el organismo en el momento de la liberación de los agentes activos.

La Solicitud Internacional WO 94/26399 describe membranas semipermeables en las que los agentes activos están fijados mediante enlaces covalentes; sin embargo, este tipo de membrana no es satisfactoria ya que su preparación exige una etapa suplementaria de fijación covalente de los agentes activos y la cantidad de estos agentes se limita a aquellos presentes en la superficie de la membrana.

La Solicitud USA 2006/0198864 describe membranas para interfaces biológicas destinadas a recubrir dispositivos implantados, tales como sondas de medición de glucemia. Estas membranas constan de dos partes, la capa de soporte y la capa externa, que tiene un relieve muy marcado (estructura alveolada que presenta cavidades de un tamaño de 20 a 1000 μm) y que permite el desarrollo de vasos sanguíneos. Este documento también describe la posibilidad de añadir agentes activos a dichas membranas, especialmente para limitar las inflamaciones y favorecer la vascularización; entonces dichos agentes se pueden incorporar bien en la matriz de la membrana (compuesta de policarbonato, PVA o polímeros celulósicos) o bien son adsorbidos o unidos mediante enlaces covalentes a la superficie de la membrana. La utilización de estas membranas para la fabricación de sondas destinadas a la detección de sustancias tales como la glucosa en el organismo precisan un relieve especial y una gran permeabilidad de las membranas; los inventores han constatado que la estructura particular de dichas membranas, en especial, el hecho de que sus poros estén interconectados (lo que lleva a que las células obstruyan los poros de forma que se impida la circulación de moléculas biológicamente activas y de sustancias de interés terapéutico), que la capa de soporte no presente un umbral de corte seleccionado específicamente para asegurar una permeabilidad selectiva y que se utilicen materiales hidrófobos para la elaboración de la capa externa de estas membranas, conlleva que dichos soportes no sean compatibles con su utilización para la preparación de un órgano bioartificial y para su funcionamiento tras la implantación en el paciente.

Por este motivo, han surgido diversas dificultades a raíz de implantes de órganos bioartificiales en pacientes; en primer lugar se deberá evitar o limitar (i) la inflamación de los tejidos del paciente a causa de la implantación de un órgano bioartificial, y (ii) la introducción de citocinas y quimiocinas en la cámara reactiva, ya que destruirían las células secretoras. Además, para la oxigenación de las células secretoras encapsuladas en el órgano bioartificial y la difusión óptima de la sustancia de interés terapéutico en el organismo, es necesario vascularizar los tejidos que rodean al órgano bioartificial. Por lo tanto es necesario mejorar las propiedades de las membranas que se utilizan en la fabricación de órganos bioartificiales para acelerar la implantación y la puesta en funcionamiento (secreción de sustancias de interés terapéutico) de dichos órganos bioartificiales en el organismo del paciente.

Los inventores han desarrollado un nuevo tipo de membranas semipermeables funcionalizadas por, como mínimo, dos moléculas biológicamente activas; siendo útiles dichas membranas para la fabricación de órganos bioartificiales.

Una membrana semipermeable se considera funcionalizada cuando incluye una molécula biológicamente activa cuya liberación *in vivo* facilita la implantación de un órgano bioartificial y mejora su funcionamiento.

Los inventores han demostrado que la implantación de órganos bioartificiales compuestos de una membrana semipermeable funcionalizada por heparina y VEGF a título de moléculas biológicamente activas permitía evitar una reacción inflamatoria alrededor del órgano bioartificial y facilitaba el desarrollo de vasos sanguíneos alrededor del órgano bioartificial al cabo de tan solo dos semanas; en el caso de las membranas permeables no funcionalizadas eran necesarios dos meses para obtener el mismo grado de vascularización.

La presente invención describe una membrana semipermeable funcionalizada, compuesta por un soporte biocompatible poroso tratado previamente para aumentar la energía superficial y que se caracteriza porque incluye igualmente un mínimo de dos capas, estando dotada cada una de ellas de un polímero hidrófilo y, como mínimo, una molécula biológicamente activa.

Más específicamente, se trata de una membrana semipermeable funcionalizada compuesta por un soporte biocompatible poroso que se caracteriza porque:

- dicho soporte biocompatible poroso ha sido previamente tratado para que su energía superficial sea superior o igual a 50 mJ.m^{-2} ;
- los poros de dicho soporte biocompatible poroso tienen un tamaño que oscila entre 5 y 100 nm y
- dicha membrana semipermeable funcionalizada incluye un mínimo de dos capas, correspondiendo cada una de ellas un polímero hidrófilo y, como mínimo, una molécula biológicamente activa.

La preparación del soporte biocompatible se puede realizar según el método descrito en la Solicitud Internacional WO 02/060409.

El soporte biocompatible está constituido de policarbonato o poliéster o polietilamina porosa; su espesor oscila entre 5 y 100 μm , preferentemente, entre 10 y 60 μm . Los poros se pueden realizar por bombardeo electrónico o por bombardeo de iones pesados; esta segunda técnica se describe extensamente en la Patente USA 4,956,219. En el caso de la utilización de bombardeo de iones pesados, la densidad de los iones pesados bombardeados contra la superficie del soporte biocompatible determina la densidad de los poros, mientras que el tiempo de tratamiento de erosión química determina el tamaño de estos poros.

En el marco de la presente invención, el tamaño interno de los poros realizados en el soporte biocompatible oscila entre 5 y 100 nanómetros, preferentemente, entre 5 y 50 nanómetros.

A continuación se trata la superficie del soporte biocompatible poroso para aumentar su energía superficial. El tratamiento de la superficie conlleva la creación de sitios polares en la superficie del soporte biocompatible poroso, en especial, este tratamiento provoca el aumento de la proporción de grupos carbonilo, hidroxilo o amino, y de radicales libres. Los radicales libres se recombinan entre ellos, o con el oxígeno del aire, y de esta forma crean lugares polares.

Una energía superficial suficiente es aquella en la que el ángulo de contacto medido entre la tangente de una gota de agua colocada en el soporte y la superficie de la membrana es inferior a 40°; dicho ángulo corresponde a una energía superficial de, como mínimo, 50 mJ.m⁻². El objetivo del tratamiento del soporte es llegar a una energía superficial superior o igual a 50 mJ.m⁻².

A continuación se citan, a título de ejemplo, algunos valores de humectación y de energía superficial:

1) Soporte de policarbonato no tratado:

Ángulo de humectación (agua): 60°;
Energía superficial: de 41 a 44 mJ.m⁻² (componente polar: 15 mJ.m⁻²)

2) Soporte de policarbonato tratado con plasma:

Ángulo de humectación (agua): 25°;
Energía superficial: de 66 mJ.m⁻² (componente polar: 37,2 mJ.m⁻²)

3) Soporte de policarbonato tratado con plasma y recubierto de una capa hidrófila:

Ángulo de humectación (agua): 20°;
Energía superficial: de 66,7 mJ.m⁻² (componente polar: 40 mJ.m⁻²)

En especial, cuando se utiliza un soporte biocompatible de policarbonato, los sitios polares presentes en la superficie del soporte biocompatible que constituye la membrana semipermeable de la presente invención incluyen los sitios siguientes: CH₃O, C₂H₃O, C₃H₃O, C₃H₇O, O, OH, C₂OH, C₈H₅O, NH₄⁺, C₂H₈N⁺, R-OH (alcohol), (R)₃-NH (amina) y R-CO-NH (amida), en los que el sustituyente R representa un radical perteneciente a un polímero de policarbonato del soporte biocompatible. Estos sitios polares aumentan la energía superficial del soporte biocompatible y permiten así la adhesión de las capas de polímero hidrófilo.

De forma preferente, los sitios polares de la superficie del soporte biocompatible se crean mediante un tratamiento por plasma, por descargas de corona o incluso mediante descargas electromagnéticas a presión atmosférica o en vacío.

El soporte, por ejemplo, se trata con radiofrecuencia de plasma de argón. Se puede tratar a una potencia de emisión del reactor de plasma que oscila entre 2 y 10 vatios por litro de la capacidad del reactor, entre 1 y 30 minutos. El tratamiento también se puede realizar mediante plasma microondas, a la misma potencia, pero entre 5 segundos y 20 minutos.

De forma preferente, el tratamiento de plasma se realiza en vacío.

Para llevar a cabo el procedimiento de tratamiento de plasma, los especialistas en la materia podrán consultar ventajosamente la obra de A. Ricard («Plasmas réactifs», Éditions SVF, 1995).

El tratamiento también se puede realizar por descargas de corona. La tensión de tratamiento oscila ventajosamente entre 50 y 500 voltios, la intensidad es variable en función del dispositivo de tratamiento y los soportes que se tratan.

El tratamiento por descargas de corona se puede realizar con la ayuda de electrodos paralelos uno enfrente del otro, con electrodos paralelos uno al lado del otro (electrodo de arco de aproximadamente 5 mm de altura), o arco con soplado (electrodos paralelos uno al lado del otro con corriente gaseosa entre ellos, de forma que se crea un arco eléctrico de aproximadamente 10 cm de altura).

