

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 628**

51 Int. Cl.:

<b>C08J 9/26</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/18</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/26</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/56</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/58</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2004 PCT/EP2004/006140**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2004 WO04108810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2004 E 04739671 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 1633807**

54 Título: **Matriz, implante celular, procedimiento para su preparación y su uso**

30 Prioridad:

**06.06.2003 DE 10325807**

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

**01.06.2017**

73 Titular/es:

**HUMAN AUTO CELL LIMITED (100.0%)  
Kingsmere House The Kings Drive  
Hersham, Surrey KT12 4BA, GB**

72 Inventor/es:

**GÖRNE, MARTIN y  
KAUFMANN, PETER MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 614 628 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

Matriz, implante celular, procedimiento para su preparación y su uso

5 La presente invención se refiere a matrices porosas a base de un polímero o de una mezcla de polímeros biológicamente compatible, a implantes celulares que se basan en éstas, a otros implantes celulares a base de mezclas de células de hepatocitos e islotes de Langerhans, a un procedimiento para la preparación de matrices porosas así como a las matrices que pueden obtenerse según este procedimiento y a un procedimiento especial para la obtención de células para la inoculación de una matriz implantable.

10 La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinar que une las ciencias de materiales y de ingeniería con la medicina. El objetivo es regenerar tejido dañado o mejorar su función.

15 El principio de la ingeniería de tejidos es relativamente sencillo: en primer lugar se extraen del paciente algunas células y se proliferan *in vitro*. Las células proliferadas pueden incrustarse entonces en una sustancia de soporte, de manera que se produce un sustituto de tejido completo, vivo, que se trasplanta de nuevo al paciente. A diferencia de un trasplante alogénico convencional, que requiere un donante adecuado y por regla general que requiere una inmunosupresión farmacológica de por vida, este procedimiento ofrece la ventaja decisiva de poder usar células propias del cuerpo (autólogas).

20 Son especialmente importantes para la aceptación y la capacidad de funcionamiento de los implantes el tipo y la estructura de la sustancia de soporte usada, a continuación denominada también matriz. Al margen del material que va a usarse, concretamente por regla general polímeros biodegradables, desempeñan el tamaño de poro, la porosidad y la superficie al igual que la forma de poro, la morfología de la pared de poro y la conectividad entre los poros un papel decisivo para el desarrollo posterior de las células incrustadas en la sustancia de soporte y finalmente para la estructura tridimensional del tejido u órgano que va a regenerarse.

30 Se conocen ya procedimientos para la generación de biomatrices de este tipo. Así se usaron ya técnicas del sector textil para fabricar biomatrices fibrosas de tipo tejido o también de tipo de material no tejido. Otro procedimiento familiar, en el que los cristales de sal se introducen en primer lugar en el polímero biodegradable y a continuación se eliminan de nuevo, permite controlar el tamaño de poro a través del tamaño de las partículas de sal y la porosidad a través de la proporción de sal/polímero (documento WO 98/44027). En caso de una modificación del procedimiento se aplican los polímeros biodegradables disueltos en un disolvente sobre un denominado material porógeno, que a continuación se elimina de nuevo del material compuesto, de manera que se dejan poros con la forma de la imagen negativa del material porógeno en cuestión (documento WO 01/87575 A2). También se conocen ya matrices revestidas (véase por ejemplo el documento WO 99/09149 A1). Hou y colaboradores describen en Biomaterials, volumen 24, páginas 1937-1947 una serie de distintos procedimientos para la preparación de matrices poliméricas. El documento WO 01/35932 describe matrices porosas a base de un polímero biológicamente compatible y procedimientos para su preparación. El documento WO 98/44027 describe un procedimiento para la preparación de matrices biodegradables de poro abierto. El documento US 6337198 B1 describe matrices porosas biodegradables y biocompatibles con una fase polimérica esencialmente continua.

45 No obstante no satisfacen en todos los casos las biomatrices generadas hasta ahora con este procedimiento en particular en cuanto a la aceptación y la capacidad de funcionamiento de implantes que se basan en éstas. En particular con implantes de hígado y páncreas no se ha logrado hasta ahora aún ningún sustituto aceptable de los órganos.

50 El objetivo en el que se basa la presente invención, poner a disposición un implante funcional de este tipo, lo consigue la invención mediante biomatrices determinadas y correspondientes implantes, que pueden obtenerse con un procedimiento especial.

Por tanto, son objeto de la presente invención los objetos definidos en las reivindicaciones.

55 El grado de porosidad es la indicación numérica en % con respecto a la proporción del volumen de poros en el volumen total de la matriz.

60 Con poros se refiere a las cavidades existentes en la matriz de acuerdo con la invención, que tienen en el presente caso en el coste 2-dimensional una forma angular, en particular octogonal o visto 3-dimensionalmente una forma angulosa. Preferentemente está caracterizada la forma además por estiramientos, de modo que puede compararse la forma de las cavidades con la forma de células nerviosas. El tamaño de un poro puede indicarse con ayuda de un diámetro, es decir el promedio del diámetro más largo y del diámetro más corto de los poros que pueden distinguirse en el corte 2-dimensional.

65 Una matriz de acuerdo con la invención presenta poros con distintos tamaños, estando distribuidos los tamaños por un determinado intervalo (distribución de tamaño de poro). De acuerdo con la invención es importante que una matriz presente una distribución de tamaño de poro ancha. Son especialmente ventajosas las matrices que

presentan poros con un tamaño de 130  $\mu\text{m}$  o inferior. Son especialmente ventajosas las matrices que presentan poros con un tamaño de 370  $\mu\text{m}$  o más. Las matrices que presentan tanto poros con un tamaño de 130  $\mu\text{m}$  o inferior como también poros con un tamaño de 370  $\mu\text{m}$  o más, pertenecen a la invención. Estos valores pueden combinarse de manera discrecional para obtener intervalos mínimos, por los que debe extenderse la distribución de tamaño de poro, pudiéndose mencionar en particular los intervalos de 150 a 300, de 140 a 350 y de 130 a 370  $\mu\text{m}$ . En particular se prefiere cuando la respectiva distribución de tamaño de poro presenta máximos de frecuencia fuera del intervalo de 150 a 300  $\mu\text{m}$ , es decir un máximo de frecuencia se encuentra por encima de un tamaño de poro de 300  $\mu\text{m}$  y otro máximo de frecuencia se encuentra por debajo de un tamaño de poro de 150  $\mu\text{m}$ .

