

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 640**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2012 PCT/US2012/035696**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2012 E 12777353 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2701517**

54 Título: **Recubrimiento conformal de células para inmunoaislamiento**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480513 P

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

16.10.2017

73 Titular/es:

**CONVERGE BIOTECH INC. (100.0%)
1400 NW 10th Avenue (D431), Suite 611A
Miami FL 33132, US**

72 Inventor/es:

**HUBBELL, JEFFREY y
TOMEI, ALICE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 640 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

Recubrimiento conformal de células para inmunoaislamiento

5 ANTECEDENTES

La encapsulación de células es una estrategia prometedora para el inmunoaislamiento de células individuales y de agrupaciones celulares, previniendo de esta manera cualquier respuesta inmune que comprometería la funcionalidad de las células durante la implantación. La bio-encapsulación se ha utilizado ampliamente en nuevos ensayos clínicos en el campo de la diabetes, la hemofilia, el cáncer y el fallo renal. Sin embargo, la mayoría de los ensayos no han tenido un éxito completo debido a una combinación de razones:

- falta de reproducibilidad en los métodos de encapsulación y aislamiento celular;
- falta de materiales de encapsulación adecuados que deberían ser biocompatibles, estables mecánica y químicamente, y presentar un tamaño de corte de poro apropiado para permitir el flujo de nutrientes y sub-productos hacia el interior y hacia el exterior de la cápsula, a la vez que protegen el biomaterial encapsulado de los efectos del sistema inmunitario;
- producción de cápsulas no uniformes o no recubiertas conformalmente (lo que afecta a la difusión de oxígeno y nutrientes a través de la cápsula y por tanto a la viabilidad de la célula encapsulada);
- imposibilidad de escalado del proceso de encapsulación desde estudios con animales pequeños a estudios pre-clínicos con primates no humanos; y
- elecciones de sitios de trasplante desfavorables.

Estos retos de la tecnología de encapsulación pueden verse en el contexto del trabajo en uno de los campos terapéuticos más prometedores para la encapsulación de células: la diabetes.

La diabetes es el resultado de la destrucción autoinmune de células pancreáticas beta, uno de los diversos tipos de células que constituyen las isletas de Langerhans. A lo largo de su vida, los pacientes de diabetes deben monitorizar y controlar frecuentemente los niveles de glucosa en sangre y administrarse insulina cuando experimentan hiperglucemia, la cual presenta muchos efectos colaterales. El alo-trasplante de isleta es una terapia muy prometedora para tratar a los pacientes de diabetes, pero requiere una vida entera de inmunosupresión sistémica para evitar el rechazo de aloinjerto.¹

Para evitar la administración de fármacos inmunosupresores a nivel sistémico, los aloinjertos de isletas pueden ser inmunoprotegidos recubriendo las células para trasplante con una cápsula polimérica que permita la difusión de oxígeno, glucosa e insulina, a la vez que evite el contacto célula-célula y la difusión de moléculas citotóxicas, que de otro modo activarían la respuesta inmune contra el injerto y finalmente su rechazo por parte del hospedante.² Las isletas presentan un tamaño no uniforme que varía entre aproximadamente 50 y 300 μm de diámetro. La mayoría de los procedimientos de recubrimiento desarrollados por otros no permiten un recubrimiento conformal de las isletas; el diámetro de cápsula generalmente es constante e independiente del tamaño de la isleta, y por tanto normalmente es superior a 300 μm para garantizar el recubrimiento de las isletas más grandes.³ Debido al exceso de material de recubrimiento libre de células, el volumen total del implante de isletas aumenta enormemente de tal modo que la única zona de injerto de tamaño apropiado es la cavidad abdominal, pobremente oxigenada, lo que contribuye a la hipoxia de las células encapsuladas. Adicionalmente, el espesor de la cápsula aumenta la barrera de difusión del oxígeno a través del recubrimiento, lo que también agrava la hipoxia celular, y retrasa la sensibilidad a glucosa y por tanto la capacidad de respuesta a la secreción de insulina⁴ (Figura 1A). La mayoría de estos métodos de encapsulación se basan en la generación de pequeñas gotas de material de recubrimiento mezcladas con las isletas mediante una bomba de chorro de aire o generadores de gotas electrostáticos.⁵

Al contrario que los métodos de encapsulación basados en la generación de gotas pequeñas, el recubrimiento conformal de agrupaciones de células de diversos diámetros ha sido objeto de algunas investigaciones recientes. La mayoría de estos métodos se basan en (a) la formación del recubrimiento capa-a-capo directamente sobre las células (por ejemplo, mediante reacción química o foto-polimerización) o (b) un procedimiento puramente hidrodinámico, que implica típicamente la formación de partículas a través de la formación de emulsiones de agua en aceite, o mediante la ruptura de un chorro de agua en agua por el principio de dinámica de fluidos de inestabilidad de Rayleigh-Plateau.^{3,10,12}

Usando estos métodos, es posible generar partículas de agua con un diámetro constante dependiente únicamente de las características del agua y de la fase oleaginoso, la tensión superficial entre las dos fases y la proporción de los parámetros hidrodinámicos de las dos fases.^{6,7,8,9} En las industrias alimentaria y farmacéutica, estos métodos han sido explotados de manera extendida para nano-encapsular fármacos y otras sustancias solubles en agua⁸ y tan solo recientemente se han extendido a la encapsulación de células individuales y agrupaciones celulares a escala de micrómetros, habiéndose publicado algunos éxitos, tal como se describe a continuación.