Para realizar un procedimiento de tratamiento por descargas corona o descargas electromagnéticas, los especialistas en la materia podrán consultar ventajosamente la obra de A. Ricard (1995).

La duración del tratamiento es del orden de algunas décimas de segundo, preferentemente de 0,1 a 1 segundo. En los tratamientos en continuo, la duración de la exposición es aquella en la que el material que se quiere tratar pasa a través del dispositivo de tratamiento a una velocidad desde algunos centímetros hasta varios decímetros por segundo.

Además, el soporte biocompatible se puede tratar varias veces para aumentar la eficacia del tratamiento.

De forma preferente, y en el caso de un soporte biocompatible de policarbonato, la creación de los sitios polares se realiza mediante una etapa de tratamiento con plasma de argón en un reactor de tipo Branson RF de 20 litros a una potencia de 50 vatios durante diez minutos. En este modo de realización particular, se ha observado en la superficie del soporte biocompatible de policarbonato, mediante medición de espectrometría de masas de iones secundarios, la composición siguiente, en sitios polares cuantificada mediante la intensidad de iones secundarios detectados en los informes masa/carga siguientes:

- en modo positivo: 31 (CH_3O), 43 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$), 55 ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}$), 59 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$), 18 (NH_4) y 46 ($\text{C}_2\text{H}_8\text{N}^+$); y
- en modo negativo: 16 (O), 17 (OH), 41 (C_2OH), 117 ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}$).

Según la presente invención, cada capa de polímero hidrófilo incluye, como mínimo, una molécula biológicamente activa con un espesor que oscila entre 10 y 1000 nanómetros, preferentemente entre 10 y 100 nanómetros, y en especial preferentemente entre 10 y 50 nanómetros.

En el marco de la presente invención, un polímero hidrófilo es un polímero que cuando se aplica en un soporte biocompatible poroso, y a este se le coloca una gota de agua, dicho polímero presenta un valor de ángulo inferior a 25° , preferentemente inferior a 22° , según la medición con método de la "gota sésil" según se describe en la Solicitud Internacional WO 02/060409.

Preferentemente, el polímero hidrófilo es soluble en agua. En efecto, cuando se implanta el órgano bioartificial en el cuerpo de un organismo huésped, se desaconseja la utilización de disolventes orgánicos puesto que su eliminación total es difícil, y su presencia, incluso en pequeñas cantidades, no es compatible con la utilización terapéutica o quirúrgica en el hombre o los animales.

Preferentemente, se utiliza uno de los polímeros hidrófilos de la lista de polímeros siguiente:

- compuestos celulósicos, tales como etilcelulosa (EC), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), por ejemplo la HPMC E4M que comercializa la empresa DOW CHEMICALS, o la denominada Aqualon comercializada por la empresa Herculès, o incluso la carboximetilcelulosa (CMC) comercializada por la empresa Herculès;
- poliácridamidas y sus copolímeros, tales como aquellos que comercializa la empresa SIGMA (UPSALA, Suecia);
- polivinilpirrolidona (PVP) y sus copolímeros, tales como aquellos que comercializa la empresa BASF, como los Kollidon (K30, K90);
- polivinilalcoholes;
- copolímeros del acetato de vinilo, tales como el copolímero de acetato de vinilo y de alcohol polivinílico que la empresa HOECHST comercializa con el nombre de Mowiol;
- polietilenglicoles, tales como aquellos que comercializa la empresa SIGMA;
- polipropilenglicoles;
- poli(met)acrilatos hidrófilos, tales como aquellos que comercializan las empresas DEGALAN o DEGUSSA;
- polisacáridos;
- polímeros a base de ácido hialurónico;
- quitosanos, tales como aquellos que comercializa la empresa SIGMA.

Preferentemente, el polímero hidrófilo se selecciona entre los compuestos celulósicos, especialmente HPMC, EC o CMC, polivinilpirrolidonas, polivinilalcoholes y ciertos poliácridatos como el poli(hidroxietil acrilato) (HEMA) o copolímeros de ácido acrílico.

El polímero hidrófilo que se puede utilizar, según la presente invención, también puede estar compuesto de una mezcla de dos o varios de los polímeros hidrófilos citados anteriormente, por ejemplo, HMPC y CMC, HPMC y EC...

La molécula biológicamente activa se mezcla con un polímero hidrófilo y se liberará en el medio que rodea la membrana semipermeable para inducir una respuesta del o los tejidos del paciente receptor del órgano bioartificial.

La respuesta del tejido que se desea inducir puede tener distintas naturalezas; en general, la moléculas biológicamente activas que se pueden inducir en membranas semipermeables funcionalizadas, según la presente invención, se seleccionan entre los agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos, anestésicos, factores de crecimiento, agentes estimulantes de la angiogénesis y/o que inducen la vascularización, agentes inductores de la cicatrización, agentes inmunosupresores, agentes antitrombóticos incluidos los agentes antiagregantes y agentes anticoagulantes, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA), o incluso las moléculas estimulantes de la secreción de insulina (IGF, péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) o sus derivados, los miméticos de las incretinas).

Entre los agentes antiinflamatorios se encuentran los no esteroideos (AINS) tales como acetaminofeno, ácido aminosalicílico, aspirina, celecoxib, trisalicilato de colina y magnesio, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, interleucina IL-10, mifepristona, anti-IL-6, inhibidores de NO sintasa (por ejemplo, L-NAME o L-NMDA), interferón, ketoprofeno, ketorolaco, leflunomida, ácido mefenámico, ácido micofenólico,

mizoribina, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salsalato, sulindac, y tolmetina y corticoides como cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, betametasona, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, dipropionato de beclometasona, budesonida, fosfato sódico de dexametasona, flunisolide, propionato de fluticasona, paclitaxel, tacrolimus, tranilast, acetónido de triamcinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, desonido, desoximetasona, fluocinolona, triamcinolona, triamcinolona, propionato de clobetasol, y dexametasona.

Es preferible utilizar agentes antitrombóticos tales como los antiagregantes (ácido acetilsalicílico, clopidogrel, ticlopidina, dipiridamol, abciximab, eptifibatide y tirofiban), anticoagulantes (heparina, bivalirudina, dabigatran, lepirudina, fondaparinux, rivaroxaban, epoprostenol, warfarina, fenprocoumona, proteína C, drotrecogina alfa, antitrombina, pentosan) y trombolíticos (alteplasa, urokinasa, tenecteplasa y reteplasa).

El agente antitrombótico preferente es la heparina.

Además su utilización es ventajosa, a título de molécula biológicamente activa, una molécula que permite la vascularización adecuada de los tejidos que rodean el órgano bioartificial, se puede tratar particularmente de factores de crecimiento tales como:

- los pertenecientes a la familia de los PDGF ("Platelet Derived Growth Factor"): (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) PDGF1, PDGF2, VEGF (factor de crecimiento vascular), VPF (factor de permeabilidad vascular);
- los pertenecientes a la familia de los EGF ("Epidermal Growth Factor"): EGF, urogastrona (URO), TGF α ("Transforming Growth Factor α "), anfiregulina;
- los pertenecientes a la familia de los FGF ("Fibroblast Growth Factor"): numerados del 1 al 6, y pueden formar complejos con heparina;
- los pertenecientes a la familia de la insulina: IGF-1 y IGF-2;
- factores de crecimiento nervioso (NGF);
- factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF);
- factores de crecimiento de los hepatocitos (HGF).

Preferentemente se trata de factores de crecimiento celular que favorecen la vascularización mediante la inducción de la angiogénesis, tales como el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de plaquetas (PDGF 1 ó 2) o el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF).

Para preparar la capa de polímero hidrófilo y de molécula biológicamente activa, el polímero hidrófilo o la mezcla de polímeros hidrófilos se disuelve en agua.

Sea cual sea el polímero hidrófilo, o la mezcla de polímeros hidrófilos que se utilice, la cantidad en peso total de la solución se ajusta preferentemente de manera que se obtenga una disolución acuosa de polímero hidrófilo con una viscosidad que oscila entre 1 y 10 centipoises (cP).

Por ejemplo, se obtiene un valor de viscosidad del orden de 5 a 10 cP para una solución acuosa con una concentración del 1% en peso de PVP (Kollidon K90 comercializado por la empresa BASF) o para una solución acuosa con una concentración del 0,2% en peso de HPMC (E4M comercializado por DOW CHEMICALS). Las mediciones de viscosidad se realizan mediante una aguja de tipo DIN 30D, a temperatura ambiente y a una velocidad de rotación de 300 a 500 t/min.

De esta forma, y a título de ilustración, cuando el polímero hidrófilo es de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polivinilpirrolidona (PVP), o una mezcla de estos dos polímeros, el porcentaje en peso del polímero hidrófilo, en relación con el peso total de la solución acuosa de polímero, está comprendida de forma ventajosa entre 0,1% y 1%.