Una matriz de acuerdo con la invención típica presenta la siguiente distribución de tamaño de poro. Del 0,5 % al 6 %, preferentemente del 1 % al 5 %, aún más preferentemente del 2 % al 4 % y en particular el 3 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 70 a 100  $\mu\text{m}$ ; del 2 % al 8 %, preferentemente del 3 % al 7 %, aún más preferentemente del 4 % al 6 % y en particular el 5 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 101 a 115  $\mu\text{m}$ ; del 2 % al 8 %, preferentemente del 3 % al 7 %, aún más preferentemente del 4 % al 6 % y en particular el 5 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 116 a 130  $\mu\text{m}$ ; del 1 % al 7 %, preferentemente del 2 % al 6 %, aún más preferentemente del 3 % al 5 % y en particular del 4 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 131 a 300  $\mu\text{m}$ ; del 11 % al 23 %, preferentemente del 13 % al 21 %, aún más preferentemente del 15 % al 19 % y en particular el 17 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 301 a 330  $\mu\text{m}$ ; del 4 % al 10 %, preferentemente del 5 % al 9 %, aún más preferentemente del 6 % al 8 % y en particular el 7 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 331 a 360  $\mu\text{m}$ ; del 5 % al 17 %, preferentemente del 7 % al 15 %, aún más preferentemente del 9 % al 13 % y en particular el 11 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 361 a 390  $\mu\text{m}$ ; del 7 % al 19 %, preferentemente del 9 % al 17 %, aún más preferentemente del 11 % al 15 % y en particular el 13 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 391 a 420  $\mu\text{m}$ ; del 3 % al 9 %, preferentemente del 4 % al 8 %, aún más preferentemente del 5 % al 7 % y en particular el 6 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 421 a 450  $\mu\text{m}$ ; del 12 % al 24 %, preferentemente del 14 % al 22 %, aún más preferentemente del 16 % al 20 % y en particular el 18 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 451 a 480  $\mu\text{m}$ ; y del 5 % al 17 %, preferentemente del 7 % al 15 %, aún más preferentemente del 9 % al 13 % y en particular el 11 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 481 a 510  $\mu\text{m}$ . Resulta por tanto por regla general una distribución de tamaño de poro con más de un máximo, lo que corresponde a un aumento de poros en más de un intervalo de tamaño. Esto es especialmente importante para las propiedades de matrices de acuerdo con la invención.

El volumen de cavidades y con ello el grado de porosidad se determinan de manera en sí conocida mediante porosimetría.

Los tamaños de poro y con ello también la distribución de tamaño de poro pueden determinarse por ejemplo mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello se producen cortes delgados de la matriz que va a someterse a prueba y se revisten con oro. Los registros de microscopía electrónica de barrido se evalúan, midiéndose todos los poros de una superficie definida, es decir determinándose para cada poro el diámetro más largo y el diámetro más corto, formándose la suma a partir de ambos valores y dividiendo se suma entre 2.

El término "matriz" se refiere a un soporte tridimensional que es adecuado para el asentamiento de células. En este sentido sirve la matriz como modelo de estructura tridimensional (molde) para el asentamiento de células o bien tejidos. Este asentamiento puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Además, la matriz sirve en caso de trasplante para la localización del trasplante y también como espaciadores para tejido, que se forma paulatinamente *in vivo*.

El polímero puede ser en principio cualquier polímero que puede usarse en el sector de la medicina y en particular de la medicina de trasplantes. Según esto son biológicamente compatibles también polímeros que si bien se reconocen como extraño por un huésped, sin embargo puede suprimirse su rechazo mediante correspondiente inmunosupresión. Pueden usarse polímeros que esencialmente no puedan degradarse biológicamente. Sin embargo se prefieren polímeros que puedan degradarse biológicamente al menos en parte predominante.

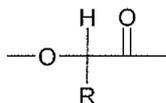
La expresión "biodegradable" se refiere a un material, que los seres vivos (o líquidos corporales o cultivos celulares que pueden derivarse de seres vivos) pueden transferir en productos que pueden metabolizarse. A los polímeros biodegradables pertenecen por ejemplo polímeros biorreabsorbibles y/o bioerosionables. Bioerosionable se refiere a la capacidad de disolverse o suspenderse en líquidos biológicos. Biorreabsorbible quiere decir la capacidad de poder absorberse por células, tejido o líquidos de un ser vivo.

A los polímeros biodegradables adecuados de acuerdo con la invención pertenecen en principio todos los polímeros que pueden usarse en el sector de la medicina, a lo cual pertenecen además de los polímeros establecidos ya en el sector de la ingeniería de tejido por ejemplo también polímeros que han encontrado acceso en dispositivos de emisión de principios activos, tales como parches e implantes de principios activos.

A los polímeros naturales adecuados pertenecen por ejemplo polipéptidos tales como albúmina, fibrinógeno, colágeno y gelatina, así como polisacáridos, tales como quitina, quitosano, alginato y agarosa. Eventualmente

pueden estar también modificados estos polímeros naturales, por ejemplo pueden estar reticulados transversalmente proteínas tales como colágeno.

5 A los polímeros sintéticos adecuados pertenecen por ejemplo determinados polianhídridos, en particular poli(ácido sebácico-ácido hexadecandioico), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(ortoéster), y sobre todo poli( $\alpha$ -hidroxiéster) tal como poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico-ácido láctico). Así se basan las matrices e implantes de acuerdo con la invención preferentemente en polímeros biodegradables, que contienen unidades de repetición de fórmula (I):



10 en la que R<sup>1</sup> representa hidrógeno o metilo. Con respecto a las unidades de ácido láctico, se prefiere así la forma L (el enantiómero S). Como polímero especialmente preferente puede mencionarse poli(ácido glicólico-ácido láctico) con una proporción de ácido glicólico con respecto a ácido láctico de 99:1 a 1:99, preferentemente de 10:90 a 90:10, por ejemplo del 15:85 % en moles.

Igualmente pueden ser convenientes mezclas de dos o varios polímeros.

20 Además del tipo de polímero determina conjuntamente también su peso molecular las propiedades de la matriz resultante. En general se aplica que la porosidad de la matriz disminuye con peso molecular creciente del polímero usado. Esto se aplica en particular cuando en la preparación de la matriz se espuma el material, es decir se mezcla bajo presión con un gas tal como CO<sub>2</sub>, que se disuelve en primer lugar en el polímero y forma poros al disminuir la presión.

25 Además, la cristalinidad del polímero usado repercute en las propiedades de la matriz resultante. En este caso se aplica que la porosidad de la matriz resultante aumenta en general con la disminución de la cristalinidad, por lo que se prefiere polímero amorfo en particular para matrices con alta porosidad. También este aspecto desempeña en particular un papel cuando el material se espuma en la producción de la matriz.

30 Otro objeto de la presente invención son matrices porosas a base de un polímero biodegradable, que están caracterizadas por que la superficie de la matriz está revestida con al menos una proteína de matriz extracelular.

35 Las proteínas de matriz extracelular se conocen en general. De acuerdo con la invención se prefieren colágenos, en particular colágenos del tipo I y IV, laminina y fibronectina. Estas proteínas pueden prepararse de manera en sí conocida en forma purificada o pueden adquirirse también comercialmente. De acuerdo con una forma de realización, los revestimientos de matrices de acuerdo con la invención contienen fibronectina como proteína de matriz extracelular. De acuerdo con otra forma de realización, los revestimientos de matrices de acuerdo con la invención contienen como proteína de matriz extracelular una mezcla de colágeno del tipo I, laminina y colágeno del tipo IV, prefiriéndose en este caso que la mezcla contenga las proteínas en proporciones en peso aproximadamente igual.

De acuerdo con la invención se prefieren especialmente matrices que están revestidas del tipo y modo descritos anteriormente y que cumplen al menos uno de los siguientes criterios adicionales:

- 45 - los poros de las matrices presentan los tamaños de poro o bien la distribución de tamaño de poro indicados anteriormente;
- el grado de porosidad asciende a del 93 % al 98 %;
- los poros presentan la forma indicada anteriormente;
- 50 - el polímero biodegradable es uno de los polímeros naturales o sintéticos indicados anteriormente, en particular poli(ácido glicólico-ácido láctico) con una proporción de ácido láctico de aproximadamente el 85 % en moles y una proporción de ácido glicólico de aproximadamente el 15 % en moles.