Entonces se añade la molécula biológicamente activa a esta solución acuosa de polímero hidrófilo y posteriormente se solubiliza o pone en suspensión mediante agitación con una proporción de molécula biológicamente activa/polímero hidrófilo comprendida entre 25/100 y 75/100 en peso, preferentemente entre 25/100 y 50/100, la proporción es preferentemente de 25/100 independientemente de la molécula biológicamente activa y el polímero hidrófilo.

La aplicación de capas de polímero hidrófilo y de la molécula biológicamente activa sobre el soporte biocompatible se puede realizar por inmersión.

Preferentemente, la duración de la etapa de inmersión está comprendida entre 5 segundos y 10 minutos.

Ventajosamente, la etapa de inmersión se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15°C y 25°C.

La duración de la etapa de inmersión del soporte biocompatible en una solución de polímero hidrófilo se ajusta para obtener una capa de polímero de un espesor de 10 a 1000 nanómetros, preferentemente de 10 a 100 nanómetros y particularmente preferente de 10 a 50 nanómetros.

5 Cada una de las capas de polímero hidrófilo y molécula biológicamente activa siguientes se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento tras el secado completo de la capa precedente. También se puede llevar a cabo un apilamiento sucesivo de capas funcionalizadas para aumentar la cantidad de moléculas biológicamente activas; el número de capas funcionalizadas puede estar comprendido entre 2 y 10, preferentemente entre 2 y 5.

10 Según la variante preferida de realización de la presente invención, se aplican dos capas de polímero hidrófilo y de molécula biológicamente activa sobre el soporte biocompatible, la primera capa (ubicada entre el soporte y la segunda capa) incluye un factor de crecimiento celular, por ejemplo, VEGF en EC, y una segunda capa (externa) que incluye un agente antitrombótico, por ejemplo, heparina en HPMC; se trata de una variante preferida, el apilamiento de estas dos capas funcionalizadas se podría invertir (es decir, una primera capa que incluyera VEGF en HPMC y una segunda capa que incluyera una heparina en EC).

15 De forma ventajosa, las membranas semipermeables de la presente invención presentan muy buenas propiedades de permeabilidad a las sustancias de interés terapéutico producidas en el interior de órganos bioartificiales y una buena permeabilidad a los nutrientes del organismo necesarios para la viabilidad de las células contenidas en el órgano bioartificial.

Además, de forma muy ventajosa, las células se adhieren de forma muy débil a la superficie de las membranas semipermeables, según la presente invención.

25 En resumen, las membranas semipermeables funcionalizadas, según la presente invención, presentan las características siguientes:

- tienen un umbral de corte que oscila entre 10.000 y 50.000 Da, preferentemente de 10.000 a 30.000 Da, y particularmente preferente de 10.000 a 15.000 Da;
- 30 - poseen una densidad de poros que oscila entre 10^9 y 10^{11} poros/cm²;
- tienen un espesor que oscila entre 5 µm y 100 µm, preferentemente entre 10 µm y 60 µm.

Según un primer modo de realización, las capas de polímeros hidrófilos y de moléculas biológicamente activas pueden recubrir las dos caras del soporte biocompatible.

35 Según un segundo modo de realización, las capas de polímeros hidrófilos y de moléculas biológicamente activas solamente recubren una de las dos caras del soporte biocompatible; según este modo de realización, la cara del soporte biocompatible recubierta de polímeros hidrófilos y de moléculas biológicamente activas se sitúa en la parte externa del órgano bioartificial y que está en contacto con el medio que rodea el lugar de implantación de dicho órgano.

La presente invención también tiene por objeto la utilización de una membrana funcionalizada, según la presente invención, para la fabricación de una cámara de encapsulación de células secretoras que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico.

45 La presente invención también tiene por objeto una cámara de encapsulación de células secretoras que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico que se caracteriza en que sus paredes están formadas por una membrana semipermeable funcionalizada tal como se ha definido anteriormente, que delimita un espacio susceptible de contener células secretoras que sintetizan, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico y un órgano bioartificial que contenga una cámara de encapsulación de células secretoras que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico que se caracteriza en que sus paredes están formadas por una membrana semipermeable funcionalizada, tal como se ha definido anteriormente.

50 La utilización de las membranas semipermeables, según la presente invención, para la fabricación de órganos bioartificiales lleva a dispositivos cuya implantación se ve favorecida por la liberación de antitrombóticos y la constitución de vasos sanguíneos alrededor de dicho dispositivo tras su implantación.

Una cámara de encapsulación, según la presente invención, puede tener las características de las cámaras constitutivas de órganos bioartificiales descritos en el estado de la técnica.

60 Un ejemplo no limitativo de un modo de realización de la presente invención de un órgano bioartificial que incluye una cámara de encapsulación, según la presente invención, dicho órgano bioartificial se ilustra en las figuras 1 (vista superior) y 2 (corte transversal).

65 Según este modo de realización particular, la cámara de encapsulación (1) tiene forma paralelepípedica e incluye dos membranas semipermeables funcionalizadas, una superior y una inferior, constituidas de un soporte

biocompatible (2) sobre el cual se colocan capas de polímero hidrófilo y de molécula biológicamente activa (3); estas dos membranas semipermeables están soldadas en su borde externo (41) y en distintos puntos de su superficie (42).

Las dos membranas funcionalizadas delimitan el recinto (5) de la cámara de encapsulación en la que se contienen células productoras de, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico. Este recinto está dotado ventajosamente de una matriz interna (6). La altura del interior de la cámara de encapsulación se corresponde con la altura de las células o grupos de células secretoras (por ejemplo en el caso de los islotes pancreáticos); a título de ejemplo, esta altura oscila entre 5 y 900 µm.

Los puntos de soldadura (42) localizados en la superficie de las membranas permiten una mejor distribución de las células secretoras durante el llenado de la cámara de encapsulación y, en particular, evita que las células secretoras formen agregados.

Finalmente, según la variante preferida, el órgano bioartificial también está dotado de dos tubos flexibles (7) que permiten llenar y vaciar el órgano bioartificial; esta variante presenta una ventaja particular para renovar el contenido del órgano bioartificial cuando éste se ha implantado en el organismo del paciente, sin proceder a una extracción.

Las células secretoras de, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico pueden ser, por ejemplo, células de los islotes pancreáticos (o islotes de Langerhans) o células productoras de insulina procedentes de líneas celulares como MIN-6, RIN-m5f y INS-1, que producen insulina cuando la cámara de encapsulación está destinada a la fabricación de un páncreas bioartificial.

Las células también pueden ser células hepáticas cuando la cámara de encapsulación está destinada a la fabricación de un hígado bioartificial.

En un modo de realización particular, las células se transfectan o transforman mediante, como mínimo, un ácido nucleico de forma que puedan expresar una sustancia de interés terapéutico. Entre las sustancias de interés terapéutico se pueden citar, a título de ejemplo, insulina, citocinas, hormonas peptídicas, hormona de crecimiento o calcitonina.

De forma general, una sustancia de interés terapéutico en el marco de la presente invención, es una sustancia liberada o secretada por la célula que la produce y ejerce su efecto en una célula diana o molécula diana en el organismo huésped, como por ejemplo un neurotransmisor, una hormona, un factor de crecimiento o una citocina.

Se pueden utilizar una gran diversidad de células, entre ellas líneas de células inmortalizadas como los cultivos primarios de células en división.

Las células pueden ser, por ejemplo, mioblastos, células precursoras de las células musculares derivadas de poblaciones de células madre del mesodermo, y que se pueden transformar fácilmente mediante un ácido nucleico de forma que puedan expresar una sustancia de interés terapéutico. Los expertos en la materia podrán consultar ventajosamente, por ejemplo, las solicitudes PCT publicadas con las referencias WO 94/02129, WO 93/03768 y WO 90/15863.

Las células también pueden ser células beta de los islotes de Langerhans del páncreas o hepatocitos, preferentemente de origen humano.

Las células contenidas en una cámara de encapsulación, según la presente invención, también se pueden incluir en una matriz, tal como una matriz de colágeno de tipo IV, llegado el caso en asociación con laminina, entactina y sulfato de heparan, como la matriz que se comercializa con el nombre de Matrigel.

Las células contenidas en una cámara de encapsulación, según la presente invención, también se pueden incluir, de forma general, en una matriz compuesta por cualquier producto o combinación de productos que permitan la inmovilización de dichas células en estado viable.

Según otro aspecto, la presente invención también hace referencia a un órgano bioartificial caracterizado por incluir, como mínimo, una cámara de encapsulación tal y como se ha definido anteriormente.

Las características de un órgano bioartificial, según la presente invención, pueden ser de todo tipo dentro de los conocimientos de la materia.

Para realizar un órgano bioartificial, según la presente invención, cuya característica esencial es la de incluir, como mínimo, una cámara de encapsulación de células, dotada de una membrana semipermeable funcionalizada según la presente invención, el especialista en la materia podrá consultar ventajosamente las patentes USA 5,981,211, USA 4,578,191, USA 5,837,234, USA 6,023,009, USA 5,605,835 y USA 4,323,457.

Según un modo de realización particular de la presente invención, el órgano bioartificial es un páncreas bioartificial que contiene las células de los islotes de Langerhans.

Según un segundo modo de realización particular de la presente invención, el órgano bioartificial es un hígado artificial que contiene células hepáticas.

A título ilustrativo, un órgano bioartificial, según la presente invención, se puede implantar de forma intraperitoneal o por encima de la cápsula renal; puede estar implantado, como mínimo, cinco años, si fuera necesario se puede renovar su contenido (células secretoras).

Figuras

La **figura 1** representa una vista superior de un ejemplo de modo de realización de un órgano bioartificial, según la presente invención, la **figura 2** representa un corte transversal de este mismo órgano bioartificial; dicho órgano bioartificial incluye una cámara de encapsulación (1) de forma paralelepípedica y dos membranas semipermeables funcionalizadas, una superior y una inferior, constituidas por un soporte biocompatible (2) sobre el que se colocan las capas de polímeros hidrófilos y de moléculas biológicamente activas (3); estas dos membranas semipermeables están soldadas en su borde externo (41) y en distintos puntos de su superficie (42); las dos membranas funcionalizadas delimitan el recinto (5) de la cámara de encapsulación en la que se encuentran las células productoras, como mínimo, de una sustancia de interés terapéutico; el recinto está dotado de una matriz interna (6).

El gráfico de la **figura 3** representa la permeabilidad a la glucosa de las membranas preparadas en el ejemplo 1.

Las **figuras 4 y 5** son fotografías de cortes histológicos de tejido epiploico que envuelve la membrana: sin molécula biológicamente activa, con heparina, con VEGF y con heparina y VEGF, tras 7 días (**figura 4**) ó 1 mes (**figura 5**) en ratas (x400).

En base a las fotografías realizadas tras 7 días, 14 días y 1 mes de la implantación, se han evaluado varios parámetros que caracterizan la evolución de la vascularización de los tejidos que envuelven el implante, se trata de:

- la media del número de vasos sanguíneos por campo contados en 5 campos de los cortes tras 7 días, 14 días o 1 mes de la implantación en las diferentes membranas que se han testado (**figura 6**);
- la distancia media entre la membrana semipermeable y los primeros vasos sanguíneos contados en 5 campos de los cortes tras 7 días o 1 mes de la implantación en las diferentes membranas que se han testado (**figura 7**);
- el diámetro medio de los vasos sanguíneos medido en 5 campos de los cortes tras 7 días o 1 mes de la implantación en las diferentes membranas que se han testado (**figura 8**).

Ejemplos

Ejemplo 1 – Fabricación de membranas semipermeables

I. Membranas que incluyen un soporte de policarbonato recubierto solo de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) (membranas control)

I.A. Preparación de soluciones de HPMC

Las soluciones siguientes se preparan, como mínimo, el día anterior al tratamiento mediante la disolución de 2 g de HPMC (E4M de Dow Chemical) en 1 l de agua PPI o una proporción equivalente para obtener una concentración de HPMC al 0,2%. La solución se deja en agitación durante la noche (agitador magnético) a temperatura ambiente.

I.B. Tratamiento de plasma de los soportes de policarbonato y revestimiento

Las membranas de soporte en policarbonato Pokalon (Lonza) se limpian previamente con agua PPI.

Los tratamientos de membranas de soporte de policarbonato se realizan en una sala limpia con una máquina de plasma Branson; el tratamiento siguiente se aplica: Ar – 50 W – 10 minutos.

Las membranas de soporte de policarbonato que han seguido este tratamiento se sumergen inmediatamente en la solución de HPMC y luego se secan a 45°C en la estufa.

II. Membranas funcionalizadas con VEGF en HPMC según la presente invención

II.A. Preparación de soluciones de HPMC y VEGF

Se prepara una solución de HPMC al 0,1% (1g/l) en agua PPI.

Se diluye 1 ml de dicha solución de HPMC en 100 ml de tampón fosfato DPBS hasta llegar a una concentración de HPMC al 0,001%.

Se realiza la preparación de una solución VEGF (Tebu-bio SAS) a 10 µg/ml (es decir, 10 mg/l) al añadir 1 ml de DPBS en el vial que contiene 10 µg de VEGF.

Se mezcla el conjunto de esta solución de VEGF (es decir, 1 ml que contenga 10 µg de VEGF) con 4 ml de solución de HPMC (que contenga 40µg de HPMC) para preparar una solución que contenga 25 partes de VEGF por 100 partes de HPMC.

La mezcla se introduce en un frasco de 50 ml y se diluye para obtener unas concentraciones finales de 0,2 µg/ml de VEGF y de 0,8 µg/ml de HPMC.

Según este mismo principio, también se pueden preparar soluciones con proporciones de HPMC/VEGF de 100/50 y de 100/10.

II.B. Tratamiento plasma y revestimiento

Estas etapas se realizan tal y como se ha descrito en el punto I.B salvo para el secado que se realiza a temperatura ambiente.

III. Membranas funcionalizadas con heparina en etilcelulosa (EC) con un proporción de EC/heparina de 100/25 según la presente invención

III.A Preparación de soluciones

La solución de EC se prepara de la forma siguiente: El EC se presenta como una pasta (Surelease de Colorcon, a 25%, es decir 25 mg/100 mg), se diluye en agua PPI a 1 g/l, es decir, 250 mg/l de EC.

Dicha solución se diluye por segunda vez en agua PPI para que la solución llegue a 10 mg/l de EC.

La solución comercial de heparina (heparina Choay 25000UI Sanofi-Aventis) tiene una concentración de heparina de 200 mg/5 ml; ésta se diluye en agua PPI hasta llegar a una concentración de heparina de 10 µg/ml.

Se mezcla 1 ml de solución de heparina (que contiene 10 µg de heparina) con 4 ml de la solución de EC (que contiene 40 µg de EC) para llegar a una solución con una proporción de 25 partes de heparina por 100 partes de EC.

Esta solución se introduce en un frasco de 50 ml y se diluye para llegar a las concentraciones de 0,2 µg/ml de heparina y de 0,8 µg/ml de EC.

III.B Tratamiento plasma y revestimiento

Estas etapas se realizan tal y como se ha descrito en el punto I.B salvo para el secado que se realiza a temperatura ambiente.

IV. Membranas funcionalizadas con heparina en EC y VEGF en HPMC según la presente invención

IV.A Preparación de soluciones

Las soluciones de heparina en EC y VEGF en HPMC se preparan como se indica respectivamente en los puntos III.A y II.A.

IV.B Tratamiento plasma y revestimiento

El tratamiento plasma se realiza tal y como se ha descrito en el punto I.B.

Los revestimientos se realizan en el orden siguiente:

- inmersión del soporte de policarbonato en la solución EC/heparina y posterior secado a temperatura ambiente;
- posteriormente inmersión del soporte funcionalizado con heparina en la solución HPMC/VEGF y posterior secado a temperatura ambiente.

V. Preparación del dispositivo según la presente invención con un soporte de silicona

Los dispositivos, según la presente invención, se pueden preparar con un soporte de silicona. Dichos soportes representan una parte complementaria de las membranas semipermeables, según la presente invención.

Los soportes de silicona (Nusil) se tratan previamente con plasma en las condiciones siguientes: Ar – 100 W – 7,5 minutos.

A continuación, se realiza la aplicación de las capas funcionalizadas tal y como se describe en los protocolos de los apartados II, III y IV; el agua PPI se puede sustituir por agua destilada.

Ejemplo 2 – Caracterización de la permeabilidad de las membranas semipermeables

Se han realizado ensayos de permeabilidad a la glucosa y a las inmunoglobulinas (IgG) de las membranas previamente preparadas, tal y como se describe a continuación:

Material: cámara de difusión constituida por un compartimento superior y un compartimento inferior separados por una membrana cuya permeabilidad a glucosa (Prolabo), NaCl (Sigma, ref. S3014), IgG (Sigma, ref. I96640), agua destilada queremos testar (la estanqueidad entre los dos compartimentos se consigue mediante una junta).

Preparación de las soluciones

- suero fisiológico, para 1 litro:

NaCl	9 g
Agua destilada	1 l

- solución de glucosa, para 1 litro:

Glucosa	4 g
Suero fisiológico	1 l

- solución de IgG (concentración final 5,75 µg/ml), para 100 ml:

IgG madre (10 mg/ml)	575 µl
Suero fisiológico	99,425 ml

Protocolo:

Se introducen 3 ml de suero fisiológico en el compartimento inferior de la cámara de difusión, la membrana cuya permeabilidad queremos testar se coloca por encima del suero fisiológico evitando la presencia de burbujas de aire.