55 Las matrices revestidas de esta manera pueden obtenerse por ejemplo debido a que se sumerge la matriz no revestida en una solución, que contiene la proteína o la mezcla de proteínas prevista para el revestimiento, y a continuación se seca la matriz humedecida con la solución. A este respecto esto es por regla general de modo que dependiendo de las dimensiones del cuerpo de matriz que va a revestirse, la solución humedece sobre todo las zonas externas del cuerpo de matriz, mientras que en el interior del cuerpo de matriz penetra la solución comparativamente menos. Esto puede tener como consecuencia que no resulte un revestimiento uniforme de la superficie de matriz total, sino que la densidad del revestimiento disminuya de fuera hacia dentro.

60 Como alternativa o adicionalmente a un revestimiento pueden absorberse sustancias biológicamente activas en el polímero o incluso pueden enlazarse con el mismo. A esto pertenecen por ejemplo principios activos sintéticos (moléculas inorgánicas u orgánicas), proteínas, polisacáridos y otros azúcares, lípidos y ácidos nucleicos, que

influyen por ejemplo en el crecimiento celular, la migración celular, la división celular, la diferenciación celular y/o el crecimiento de tejido, o bien tienen acciones terapéuticas, profilácticas o de diagnóstico. Pueden mencionarse por ejemplo principios activos de acción vascular, principios activos de acción neuronal, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, esteroides, anticoagulantes, principios activos antiinflamatorios, principios activos inmunomoduladores, principios activos citotóxicos, antibióticos y principios activos antivirales.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de una matriz porosa a base de un polímero o de una mezcla de polímeros biológicamente compatible, que está caracterizado por que se compacta una mezcla de partículas de polímero y partículas de cloruro de sodio con tamaño de grano definido y a continuación se elimina el cloruro de sodio.

Ha resultado conveniente una proporción en peso de partículas de polímero con respecto a partículas de cloruro de sodio en el intervalo de 1:100 a 1:10, ventajosamente en el intervalo de 1:50 a 1:15 y en particular en el intervalo de 1:20 a 1:18 para el ajuste de la porosidad deseada.

Adicionalmente ha resultado conveniente usar sal y polímero con una determinada distribución de tamaño de grano. Con respecto al cloruro de sodio usado para la preparación de la matriz, es entonces favorable cuando la proporción de sal con un tamaño de grano de 250  $\mu\text{m}$  a 320  $\mu\text{m}$  asciende a del 22 % al 28 %; la proporción de sal con un tamaño de grano de 330  $\mu\text{m}$  a 380  $\mu\text{m}$  asciende a del 42 % al 46 %; y la proporción de sal con un tamaño de grano de 390  $\mu\text{m}$  a 425  $\mu\text{m}$  asciende a del 29 % al 33 %, refiriéndose las indicaciones en porcentaje al peso de sal usado en total para la preparación. Proporciones con tamaños de grano por encima y/o por debajo de los intervalos indicados no están descartados con esto.

Ha resultado favorable cuando la proporción de partículas de cloruro de sodio con un tamaño de grano de 108  $\mu\text{m}$  a 140  $\mu\text{m}$  asciende a del 7 % al 9 % en peso, la proporción de sal con un tamaño de grano de 145  $\mu\text{m}$  a 180  $\mu\text{m}$  asciende a del 5 % al 7 % en peso, la proporción de sal con un tamaño de grano de 185  $\mu\text{m}$  a 220  $\mu\text{m}$  asciende a del 10 % al 14 % en peso, la proporción de sal con un tamaño de grano de 225  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$  asciende a del 5 % al 7 % en peso, la proporción de sal con un tamaño de grano de 250  $\mu\text{m}$  a 320  $\mu\text{m}$  asciende a del 22 % al 28 % en peso, la proporción de sal con un tamaño de grano de 330  $\mu\text{m}$  a 380  $\mu\text{m}$  asciende a del 22 % al 28 % en peso, y la proporción de sal con un tamaño de grano de 390  $\mu\text{m}$  a 425  $\mu\text{m}$  asciende a del 15 % al 19 % en peso.

Con respecto al polímero usado para la preparación de la matriz, es entonces favorable cuando la proporción de polímero con un tamaño de grano de 108  $\mu\text{m}$  a 140  $\mu\text{m}$  asciende a del 14 % al 18 %; la proporción de polímero con un tamaño de grano de 145  $\mu\text{m}$  a 180  $\mu\text{m}$  asciende a del 20 % al 24; la proporción de polímeros con un tamaño de grano de 185  $\mu\text{m}$  a 220  $\mu\text{m}$  asciende a del 43 % al 49 %, y la proporción de polímero con un tamaño de grano de 225  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$  asciende a del 14 % al 18 %, refiriéndose las indicaciones en porcentaje al peso de polímero usado en total para la preparación.

Para obtener partículas de sal o bien de polímero de la distribución de tamaño de grano deseada, es conveniente por regla general triturar en primer lugar artículos habituales en el comercio. Esto puede realizarse en dispositivos usuales para ello, por ejemplo mecanismos percutores o molinos. Sin embargo es determinante para la distribución de tamaño de grano deseada el cribado posterior con ayuda de tamices de análisis usuales.

La compactación se realiza preferentemente mediante acción de presión. Para ello puede compactarse la mezcla de polímero/cloruro de sodio en una prensa hidráulica convencional con una presión de punzón en el intervalo de aproximadamente 780 psi a 1450 psi, ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 840 psi a 1230 psi y en particular en el intervalo de aproximadamente 900 psi a 1100 psi. Ha resultado conveniente dejar actuar la presión durante aproximadamente de 10 s a 360 s, ventajosamente durante aproximadamente de 40 s a 180 s y en particular durante aproximadamente de 50 s a 70 s a temperaturas en el intervalo de 18 °C a 25 °C.

La eliminación del cloruro de sodio se logra por ejemplo con agua o soluciones acuosas. Así puede regarse la mezcla compactada (pieza bruta de matriz) durante aproximadamente de 1 h a 80 h, ventajosamente durante aproximadamente 12 h a 62 h y en particular durante aproximadamente 36 h a 60 h.

Además es ventajoso cuando la mezcla compactada se almacena antes de la eliminación del cloruro de sodio en primer lugar en una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Así puede gasificarse la mezcla compactada por ejemplo con una presión de CO<sub>2</sub> en el intervalo de aproximadamente 140 psi a 1650 psi, ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 360 psi a 1120 psi y en particular en el intervalo de aproximadamente 800 psi a 900 psi, habiendo resultado convenientes en este caso tiempos en el intervalo de aproximadamente 1 h a 180 h, ventajosamente en el intervalo de aproximadamente 3 h a 60 h y en particular en el intervalo de aproximadamente 12 h a 36 h. Después se reduce la presión, teniendo la velocidad de reducción de la presión influencia sobre la formación de poros. Aunque se prefiere el uso de CO<sub>2</sub>, pueden ser adecuados igualmente otros gases, tales como aire, nitrógeno, helio, neón, criptón, argón, xenón u oxígeno.

A continuación se separa el agua o la solución acuosa para fines de secado de manera en sí conocida. Para ello

puede colocarse la matriz por ejemplo sobre papel absorbente.