Se introducen 3 ml de solución de glucosa en el compartimento superior, la cámara de difusión se cierra con parafilm y luego se incuba a 37°C.

Para la glucosa: Se extrae 1 ml de la solución que se encuentra en el compartimento superior de la cámara de difusión tras una homogeneización suave. A continuación se retira la membrana y se coloca en una caja de Petri y tras la homogeneización se extrae 1 ml de la solución del compartimento inferior.

La dosificación enzimática de la glucosa se realiza mediante el kit de Glucosa RTU (BioMérieux, referencia 61 269).

En el gráfico de la **figura 3** se representan los resultados (expresados en contenido de glucosa del compartimento inferior en función del tiempo).

La comparación de la permeabilidad a la glucosa de las membranas funcionalizadas, según la presente invención (126.3, 126.4 y 126.5) en comparación con las membranas del estado de la técnica cuya preparación se describe en el ejemplo 1, punto I (126.1 y 12.6.2) demuestra que el tratamiento destinado a funcionalizar las membranas no reduce la permeabilidad a la glucosa.

Para IgG: Se extrae 1 ml de la solución que se encuentra en el compartimento superior de la cámara de difusión tras una homogeneización suave. A continuación se retira la membrana y se coloca en una caja de Petri donde se lava con 1 ml de agua destilada, esta agua de lavado se conserva. Tras la homogeneización se extrae 1 ml de la solución del compartimento inferior.

La dosificación de las IgG se realiza mediante el método Bradford (Bradford, 1976 & Wright y otros, 1996).

Las membranas semipermeables, según la presente invención, son totalmente impermeables a las IgG; de esta forma impiden ventajosamente la penetración de citocinas y quimiocinas en la cámara de encapsulación.

5 **Ejemplo 3 – ensayos de implantación de membranas semipermeables**

Las membranas preparadas tal y como se ha descrito en el ejemplo 1 se implantan en la cavidad peritoneal de ratas Wistar sanas.

10 A continuación en la parte experimental, las membranas se codifican de la forma siguiente:

- 126.1 y 126.2: membranas "control" (preparadas como se ha descrito en la parte I del ejemplo 1);
- 126.3: membrana "VEGF/HPMC" (proporción: 25/100 preparada como se ha descrito en la parte II del ejemplo 1);
- 126.4: membrana "heparina/EC" (proporción: 25/100 preparada como se ha descrito en la parte III del ejemplo 1);
- 15 - 126.5: membrana "VEGF/HPMC + heparina/EC" (para las dos capas la proporción es de 25/100, la membrana se ha preparado como se ha descrito en la parte IV del ejemplo 1).

Se anestesian las ratas Wistar macho de 230-250 g mediante gas (isoflurano). Una laparotomía de 3 cm a la altura de la fosa iliaca izquierda permite la implantación de la membrana. Posteriormente se sutura la incisión. A 20 continuación las ratas se colocan en jaulas con alimento y agua *ad libitum* (cada membrana se implanta en tres ratas).

Tras una semana, se anestesia las ratas con una mezcla de Imalgene/Rumpun, y se practica otra incisión para recuperar la membrana y el tejido epiploico que la rodea. Entonces se coloca la membrana en glutaraldehído al 2,5% y el tejido se fija en paraformaldehído al 3% preparado en un tampón de PBS durante 3h.

El tejido epiploico extraído se incluye en parafina para realizar un análisis histológico según el protocolo siguiente:

30 **I. Extracción**

I.1. Material

Soluciones

- 35 - 1 frasco de 500 ml de formaldehído al 36% (Referencia: SIGMA – F8775 – 500 ml).
- 1 frasco de 500 g de paraformaldehído en polvo (Referencia: SIGMA – 30525-89-4) que se debe conservar en el frigorífico.
- 1 frasco de 10 ml de glutaraldehído al 25% (Referencia: SIGMA – G5882 – 10x10 ml).
- 1 frasco de 500 ml de PBS (Referencia: GIBCO – 14190-094).
- 40 - 1 frasco de 500 ml de PBS X10 (Referencia: GIBCO – 14200-067).

I.2. Preparación de las soluciones

Debido a la toxicidad de los productos que se utilizan, las etapas siguientes se realizan con guantes y bajo la campana extractora.

I.2.1. Solución de formaldehído al 3%

El formaldehído permite conservar el tejido que rodea las membranas en la extracción durante un máximo de 4h, también se utiliza para las coloraciones eosina/hematoxilina.

- añadir 100 ml de PBS en un frasco de 100 ml;
- añadir 8,3 ml de formaldehído al 36%;
- mezclar.

I.2.2. Solución de formaldehído al 8%

Se puede utilizar una solución de paraformaldehído al 4% en lugar de la solución de formaldehído, permite fijar los tejidos hasta un máximo de 24h y se utiliza para la coloración inmunocitoquímica.

- 60 - Preparar una solución alcalina con la disolución de 1 pastilla de hidróxido sódico en de 2 a 3 ml de agua destilada;
- poner 8 g de paraformaldehído en suspensión en 100 ml de agua destilada;
- bajo la campana extractora, calentar la suspensión en un agitador magnético con calefactor;
- cuando la suspensión empiece a hervir (aproximadamente a 80°C), añadir algunas gotas de solución alcalina hasta la clarificación total de la mezcla;
- 65 - enfriar rápidamente con hielo.

Esta solución se debe utilizar inmediatamente o debe ser conservada a -20°C en fracciones de 20 ml preparadas para su utilización.

- 5 La solución de paraformaldehído al 4% se prepara por dilución con PBS (se introducen 20 ml de la solución de paraformaldehído al 8% en 20 ml de PBS y se mezcla).

I.2.3. Solución de glutaraldehído al 2,5%

- 10 - Poner 100 ml de agua destilada en un frasco de 100 ml.
- Añadir 10 ml de glutaraldehído al 25%.

El glutaraldehído permite conservar la membrana extraída.

II. Inclusión en parafina

II.1. Material

- 20 - 1 frasco de 500 ml de PBS (Referencia: GIBCO – 14190-094).
- 1 frasco de 500 ml de PBS X10 (Referencia: GIBCO – 14200-067).
- 1 botella de 1 l de tolueno (Referencia: FISHER SCIENTIFIC – código: T/2250/17), el tolueno es muy tóxico y volátil y se debe conservar y manipular bajo la campana extractora.
- 1 botella de 1 l de etanol al 70%.
- 1 botella de 1 l de etanol al 95%.
25 - 1 botella de 1 l de etanol al 100%.
- Parafina (Referencia: TYCO/HEALTHCARE – ref: 8889501006).
- 1 cassette de inclusión HISTOSETTE 2 estándar (Referencia: M.492, ref 039753 o M.485, ref 039775 del catálogo Dutscher).
- 1 copela de inclusión 37x24 mm (Referencia: RICHARD-ALLAN SCIENTIFIC - catálogo n° 58953)
30 - 3 vasos de precipitado de 50 ml.
- 2 vasos de precipitado de 600 ml.
- 1 pinzas
- Aluminio
- 1 guantes de goma

II.2. Soluciones

II.2.1. PBS

- 40 - Poner 50 ml de PBS X10 en un frasco vacío de PBS (500 ml):
- rellenar con 450 ml de agua destilada;
- mezclar.

II.2.2. Etanol al 70%

- 45 - Poner 700 ml de etanol en una botella de 1 l;
- rellenar con 300 ml de agua destilada;
- mezclar

II.2.3. Etanol al 95%

- 50 - Poner 950 ml de etanol en una botella de 1 l;
- rellenar con 50 ml de agua destilada;
- mezclar

II.2.4. Parafina

- 55 - Poner las pastillas de parafina en los 2 vasos de precipitado de 600 ml;
- colocar los 2 vasos de precipitado en la estufa de la sala de histología entre 62°C y 65°C;
60 - conservar los vasos de precipitado en la estufa.

II.3. Preparación del lugar de trabajo

- 65 Sobre la poyata: colocar los 9 recipientes que contienen las soluciones en el orden siguiente: 2 recipientes de PBS y 7 recipientes de etanol.

Bajo la campana extractora química, colocar 3 vasos de precipitado de 50 ml de tolueno y en la estufa, colocar 3 recipientes de parafina.

II.4. Los baños

Las extracciones de tejido siguen las etapas siguientes:

ETAPAS	SOLUCIONES	CONDICIONES
Fijación	Formol al 3% en PBS.	2h mínimo - 4h máximo, a temperatura ambiente.
Lavados	PBS	2 x 10 min.
Deshidratación	Alcohol al 70%.	2 x 10 min.
	Alcohol al 95%.	3 x 15 min.
	Alcohol al 100%.	2 x 30 min.
Impregnación	Tolueno.	3 x 15 min.
Inclusión	Parafina.	3 x 20 min.