De acuerdo con una forma de realización preferente se añade a la mezcla de partículas de polímero y partículas de cloruro de sodio una solución de polímero y se separa el disolvente antes de que se compacte. A este respecto pueden basarse las partículas de polímero y la solución de polímero en el mismo polímero. Sin embargo puede tratarse también de polímeros distintos, en particular con distinta biodegradabilidad. Aquel de la solución de polímero tiene la ventaja de que se insertan por así decirlo soportes en la matriz, de manera que pueden mejorarse las propiedades mecánicas de la matriz. Una matriz de este tipo presenta en particular una tendencia más baja al desmenuzamiento.

El disolvente usado debía disolver el polímero, sin embargo no la sal. Debido a ello se garantiza que las propiedades porógenas de la sal no se vean influenciadas o se vean influenciadas solo de manera insignificante. Acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, hexafluoroisopropanol, hidrocarburos clorados y fluorados, alifáticos y aromáticos, tetrahidrofurano, etilmetilcetona, dietilcetona así como mezclas de los mismo son adecuados por ejemplo para disolver los polímeros mencionados anteriormente. Para disolver poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico-ácido láctico) y con respecto al uso médico es adecuado en particular cloroformo.

Si se añaden conjuntamente la solución de polímero y la mezcla de partículas de polímero/partículas de sal, se producen en primer lugar una pasta que puede agitarse, que entonces se vuelve sólida rápidamente con la separación del disolvente. La concentración del polímero en la solución puede seleccionarse convenientemente de modo que por un lado el polímero se haya disuelto completamente, por otro lado puede separarse rápidamente el disolvente sin que se disuelvan parcialmente las partículas de polímero en alcance notable.

Ha resultado favorable una proporción en peso de partículas de polímero con respecto al polímero disuelto de 10:1 a 1:100, ventajosamente de 2:1 a 1:25 y en particular de 1:1 a 1:10.

Con respecto a la proporción en peso de partículas de polímero con respecto a partículas de cloruro de sodio, puede seleccionarse entonces en el contexto de esta forma de realización una proporción en peso más alta a favor de cloruro de sodio de hasta 1:200, 1:500 o 1:1000, siendo la proporción en peso del polímero total con respecto a cloruro de sodio al igual que antes mayor de 1:100. De esta manera se logra ajustar porosidades por encima del 98 %.

En el procedimiento descrito anteriormente sirve el cloruro de sodio como material porógeno, con lo que se quiere decir de acuerdo con la definición un material sólido o al menos semisólido, que se combina con el polímero formador de matriz en primer lugar para dar una mezcla y entonces se separa de nuevo de la mezcla, de manera que se producen cavidades (poros). Para ello es conveniente que el material porógeno sea soluble en al menos un disolvente y no sea soluble esencialmente en al menos otro disolvente. Esencialmente es insoluble un material en particular cuando éste es soluble en las condiciones de procesamiento, es decir por regla general a temperaturas en el intervalo de 18 °C a 25 °C y con presión normal, en menos del 30 % en peso, preferentemente en menos del 20 % en peso, en particular en menos del 10% en peso, por ejemplo en menos del 5, 4, 3, 2 y 1 % en peso.

La estructura y las propiedades de las matrices resultantes se determinan esencialmente mediante el material porógeno usado para su preparación. A este respecto desempeñan un papel no sólo el tipo del material porógeno, sino sobre todo la distribución de tamaño de grano de las partículas porógenas. Entonces se aplica en general que con tamaño de grano creciente no sólo aumenta el tamaño de poro, sino también la conectividad, es decir la red de cavidades que se comunican entre sí. Esta red, también denominada macroestructura o estructura macroporosa, ha de diferenciarse de los poros que pueden obtenerse mediante espumación, que por regla general son cerrados y por tanto forman una estructura designada como microestructura o estructura microporosa.

Procedimiento para la preparación de una matriz porosa a base de un polímero o de una mezcla de polímeros biológicamente compatible, caracterizado por que se compacta una mezcla de partículas de polímero, partículas de un material porógeno y una solución de polímero y a continuación se elimina el material porógeno.

Este procedimiento no está básicamente limitado a las características descritas anteriormente. Así puede seleccionarse el polímero entre polianhídridos, poli(ortoésteres), poli( $\alpha$ -hidroxiésteres), poli(esteramidas), poliamidas, poli(ésteréteres), policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquileno), poli(tereftalatos de alquileno), poli(alcoholes vinílicos), poliviniléteres, poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidonas, polisiloxanos, poliestirenos, poliuretanos, celulosas derivatizadas, polímeros y copolímeros de ácido (met)acrílico. El material porógeno es cloruro de sodio. El polímero, el material porógeno y el disolvente usado para la formación de la solución han de ajustarse básicamente uno con respecto a otro de modo que la solución contenga polímero en forma disuelta y partículas de polímero en forma sólida así como no disuelva esencialmente el material porógeno.

Las matrices que pueden obtenerse con el procedimiento descrito anteriormente son igualmente objeto de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención son implantes que comprenden al menos una de las matrices descritas anteriormente y al menos una célula. Dependiendo del fin del implante pueden seleccionarse las células a este respecto en particular entre células hepáticas, células pancreáticas, adipocitos, células intestinales, células de la piel, células vasculares, células nerviosas, células musculares, células tiroideas y células de la raíz dental. Las formas de realización especiales de implantes de acuerdo con la invención se refieren a células hepáticas y células pancreáticas.

Otro objeto de la presente invención son implantes que comprenden al menos una matriz a base de un polímero biológicamente compatible y células de al menos dos tipos celulares, siendo las células del primer tipo celular hepatocitos y las células del segundo tipo celular islotes de Langerhans. Este objeto no está limitado a las matrices descritas anteriormente, es decir implantes a base de las matrices de acuerdo con la invención.

Dependiendo del fin del implante, es decir en particular de la función que va a cumplir, son ventajosas determinadas proporciones de hepatocitos con respecto a islotes de Langerhans. Así, una forma de realización de la invención se refiere a implantes que tras el implante muestran las propiedades endocrinas de un órgano de páncreas equivalente. Para esto ha resultado ventajosa una proporción de hepatocitos con respecto a islotes de Langerhans de aproximadamente  $10^6$  : 3000. Otra forma de realización de la invención se refiere a implantes que tras el implante realizan funciones metabólicas de un hígado. Para esto ha resultado conveniente una proporción de hepatocitos con respecto a islotes de Langerhans de aproximadamente  $10^6$  : 3-200, ventajosamente de  $10^6$  : 10-100, en particular de  $10^6$  : 20-80 y de manera especialmente preferente de aproximadamente  $10^6$  : 35-45.

Puede mencionarse que los implantes de este tipo incluyen por regla general además de hepatocitos e islotes de Langerhans otras células, concretamente en particular otras células hepáticas y pancreáticas, que se producen conjuntamente durante el aislamiento celular.

Las células o mezclas de células que van a usarse para la colonización de matrices de acuerdo con la invención pueden obtenerse de manera en sí conocida. En el sentido de un implante autólogo proceden las células preferentemente del individuo al que debe colocarse el implante. Así se extrae del individuo por regla general tejido adecuado, por ejemplo un trozo de hígado o páncreas, y se prepara de manera adecuada para la inoculación y el cultivo *in vitro* de la matriz. Según esto es importante que las células presenten una tasa de vitalidad lo más alta posible.

Si se obtienen células hepáticas de tejido hepático, ha de tenerse en cuenta que las células hepáticas en particular en el caso de una cirrosis hepática están rodeadas por una capa gruesa de tejido conjuntivo. Para poder aislar las células hepáticas con una proporción a ser posible alta de células vitales, se usan de acuerdo con la invención soluciones de determinada composición.