II.5. Inclusión del tejido en parafina

- Verter la parafina líquida en la copela de inclusión;
- colocar el tejido que se quiere incluir en la copela;
- aplicar la cassette de inclusión y verter sobre este la parafina para que el recubrimiento sea uniforme;
- dejar enfriar unos minutos a temperatura ambiente, posteriormente poner en el frigorífico un mínimo de 24h.

III. Elaboración de los cortes

III.1. Material

- Cassette de inclusión.
- Micrótopo.
- Láminas permafrost 75x25 mm (Referencia: 045796, del catálogo Dutscher).
- 1 pipeta de transferencia desechable.
- 1 recipiente que contenga agua destilada.
- 2 pinceles: 1 cepillo + 1 pincel fino.
- 2 herramientas de extracción de cortes.
- Calefactor de láminas
- 1 botella de 1 l de etanol al 95%.
- 1 botella de 1 l de etanol al 100%.
- 1 botella de tolueno (Referencia: FISHER SCIENTIFIC - código: T/2250/7)
- 5 cubas de coloración de tipo Hellendahl.
- Guantes de goma.

III.3. Cortes con micrótopo

Los cortes se realizan con un micrótopo RM2265 de Leica según las recomendaciones del fabricante.

III.4. Desparafinación

Esta etapa permite eliminar la parafina presente en la lámina a la vez que se conserva el tejido, la lámina se trata con los baños siguientes:

TOLUENO	2 X 15 min.
ALCOHOL 100%	2 X 10 min.
ALCOHOL 95%	1 X 5 min.
AGUA DEL GRIFO	Enjuague rápido.
AGUA DESTILADA	Enjuague rápido.

IV. Coloración

IV.1. Material

- 5 - Lámina permafrost 76x26 mm. De corte fijo.
- 1 botella de 1 l de eosina.
- 1 botella de 1 l de ácido alcohol.
- 1 botella de 1 l de agua amoniacal.
- 1 frasco de hematoxilina Harris (Referencia: SURGIPATH - 01562^E).
- 10 - 1 botella de 500 ml de etanol al 100%.
- 1 baño de tolueno.
- 1 tubo de cola (Referencia: EUKITT).
- Lámina de vidrio de 25x75 mm (Referencia: ESCO n° 2951).
- 13 cubas con tapa (Referencia: 068506, del catálogo Dutscher p. 187).
- 15 - 2 cubos (Referencia: 068507, del catálogo Dutscher p. 187).
- Papel absorbente.
- Guantes de goma.
- 1 filtro de café.

IV.2. Preparación de las soluciones

IV.2.1. Solución de eosina (1 l)

En una botella de 1 l, añadir:

- 25 - Eosina 225 RA2: 3,125 g (Referencia: REACTIF RAL – 312730-0100);
- Eritrosina RA2: 1,875 g (Referencia: REACTIF RAL – 312820-0100);
- agua destilada: 1 l.

30 Mezclar y filtrar con un filtro de café.

IV.2.2. Solución de ácido alcohol (1 l)

En una botella de 1 l, añadir:

- 35 - Alcohol al 96%: 990 ml;
- Ácido clorhídrico (HCl): 10 ml (Referencia: PROLABO – 20.246.298.) (manipular con guantes y gafas de protección)

IV.2.3. Solución de etanol al 96% (1 l)

- Añadir 960 ml de etanol puro a una botella de 1 l;
- completar con 40 ml de agua destilada y mezclar.

IV.2.4. Solución de agua amoniacal al 0,20% (1 l)

En una botella de 1 l, añadir:

- 50 - amoniaco al 20%: 2,5 ml (Referencia: FISHER SCIENTIFIC – código: A/3367/17);
- agua destilada: 1 l;

posteriormente mezclar.

IV.3. Protocolo de coloración

55 La coloración de los tejidos se consigue mediante baños sucesivos:

- inmersión en hematoxilina Harris durante 1 minuto y 30 segundos;
- dos baños en agua;
- 60 - inmersión en la solución de ácido alcohol y agitar 2 ó 3 veces;
- dos baños en agua;
- inmersión en agua amoniacal hasta que el tejido se vuelva azul;
- un baño en agua;
- inmersión en eosina durante 10 segundos;
- 65 - un baño en agua amoniacal;
- 3 baños sucesivos en etanol al 96%;

- baño final en tolueno.

Los baños en agua y etanol consisten en 2-3 agitaciones rápidas.

5 Tras los baños:

- aplicar la cola sobre el tejido con cuidado de no producir lisis;
- colocar la lámina de cristal y presionar bien para eliminar todas las burbujas de aire;
- eliminar el exceso de cola de forma general;
- 10 - sumergir la lámina en tolueno y retirarla rápidamente;
- secar con papel absorbente sin desplazar la lámina;
- repetir la operación de 2 a 3 veces hasta la eliminación total de los residuos de cola.

IV.4. Papel de las diferentes soluciones

15

La hematoxilina Harris da una coloración roja-violácea a los elementos basófilos del tejido.

El ácido alcohol decolora ligeramente y a la vez da una tinción anaranjada.

20

El agua amoniacal NH_4 al 0,20% da una coloración violeta al núcleo de las células.

La eosina da una coloración rosa-anaranjada a los elementos acidófilos del tejido.

Los 3 baños de etanol al 96% decoloran.

25

El baño de tolueno fija el tejido y elimina el exceso de colorante.

El conteo de los vasos sanguíneos, la medición de su diámetro y la determinación de la distancia entre el módulo y los primeros vasos sanguíneos se realiza mediante una lupa binocular y un micrómetro; a cada tejido se le realizan tres cortes, y de cada corte se cuentan 5 campos.

30

V. Resultados

35

Las fotografías de los cortes preparados 7 días o 1 mes tras la implantación de las membranas se reflejan en las **figuras 4 y 5**.

La **figura 6** representa la media del número de vasos sanguíneos contados en los 5 campos de los cortes tras 7 días, 14 días o 1 mes de las diferentes membranas testadas.

40

La **figura 7** representa la distancia media entre la membrana semipermeable y los primeros vasos sanguíneos contados en los 5 campos de los cortes tras 7 días o 1 mes de las diferentes membranas testadas.

La **figura 8** representa el diámetro medio de los vasos sanguíneos de los 5 campos de los cortes tras 7 días o 1 mes de las diferentes membranas testadas.

45

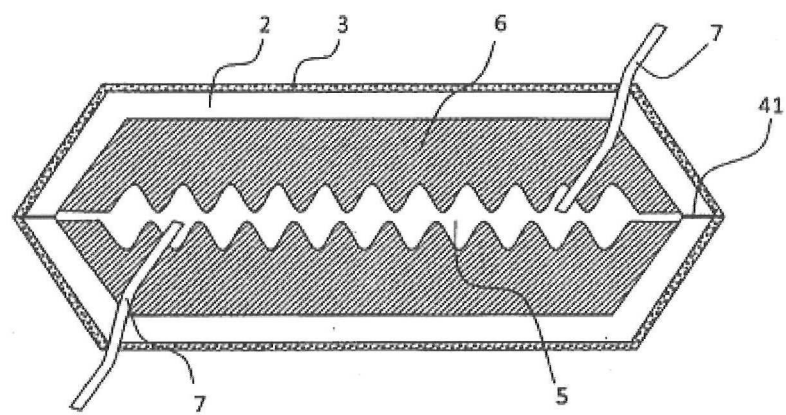
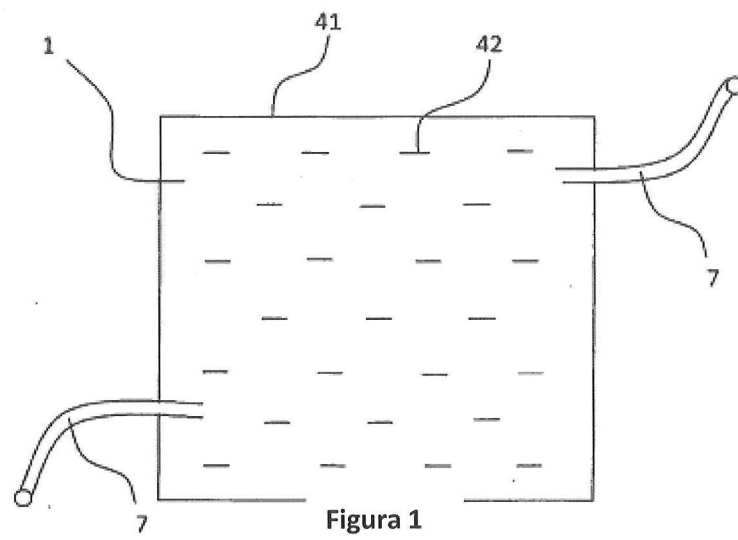
Estos ensayos muestran que VEGF induce una formación de vasos sanguíneos a largo plazo. La heparina también presenta un efecto de inducción de la vascularización.

Es interesante destacar que estos dos compuestos presentan un efecto sinérgico.

50

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Membrana semipermeable funcionalizada, para la fabricación de una cámara de encapsulación de células secretoras de un órgano bioartificial compuesto de un soporte biocompatible poroso **caracterizada porque:**
 - dicho soporte biocompatible poroso es previamente tratado para que su energía superficial sea superior o igual a 50 mJ.m^{-2} ;
 - los poros de dicho soporte biocompatible poroso tienen un tamaño interno que oscila entre 5 y 100 nm y
- 10 - dicha membrana semipermeable funcionalizada incluye, como mínimo, dos capas cada una de las cuales incluye un polímero hidrófilo y, como mínimo, una molécula biológicamente activa.
- 15 **2.** Membrana semipermeable funcionalizada, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el polímero hidrófilo es seleccionado entre compuestos celulósicos, poli(acrilamidas y sus copolímeros, polivinilpirrolidona (PVP) y sus copolímeros, polivinilalcoholes, copolímeros de acetato de vinilo, polietilenglicoles, polipropilenglicoles, poli(met)acrilatos hidrófilos, polisacáridos, polímeros a base de ácido hialurónico y quitosanos.
- 20 **3.** Membrana semipermeable funcionalizada, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizada porque** la molécula biológicamente activa es seleccionada entre agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos, anestésicos, factores de crecimiento, agentes estimulantes de la angiogénesis y/o inductores de la vascularización, agentes inductores de la cicatrización, agentes inmunosupresores, agentes antitrombóticos entre ellos agentes antiagregantes y agentes anticoagulantes, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) o moléculas estimulantes de la secreción de insulina.
- 25 **4.** Membrana semipermeable funcionalizada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** incluye, como mínimo, dos capas de polímero hidrófilo y de molécula biológicamente activa, la primera de dichas capas se ubica entre dicho soporte y la segunda capa e incluye un factor de crecimiento celular y la segunda de dichas capas incluye un agente antitrombótico.
- 30 **5.** Membrana semipermeable funcionalizada, según la reivindicación 4, **caracterizada porque** dicho factor de crecimiento celular es VEGF y **porque** dicho agente antitrombótico es una heparina.
- 35 **6.** Utilización de una membrana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de una cámara de encapsulación de células secretoras que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico.
- 40 **7.** Cámara de encapsulación de células secretoras que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico **caracterizada porque** sus paredes están formadas por una membrana semipermeable funcionalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que delimita un espacio susceptible de contener células secretoras que producen, como mínimo, una sustancia de interés terapéutico.
- 45 **8.** Órgano bioartificial **caracterizado porque** incluye, como mínimo, una cámara de encapsulación, según la reivindicación 7.
- 9.** Órgano bioartificial, según la reivindicación 8, **caracterizado porque** se trata de un páncreas bioartificial que contiene células de islotes pancreáticos.