Una composición acuosa A, que contiene NaCl, KCl y HEPES con un valor de pH de aproximadamente 7,4 es útil para su uso para la perfusión de un trozo de hígado o páncreas. En particular, 1000 ml de esta solución contienen aproximadamente 8,3 g de NaCl, 0,5 g de KCl y 2,38 g de HEPES. La perfusión se realiza preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C y una velocidad de flujo de aproximadamente 30 ml/min. Pocos minutos, en particular aproximadamente de 5 a 120 minutos, por ejemplo aproximadamente 7 minutos, bastan para perfundir de manera suficiente el trozo de tejido a la velocidad de flujo mencionada anteriormente.

Como alternativa a esto puede usarse también una composición acuosa A', que contiene un ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) para perfundir un trozo de hígado o de páncreas.

Una composición acuosa B con un valor de pH de aproximadamente 7,3 a 7,4, preferentemente de aproximadamente 7,35, que contiene NaCl, KCl, HEPES, CaCl<sub>2</sub>, colagenasa e inhibidor de tripsina, es útil para su uso para perfundir un trozo de hígado o páncreas. Preferentemente, 1000 ml de la solución contienen 8,3 g de NaCl, 0,5 g de KCl, 2,38 g de HEPES, 0,7 g de CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 500 mg de colagenasa H y 7,5 mg de inhibidor de tripsina. También en este caso ha resultado conveniente la perfusión a aproximadamente 37 °C y una velocidad de flujo de aproximadamente 30 ml/min. Pocos minutos, en particular de aproximadamente 5 a 10 minutos, por ejemplo de aproximadamente 6 a 7 minutos, bastan para perfundir de manera suficiente el trozo de tejido.

Como alternativa a esto puede usarse también una composición acuosa B' para perfundir un trozo de hígado o de páncreas, que contiene colagenasa y hialuronidasa. Preferentemente, 1000 ml de la solución contienen de 5 a 10 U/ml de colagenasa y de 5 a 10 U/ml de hialuronidasa.

Es ventajoso para la vitalidad de las células que van a obtenerse, cuando el trozo de tejido se trata en primer lugar con composición A y a continuación con composición B. Como alternativa a esto puede usarse en primer lugar una composición A' y entonces una composición B'.

A continuación de la perfusión puede prepararse libremente entonces el trozo de tejido y agitarse cuidadosamente en un medio adecuado, por ejemplo medio E de Williams. Si la suspensión celular resultante contiene aún restos celulares más gruesos, éstos pueden separarse de manera en sí conocida, por ejemplo filtrándose la suspensión

celular a través de una red de nailon (200 µm). Las células del filtrado pueden sedimentarse entonces de manera cuidadosa, habiendo resultado ventajosa una centrifugación de tres minutos a 50 g y 4 °C.

La aplicación de las células obtenidas sobre las matrices se realiza de manera en sí conocida. Por regla general se aplican las células como solución que contiene células sobre la matriz y a continuación se incuban (habitualmente en condiciones de cultivo celular), hasta que las células se adhieren a la matriz. Si se aplican más de un tipo de célula, por ejemplo hepatocitos e islotes de Langerhans, sobre una matriz, pueden aplicarse los distintos tipos celulares en principio conjuntamente o sin embargo sucesivamente. De acuerdo con una forma de realización especial se aplican en primer lugar islotes de Langerhans y a continuación hepatocitos, incubándose en cada caso tras la aplicación hasta que al menos una parte de las células se adhiera a la matriz.

Las matrices e implantes de acuerdo con la invención presentan ventajas decisivas. Así, las dimensiones internas de las matrices permiten un asentamiento eficaz con células. Las matrices por un lado pueden conformarse libremente y por otro lado ofrecen de manera suficiente estabilidad y rigidez, para soportar el procedimiento de implante quirúrgico y resistir a las fuerzas mecánicas que actúan en el lugar de implante. La muerte celular inicial, que comienza tras el implante está limitada y el tejido implantado puede adoptar tras breve tiempo la función pretendida. Brevemente tras el implante se produce la vascularización o bien la proliferación de tejido de granulación rico en vasos y también de tejido nervioso. Las matrices de acuerdo con la invención pueden prepararse sin que deban usarse disolventes fisiológicamente preocupantes, por ejemplo formaldehído, de modo que no sea necesario ningún procedimiento especial para la eliminación de los disolventes y no exista el riesgo de que queden cantidades residuales de estos disolventes.

Las matrices e implantes de acuerdo con la invención presentan múltiples posibilidades de uso. De esto pueden mencionarse en particular usos en el sector de la medicina. Otro objeto de la presente invención son por tanto las matrices e implantes de acuerdo con la invención para su uso terapéutico.

Un uso especial en este sector es el de la construcción de tejido (ingeniería de tejido). A este respecto sirven las matrices de acuerdo con la invención por así decirlo como soporte (*scaffold*), en el que migran células y/o se adhieren.

Para esto pueden inocularse las matrices por ejemplo *in vitro* con las células deseadas, por ejemplo pueden mezclarse con una solución que contiene células e incubarse, hasta que las células se hayan adherido a la matriz. Una matriz de este tipo con células adheridas a la misma (en este caso designado con implante) puede someterse entonces a otras medidas de procedimiento, por ejemplo cultivo posterior, eventualmente con acción de principios activos, por ejemplo para la expansión posterior de las células o para la modelación de sus propiedades, y/o puede guardarse hasta el implante de manera adecuada, por ejemplo en hielo o en un biorreactor de flujo en condiciones estándar. En el contexto de este uso es ventajoso poder aislar las células determinadas para el implante en primer lugar *in vitro* y eventualmente poder expandirlas también. En particular se posibilita debido a ello la aplicación de distintos tipos celulares, tal como los hepatocitos junto con islotes de Langerhans descritos anteriormente, sobre una matriz.

En lugar de una inoculación *in vitro*, otra posibilidad consiste en implantar la matriz (sin adherencia de células previa) con el objetivo de provocar células precursoras capacitadas para la regeneración de tejido, hacerlas migrar a un tejido dañado y regenerar allí el tejido desaparecido. La matriz debe estar configurada para ello de modo que puedan migrar a la matriz células deseadas, sin embargo no células indeseadas. Un uso de este tipo se designa en general como regeneración de tejido guiada (GTR para "Guided Tissue Regeneration").

Una matriz de acuerdo con la invención o un implante de acuerdo con la invención puede servir por tanto para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal. Para ello se colocan una o varias matrices o bien uno o varios implantes en el cuerpo que va a tratarse en medio de una intervención quirúrgica. Si el implante contiene células con función de órgano o bien deben migrar a la matriz células con función de órgano, tal como es el caso por ejemplo con hepatocitos o islotes de Langerhans, pueden implantarse las matrices o implantes por ejemplo en el mesenterio, tejido subcutáneo, retroperitoneo, la cavidad properitoneal o la cavidad intramuscular del individuo que va a tratarse.

Con las matrices o bien los implantes de acuerdo con la invención pueden tratarse en principio todos los individuos que requieran un sustituto de tejido correspondiente. Éstos son por regla general individuos que padecen un determinado trastorno o enfermedad, en cuyo desarrollo se produce la pérdida de tejido funcional. Esto puede afectar eventualmente a órganos completos, por ejemplo el hígado o el páncreas. Así se refiere la presente invención en particular al uso en el tratamiento de enfermedades que conducen a fallo crónico del hígado o páncreas. A esto pertenecen por ejemplo la hepatitis crónica y la cirrosis biliar en adultos así como atresia biliar y defectos metabólicos congénitos en niños. También en caso de carcinomas hepáticos puede estar indicado un trasplante de hígado. Por el contrario, una trasplante de páncreas está indicado en particular en caso de todas las formas de una diabetes mellitus, en particular una del tipo I o II.