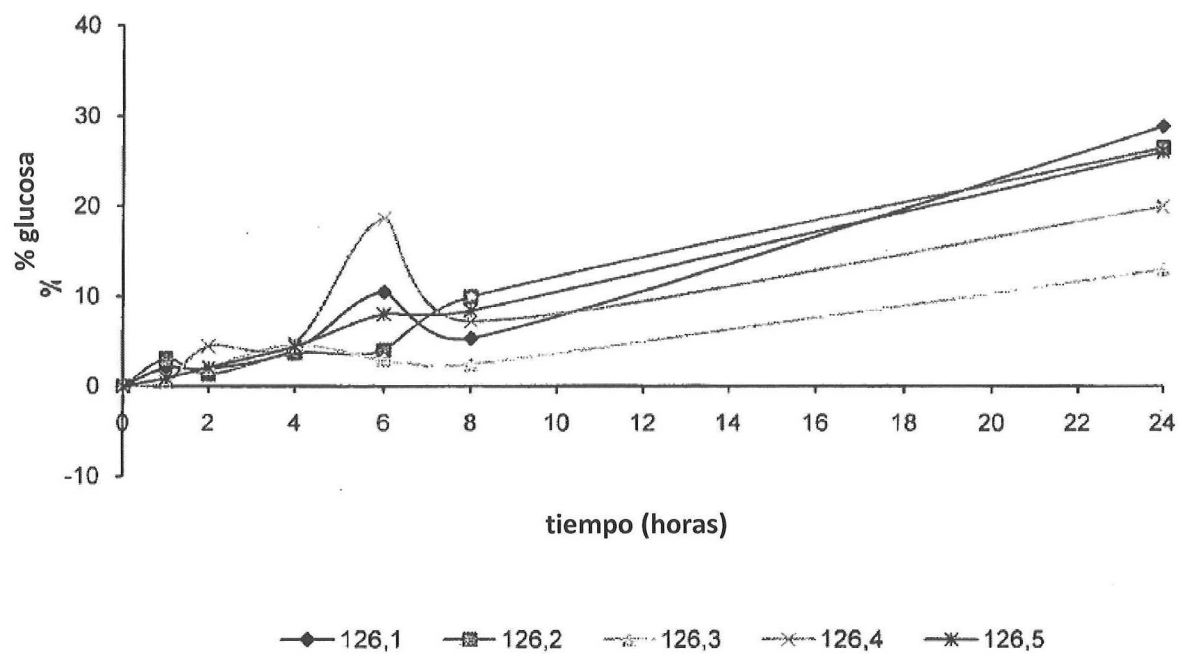


Figura 3

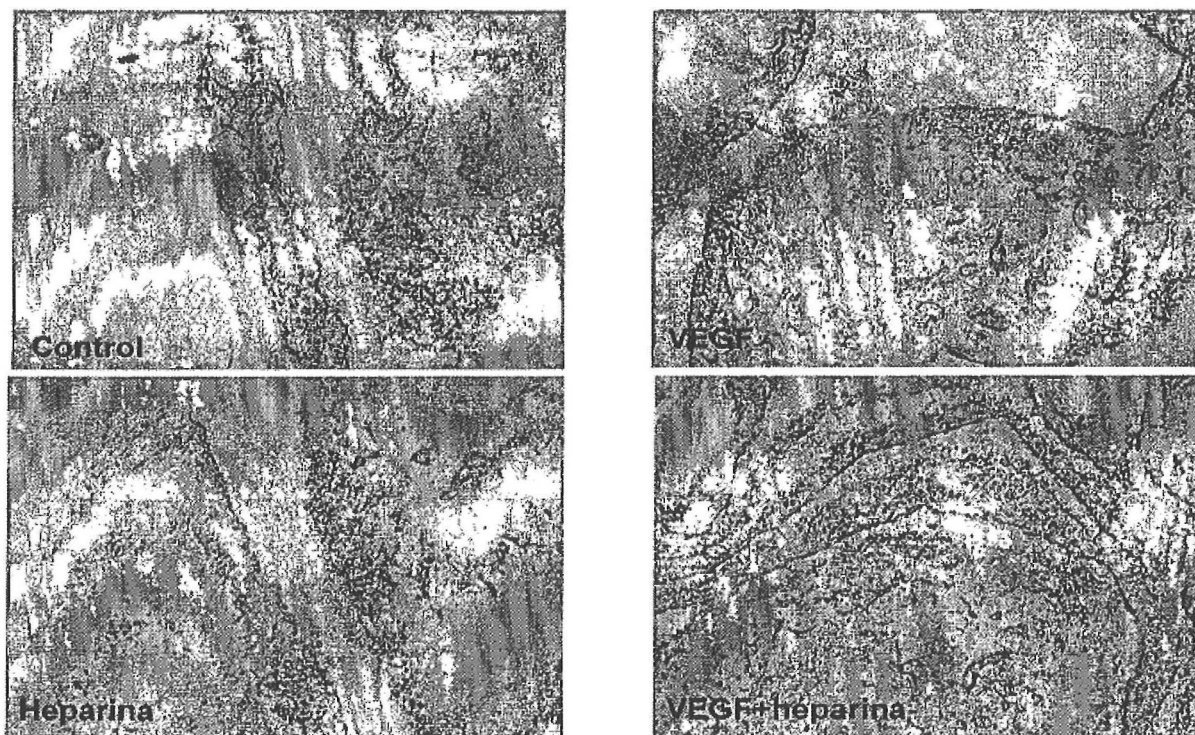


Figura 4

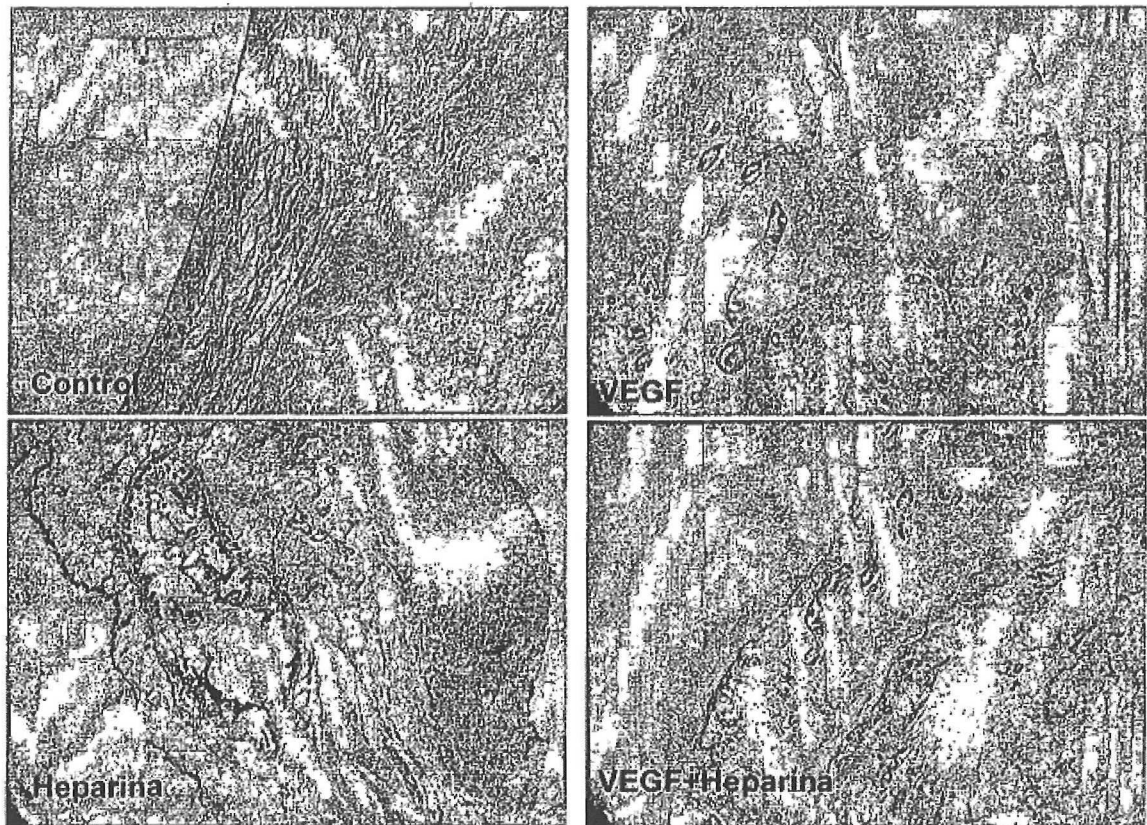


Figura 5

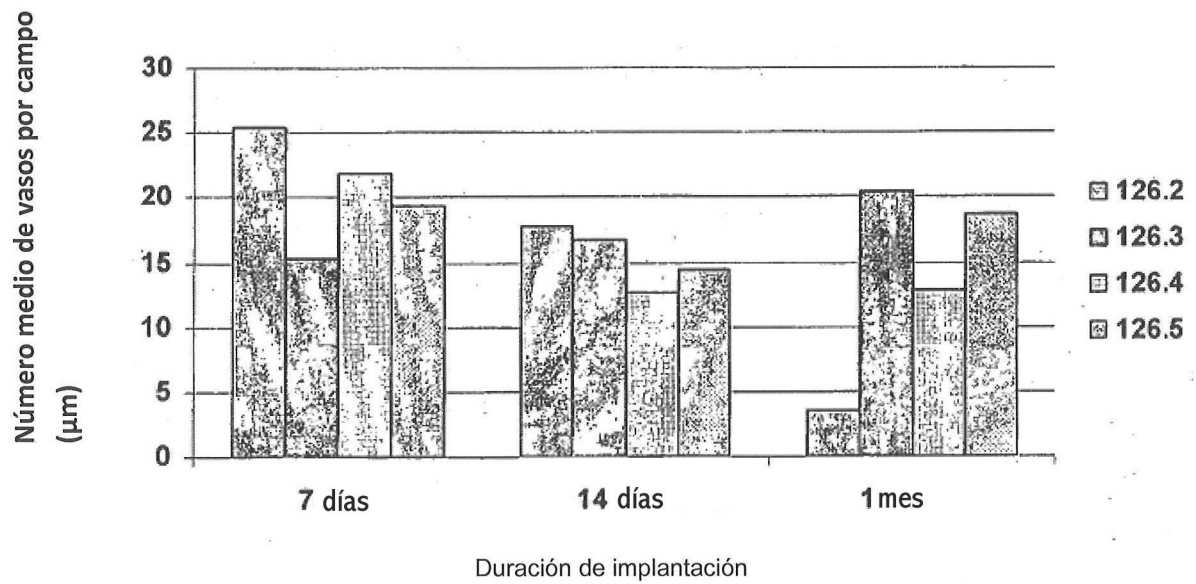


Figura 6

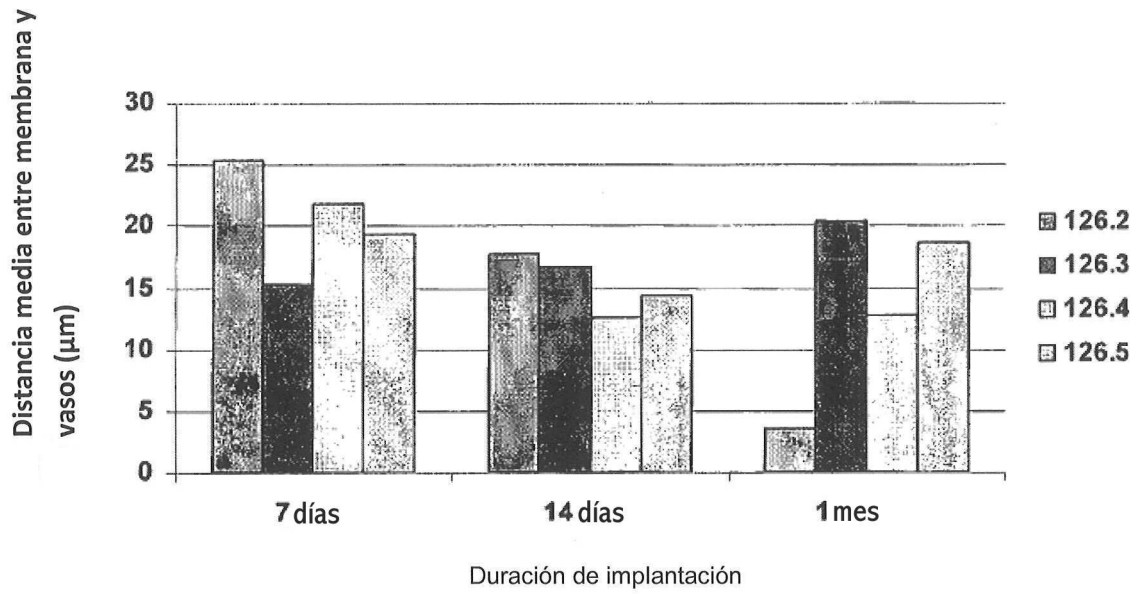


Figura 7

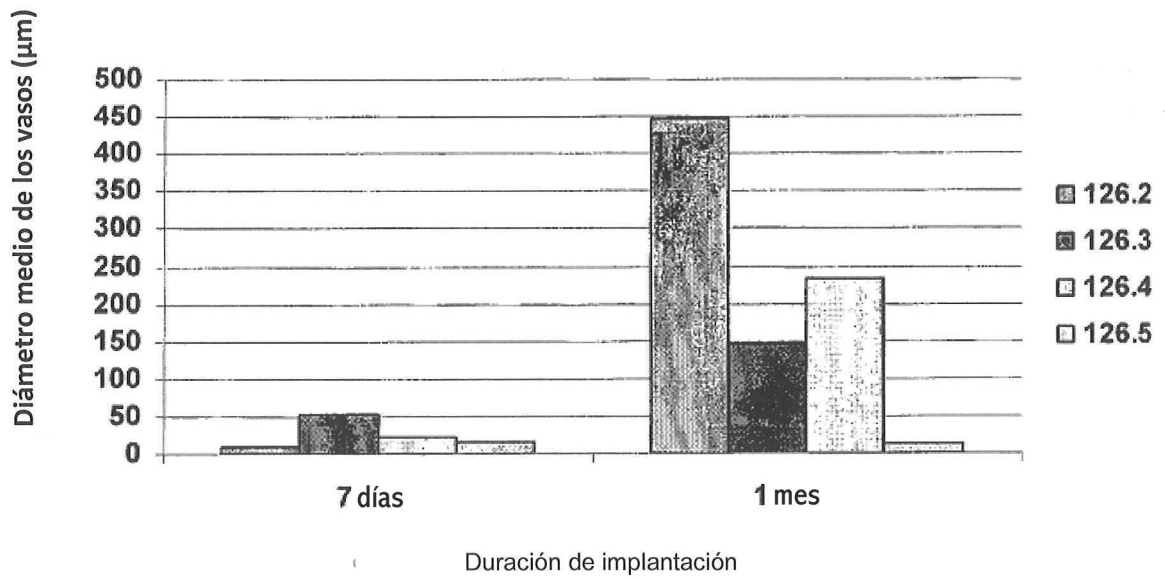


Figura 8