Una matriz de acuerdo con la invención o un implante de acuerdo con la invención es útil en la facilitación de un agente terapéutico para el trasplante de un individuo y a este respecto en particular para el tratamiento de un

individuo, que padece una pérdida al menos parcial de tejido funcional, que debe sustituirse mediante el trasplante.

Los siguientes ejemplos ilustrarán la invención, sin limitarla en su alcance.

#### 5 Ejemplo 1

##### Preparación de la matriz

##### 10 a) Sin solución de polímero

10 Se congelan en nitrógeno líquido microgránulos de polímero (Resomer® RG 858, que puede obtenerse de la empresa Boehringer-Ingelheim) y se trituran en el estado congelado (mecanismo percutor de la empresa Däschle; 12000 r/min durante 2 min). Las partículas de polímero trituradas se tamizan. Las partículas con un tamaño de 108  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$  se usan para la preparación de la matriz. A este respecto tiene el 16 % en peso del polímero usado un tamaño de partícula entre 108  $\mu\text{m}$  y 140  $\mu\text{m}$ , el 22 % en peso del polímero usado un tamaño de partícula entre 145  $\mu\text{m}$  y 180  $\mu\text{m}$ , el 46 % en peso del polímero usado un tamaño de partícula entre 185  $\mu\text{m}$  y 220  $\mu\text{m}$ , y el 16 % en peso del polímero usado un tamaño de partícula entre 225  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$ . Se tamiza cloruro de sodio y las partículas de cloruro de sodio con un tamaño de grano de 250  $\mu\text{m}$  a 425  $\mu\text{m}$  se usan para la preparación de la matriz. A este respecto tiene el 25 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 250  $\mu\text{m}$  y 320  $\mu\text{m}$ , el 44 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 330  $\mu\text{m}$  y 380  $\mu\text{m}$ , y el 31 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 390  $\mu\text{m}$  y 425  $\mu\text{m}$ . Se mezclan entre sí 760 mg de partículas de cloruro de sodio y 40 mg de partículas de polímero. La mezcla se introduce en un molde de punzonado y con una prensa hidráulica se comprime con una presión del punzón de 1000 psi durante 1 minuto. A continuación se colocan las piezas en bruto de matriz sobre un plato de teflón y se gasifican durante 24 horas en una atmósfera de CO (850 psi). Entonces se riegan las piezas en bruto durante 24 horas para disolver los granos de sal incluidos. Finalmente se secan las matrices durante 12 horas sobre papel absorbente.

La matriz polimérica resultante presenta una porosidad de 95 +/- 2 % y un tamaño de poro definido, determinado por medio de microscopía electrónica de barrido, de 250  $\mu\text{m}$  +/- 120  $\mu\text{m}$ .

##### 30 b) Con solución de polímero

35 Se muele (mecanismo percutor de la empresa Däschle; 12000 r/min durante 2 min) cloruro de sodio (analíticamente puro) y a continuación se tamiza, y las partículas de cloruro de sodio con un tamaño de grano de 108 a 425  $\mu\text{m}$  se usan para la preparación de la matriz. A este respecto tiene el 8 % de la sal usada un tamaño de partícula entre 108  $\mu\text{m}$  y 140  $\mu\text{m}$ , el 6 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 145  $\mu\text{m}$  y 180  $\mu\text{m}$ , el 12 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 185  $\mu\text{m}$  y 220  $\mu\text{m}$ , el 6 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 225  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$ , el 25 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 250  $\mu\text{m}$  y 320  $\mu\text{m}$ , el 26 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 330  $\mu\text{m}$  y 380  $\mu\text{m}$ , y el 17 % en peso de la sal usada un tamaño de partícula entre 390  $\mu\text{m}$  y 425  $\mu\text{m}$ . Se mezclan 96 g de partículas de cloruro de sodio con 1 g de las partículas de polímero descritas en el ejemplo 1 a) y a continuación se mezclan con 100 ml de una solución de cloroformo, que contiene disuelto 4 g del polímero. La mezcla así obtenida se calienta a de 45 °C a 65 °C, de manera que el cloroformo se evapora en el intervalo de aproximadamente 25 minutos. La mezcla de sal-polímero que queda se comprime entonces con una prensa hidráulica con una presión de punzón de 1000 psi durante un minuto y a continuación se riega durante 24 horas para disolver los granos de sal incluidos. A continuación se gasifica la matriz, tal como se ha descrito anteriormente, y finalmente se seca durante 12 horas sobre papel absorbente.

La matriz de polímero resultante presenta una porosidad del 96 %.

50 Si se mezclan 98,5 g de partículas de sal con 0,5 g de partículas de polímero y se mezcla la mezcla con 100 ml de una solución de cloroformo, que contiene 1 g de polímero, se obtiene una matriz con una porosidad del 99 %.

55 Si se mezclan 99,2 g de partículas de sal con 0,1 g de partículas de polímero y se mezcla esta mezcla con 100 ml de una solución de cloroformo, que contiene aproximadamente 0,9 g de polímero, se obtiene una matriz de polímero con una porosidad del 99 %.

#### Ejemplo 2

##### 60 a) Revestimiento de la matriz con fibronectina

La matriz del ejemplo 1 se sumerge en una solución de tampón carbonato que contiene 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fibronectina de plasma humano (Sigma) con un valor de pH de 9,4. Tras aproximadamente 60 s se saca la matriz de la solución, se liofiliza y se esteriliza por rayos  $\gamma$ .

65

## Ejemplo 3

## Aislamiento de células

5 Se extrae del individuo que va a trasplantarse de manera en sí conocida un trozo de hígado. El trozo de hígado extraído se perfunde en primer lugar durante 7 minutos con una velocidad de flujo de 30 ml/min y 37 °C con una solución (8,3 g de NaCl; 0,5 g de KCl; 2,38 g de HEPES; agua destilada añadida hasta 1000 ml; valor de pH 7,4). A continuación se perfunde el trozo de hígado durante otros 6 a 7 min con una velocidad de flujo de 30 ml/min y 37 °C con una solución de colagenasa- inhibidor de tripsina (8,3 g de NaCl; 0,5 g de KCl; 2,38 g de HEPES; 0,7 g de CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 500 mg de colagenasa (colagenasa H, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania); 7,5 mg de inhibidor de tripsina (ICN, Eschwege, Alemania); agua destilada añadida hasta 1000 ml; valor de pH 7,35). Tras finalizar la perfusión se preparó libremente el trozo de hígado y se agitó cuidadosamente en medio E de Williams. Se filtra la suspensión de células (red de nailon; 200 μm) y a continuación se lava con medio E de Williams. A continuación se centrifugan las células durante 3 min a 50 g y 4 °C. La vitalidad de las células determinada con azul de tripano asciende al 95 %.

De igual manera se aíslan islotes de Langerhans de un trozo de páncreas.

## Ejemplo 4

## Colonización de células

Las matrices revestidas en el ejemplo 2 se incuban en la primera etapa con islotes de Langerhans, que se aislaron de acuerdo con el ejemplo 3.

25 Para ello se suspendieron 3000 islotes por ml en una mezcla de solución de M199 y FKS (proporción en volumen de 19:1). El número de células se determina, contándose éstas en un microscopio inverso Olympus en un tubo contador de 0,25 mm. Entonces se aplican de 8 ml a 10 ml de esta solución con una pipeta sobre la matriz. La solución en exceso que no permanece en la matriz se descarta. La matriz así tratada se coloca a continuación, para la adhesión de las células, durante 4 horas en una estufa incubadora de cultivos celulares. A continuación se aplica sobre la matriz una solución de medio E de Williams, que contiene por ml una suspensión de células hepáticas no purificadas con aproximadamente  $5,0 \times 10^7$  hepatocitos vitales y aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  de células hepáticas no parenquimatosas. Se aplican de 8 ml a 12 ml de solución con una pipeta; la solución en exceso no absorbida por la matriz se descarta. La matriz puede mantenerse en hielo hasta el implante durante aproximadamente 1,5 horas. Si un implante está previsto para un momento posterior, puede guardarse la matriz en un biorreactor de flujo en condiciones estándar hasta 5 días.

## Ejemplo 5

## Actividad secretora y velocidad de proliferación de los hepatocitos

Se trasplantaron ratas Lewis con matrices colonizadas con células según el ejemplo 4. Los trasplantes se extrajeron de nuevo de los animales en distintos momentos y se sometieron a estudio morfológicamente. El número de células de los trasplantes que presentaban la forma de un disco redondo con un diámetro de 15 mm y un espesor de 2 mm ascendía 1, 6 y 12 meses tras el trasplante a  $94 \times 10^3$ ,  $140 \times 10^3$  o bien a  $146 \times 10^3$  células. Los hepatocitos del trasplante extraído un mes tras el trasplante presentan una expresión de albúmina normal. En todos los preparados se encuentran hepatocitos proliferantes, sin que exista una velocidad de proliferación patológicamente elevada. En comparación con preparados patrón de hígado, los hepatocitos trasplantados de acuerdo con la invención presentan una instalación elevada en el factor 3 de BrdU.

## Ejemplo 6

## Vascularización

55 El otro estudio de las matrices descritas en el ejemplo 4 da como resultado que éstas están vascularizadas de manera excelente ya un mes tras el implante. Los vasos sanguíneos alcanzan macroscópicamente hasta la matriz y los hepatocitos e islotes de Langerhans trasplantados consiguen el contacto, mediante una capilarización suficiente, con el sistema cardiovascular del receptor del trasplante.

60 Puede determinarse además que los islotes de Langerhans cotrasplantados no origina en el receptor ninguna hipoglucemia. La potencia de secreción endocrina de estas células así como de los islotes propios del receptor se regula probablemente mediante un mecanismo de retroacoplamiento.

Ejemplo 7

Adopción de la función hepática

- 5 Las ratas Gunn valen como modelo animal para el síndrome de Crigler-Najar humano, dado que su hígado como consecuencia de un defecto enzimático metabólico congénito específico no puede conjugarse bilirrubina suficientemente. Como consecuencia, niveles en plasma tóxicos de bilirrubina no conjugada conducen a través de numerosos daños secundarios hacia la muerte.
- 10 Tres ratas Gunn se trasplantan con una matriz colonizada con células de acuerdo con el ejemplo 4. La matriz tiene una superficie externa de en total 10 cm<sup>2</sup>.

15 Ya cuatro semanas tras el trasplante disminuye el nivel de bilirrubina de los animales de ensayo. La bilirrubina se conjuga ahora. La bilirrubina conjugada puede detectarse en todos los tres casos en los conductos biliares del hígado aún existente con ayuda de una sonda de conducto biliar. Por consiguiente, la bilirrubina conjugada en la matriz llega de manera hematogena al hígado y puede secretarse allí a través del sistema de conductos biliares.

Ejemplo 8

20 Pacientes humanos

25 Un paciente con una cirrosis hepática pronunciada se trasplanta con matrices colonizadas con células de acuerdo con el ejemplo 4 en la cavidad abdominal. La siguiente tabla 1 resume los resultados de laboratorio del paciente antes del trasplante.

Tabla 1

Parámetro	Paciente 1
GOT	27
GPT	35
gGt	89
CHE	2421
albúmina sérica	24,1

30 El paciente (cirrosis hepática etil-tóxica, anteriormente descompensada múltiples veces, ahora no activa) recibió 4 matrices (en cada caso 124 mm x 45 mm x 5 mm).

La siguiente tabla 2 resume los valores hepáticos 3, 10 o bien 20 semanas tras el trasplante.

Tabla 2

	Paciente 1		
	3	10	20
GOT	22	10	11
GPT	28	9	28
gGt	71	10	9
Albúmina sérica	28,6	42	44
CHE	2652	4400	4600

## REIVINDICACIONES

1. Matriz porosa a base de un polímero o de una mezcla de polímeros biológicamente compatibles, **caracterizada por que** la matriz presenta poros con un tamaño de 130  $\mu\text{m}$  o inferior y poros con un tamaño de 370  $\mu\text{m}$  o superior, el grado de porosidad asciende a del 93 al 98 % y la matriz puede obtenerse mediante compactación de una mezcla de partículas de polímero con un tamaño de grano en el intervalo de 20 a 950  $\mu\text{m}$  y partículas de cloruro de sodio con un tamaño de grano en el intervalo de 90 a 670  $\mu\text{m}$  y posterior eliminación del cloruro de sodio, siendo el grado de porosidad la indicación numérica en % con respecto a la proporción del volumen de poros en el volumen total de la matriz y presentando la matriz la siguiente distribución de tamaño de poro: del 0,5 % al 6 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 70 a 100  $\mu\text{m}$ ; del 2 % al 8 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 101 a 115  $\mu\text{m}$ ; del 2 % al 8 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 116 a 130  $\mu\text{m}$ ; del 1 % al 7 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 131 a 300  $\mu\text{m}$ ; del 11 % al 23 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 301 a 330  $\mu\text{m}$ ; del 4 % al 10 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 331 a 360  $\mu\text{m}$ ; del 5 % al 17 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 361 a 390  $\mu\text{m}$ ; del 7 % al 19 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 391 a 420  $\mu\text{m}$ ; del 3 % al 9 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 421 a 450  $\mu\text{m}$ , del 12 % al 24 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 451 a 480  $\mu\text{m}$ ; y del 5 % al 17 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 481 a 510  $\mu\text{m}$ , determinándose los tamaños de poro y la distribución de tamaño de poro mediante microscopía electrónica de barrido.
2. Matriz según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la matriz presenta la siguiente distribución de tamaño de poro: del 1 % al 5 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 70 a 100  $\mu\text{m}$ ; del 3 % al 7 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 101 a 115  $\mu\text{m}$ ; del 3 % al 7 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 116 a 130  $\mu\text{m}$ ; del 2 % al 6 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 131 a 300  $\mu\text{m}$ ; del 13 % al 21 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 301 a 330  $\mu\text{m}$ ; del 5 % al 9 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 331 a 360  $\mu\text{m}$ ; del 7 % al 15 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 361 a 390  $\mu\text{m}$ ; del 9 % al 17 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 391 a 420  $\mu\text{m}$ ; del 4 % al 8 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 421 a 450  $\mu\text{m}$ ; del 14 % al 22 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 451 a 480  $\mu\text{m}$ ; y del 7 % al 15 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 481 a 510  $\mu\text{m}$ .
3. Matriz según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la matriz presenta la siguiente distribución de tamaño de poro: del 2 % al 4 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 70 a 100  $\mu\text{m}$ ; del 4 % al 6 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 101 a 115  $\mu\text{m}$ ; del 4 % al 6 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 116 a 130  $\mu\text{m}$ ; del 3 % al 5 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 131 a 300  $\mu\text{m}$ ; del 15 % al 19 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 301 a 330  $\mu\text{m}$ ; del 6 % al 8 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 331 a 360  $\mu\text{m}$ ; del 9 % al 13 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 361 a 390  $\mu\text{m}$ ; del 11 % al 15 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 391 a 420  $\mu\text{m}$ ; del 5 % al 7 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 421 a 450  $\mu\text{m}$ ; del 16 % al 20 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 451 a 480  $\mu\text{m}$ ; y del 9 % al 13 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 481 a 510  $\mu\text{m}$ .
4. Matriz según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la matriz presenta la siguiente distribución de tamaño de poro: el 3 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 70 a 100  $\mu\text{m}$ ; el 5 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 101 a 115  $\mu\text{m}$ ; el 5 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 116 a 130  $\mu\text{m}$ ; el 4 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 131 a 300  $\mu\text{m}$ ; el 17 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 301 a 330  $\mu\text{m}$ ; el 7 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 331 a 360  $\mu\text{m}$ ; el 11 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 361 a 390  $\mu\text{m}$ ; el 13 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 391 a 420  $\mu\text{m}$ ; el 6 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 421 a 450  $\mu\text{m}$ ; el 18 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 451 a 480  $\mu\text{m}$ ; y el 11 % de poros con un diámetro promedio en el intervalo de 481 a 510  $\mu\text{m}$ .
5. Matriz según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** el polímero biológicamente compatible es un polímero biodegradable, que se selecciona entre polímeros naturales, tales como albúmina, fibrinógeno, colágeno, gelatina, quitina, quitosano, agarosa, alginato y polímeros sintéticos, tales como polianhidridos, poli( $\epsilon$ -caprolactona) y poli( $\alpha$ -hidroxiésteres).
6. Matriz según la reivindicación 5, **caracterizada por que** el polímero biodegradable es poli(ácido glicólico-ácido láctico) con una proporción de ácido láctico del 85 % en moles y una proporción de ácido glicólico del 15 % en moles.
7. Matriz según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada por que** la superficie de la matriz está revestida con al menos una proteína de matriz extracelular, que se selecciona entre colágenos, laminina y fibronectina.

8. Matriz según la reivindicación 7, **caracterizada por que** el revestimiento contiene fibronectina o **por que** el revestimiento contiene una mezcla de colágeno del tipo I, laminina y colágeno del tipo IV.
9. Procedimiento para la preparación de una matriz porosa a base de un polímero o de una mezcla de polímeros biológicamente compatibles según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** se compacta una mezcla de partículas de polímero y partículas de cloruro de sodio y a continuación se elimina el cloruro de sodio, en el que las partículas de cloruro de sodio están compuestas de una mezcla del 22 % al 28 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 250  $\mu\text{m}$  a 320  $\mu\text{m}$ , del 42 % al 46 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 330 a 380  $\mu\text{m}$ , y del 29 % al 33 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 390  $\mu\text{m}$  a 425  $\mu\text{m}$  o están compuestas de una mezcla del 7 % al 9 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 108  $\mu\text{m}$  a 140  $\mu\text{m}$ , del 5 % al 7 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 145  $\mu\text{m}$  a 180  $\mu\text{m}$ , del 10 % al 14 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 185  $\mu\text{m}$  a 220  $\mu\text{m}$ , del 5 % al 7 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 225  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ , del 22 % al 28 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 250  $\mu\text{m}$  a 320  $\mu\text{m}$ , del 22 % al 28 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 330  $\mu\text{m}$  a 380  $\mu\text{m}$ , y del 15 % al 19 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 390  $\mu\text{m}$  a 425  $\mu\text{m}$ , y las partículas de polímero están compuestas de una mezcla del 14 % al 18 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 108  $\mu\text{m}$  a 140  $\mu\text{m}$ , del 20 % al 24 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 145  $\mu\text{m}$  a 180  $\mu\text{m}$ , del 43 % al 49 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 185  $\mu\text{m}$  a 220  $\mu\text{m}$ , y del 14 % al 18 % en peso de partículas con un tamaño de grano de 225  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ .
10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que** la proporción en peso de partículas de polímero con respecto a partículas de cloruro de sodio asciende a de 1:100 a 1:10, ventajosamente de 1:50 a 1:15 y en particular de 1:20 a 1:18.
11. Procedimiento según las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado por que** antes de la compactación se añade a la mezcla de partículas de polímero y partículas de cloruro de sodio una solución de polímero y se separa el disolvente.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado por que** el disolvente disuelve el polímero, pero no la sal.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado por que** el disolvente se selecciona entre acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, hexafluoroisopropanol, hidrocarburos clorados y fluorados, alifáticos y aromáticos, tetrahidrofurano, etilmetilcetona, dietilcetona así como mezclas de los mismos.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado por que** el polímero es poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico-ácido láctico) y el disolvente es cloroformo.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizado por que** la proporción en peso de partículas de polímero con respecto al polímero disuelto asciende a de 10:1 a 1:100, ventajosamente de 2:1 a 1:25 y en particular de 1:1 a 1:10.
16. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que** la compactación se realiza mediante acción de presión.
17. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que** para la eliminación del cloruro de sodio se deja actuar agua sobre la mezcla compactada.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, **caracterizado por que** se separa de nuevo el agua.
19. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que** la mezcla compactada se almacena en primer lugar en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  y a continuación se elimina el cloruro de sodio.
20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 19, **caracterizado por que** se compacta una mezcla de partículas de polímero, partículas de cloruro de sodio y una solución de polímero y a continuación se elimina el cloruro de sodio.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado por que** el polímero se selecciona entre polianhídridos, poli(ortoésteres), poli( $\alpha$ -hidroxiésteres), poli(esteramidas), poliamidas, poli(esteréteres), policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquilenos), poli(tereftalatos de alquilenos), poli(alcoholes vinílicos), poliviniléteres, poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidonas, polisiloxanos, poliestirenos, poliuretanos, celulosas derivatizadas, polímeros y copolímeros de ácido (met)acrílico.
22. Procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado por que** la solución contiene polímero en forma disuelta y partículas de polímero en forma sólida.

23. Procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado por que** la solución no disuelve el cloruro de sodio.
24. Implante, que comprende una matriz según una de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos una célula.
- 5 25. Implante según la reivindicación 24, que comprende una matriz a base de un polímero biológicamente compatible y células de al menos dos tipos celulares, **caracterizado por que** las células del primer tipo celular son hepatocitos y las células del segundo tipo celular son islotes de Langerhans.
- 10 26. Implante según la reivindicación 25, **caracterizado por que** la proporción de hepatocitos con respecto a islotes de Langerhans asciende a  $10^6$  : 3000.
27. Implante según la reivindicación 25, **caracterizado por que** la proporción de hepatocitos con respecto a islotes de Langerhans asciende a  $10^6$  : 3-200, ventajosamente a  $10^6$  : 10-100, en particular: 20-80 y de manera especialmente preferente a  $10^6$  : 35-45.