Chabert M. y colaboradores desarrollaron un sistema microfluídico de alta capacidad para encapsular y auto-clasificar células individuales en base al principio descrito antes.¹⁰ Sin embargo, su sistema está diseñado para la

encapsulación y clasificación de células individuales (con un diámetro de 40 μm o inferior), y no puede aplicarse a agrupaciones de células debido a las dimensiones micrométricas de su dispositivo, que sometería a las células no individuales a tensiones de cizalla no admisibles.

5 Garfinkel M.R. y colaboradores desarrollaron otro método para encapsular isletas retirando de forma selectiva la fase acuosa de isleta de una fase oleaginosa externa para crear un recubrimiento delgado sobre las agrupaciones de células. En este método, la penetración de la fase acuosa en la fase aceite se logra por succión de la capa de fase acuosa situada en la parte superior de la fase aceite. En este diseño se crea un flujo turbulento en la zona de extracción de agua, que finalmente conduce a un recubrimiento incompleto que requiere una segunda ronda de
10 encapsulación, aumentando la cantidad de estrés a la que se someten las células y reduciendo el rendimiento del proceso.¹¹ Adicionalmente, la polimerización del gel se logra a través de una foto-polimerización, que puede comprometer la función a largo plazo de las células recubiertas.

15 Hubbell J.A. y colaboradores desarrollaron una estrategia de recubrimiento mediante una reacción química directamente sobre la superficie celular, mediante la cual se adsorbe un fotosensibilizador a la superficie de las isletas, y las isletas tratadas con fotosensibilizador fueron suspendidas en una disolución acuosa de un macrómero fotopolimerizable (Patente de Estados Unidos 6.911.227). La fotoiluminación de la suspensión de isletas condujo a la polimerización y el reticulamiento del macrómero para crear un gel polimérico conformal ligado a la superficie de las isletas.

20 En vista de lo anterior, sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos eficientes de alto rendimiento para recubrir células y agrupamientos celulares conformalmente sin comprometer la funcionalidad celular.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

25 La presente invención se refiere a un método para recubrir conformalmente células y agrupaciones de células con hidrogeles que son biocompatibles, mecánica y químicamente estables y porosos, con un tamaño de poro de corte apropiado. De forma ventajosa, los métodos de la invención son reproducibles y dan como resultado un rendimiento elevado de grupos de células recubiertos frente a grupos de células no recubiertos, sin comprometer la funcionalidad celular. La invención proporciona además dispositivos de recubrimiento conformal configurados para llevar a cabo
30 los métodos de la invención, métodos para utilizar de forma óptima dichos dispositivos y para purificar las isletas recubiertas, y los biomateriales recubiertos preparados mediante dichos métodos.

35 Otras ventajas de la presente invención incluyen (1) reducción general del volumen de injerto de biomaterial encapsulado, (2) barreras de difusión mínimas para el oxígeno y los nutrientes a través de las cápsulas, (3) retraso mínimo de la respuesta de insulina tras exposición a glucosa, (4) daño mínimo a la superficie de la célula/grupo de células, permitiendo una renovación y reorganización celular, y (5) facilidad de escalado desde escala de laboratorio a escala clínica.

40 Para alcanzar éstos y otros efectos, hemos seguido el principio puramente hidrodinámico de Chabert et al., tal como se ha descrito anteriormente. Específicamente, en ausencia de células, se inyecta coaxialmente una fase acuosa en una fase oleaginosa externa y se hace fluir a través de una región de enfoque de tal modo que la fase interna acuosa puede experimentar una transición desde goteo a chorro dentro de la fase oleaginosa y el chorro de agua es estirado. La cámara de flujo que contiene las dos fases tiene una geometría de enfoque especial que permite la formación y la aceleración del chorro (elongación) en un chorro líquido de tamaño micrométrico. Las dimensiones del
45 chorro dependen de las características de las dos fases y de sus parámetros fluidodinámicos. La tensión superficial entre la fase acuosa y la fase oleaginosa activa entonces una inestabilidad de Rayleigh-Plateau entre las dos fases que finalmente hace que el chorro de agua se rompa en gotitas de microlitros con un tamaño constante que depende de (a) la geometría del dispositivo, (b) la proporción entre los caudales de agua y aceite, (c) la proporción entre las viscosidades de agua y aceite, y (d) la tensión superficial entre las dos fases.

50 Cuando se añaden agrupaciones de células a la fase acuosa interior, éstas fluyen coaxialmente dentro del chorro de agua (la fase acuosa fluye alrededor de la agrupación ya que el sistema es simétrico axialmente). En las regiones de enfoque, el componente de elongación del flujo permite una separación fácil de las agrupaciones de células. Una vez que el chorro se rompe, las agrupaciones de células son recubiertas con una delgada capa de agua que es
55 proporcional al tamaño del chorro. De esta manera, las cápsulas que contienen agrupaciones celulares presentan un diámetro que es proporcional al tamaño de la agrupación y el espesor de la cápsula solo depende de las condiciones fluidodinámicas externas.

60 Puesto que el diámetro de la agrupación es mayor que el diámetro del chorro y el caudal de agua es constante, incluso si la densidad celular de la fase acuosa es elevada, las agrupaciones son separadas unas de otras por la componente de elongación del flujo en la región de enfoque, lo que permite que las agrupaciones se alineen individualmente en el centro del chorro antes de la encapsulación. Esto permite la encapsulación de agrupaciones celulares individuales dentro de gotas individuales independientemente de la densidad de agrupaciones.

Existen varios parámetros que es necesario controlar en este método para alcanzar un recubrimiento conformal de los biomateriales, tal como agrupaciones de células, con un espesor preciso del recubrimiento: (1) transición del goteo de agua a chorro, (2) rotura del chorro en gotitas de microlitros (para la fase acuosa libre de agrupaciones celulares) y en gotitas que contienen agrupaciones celulares individuales (para las agrupaciones celulares en fase acuosa), (3) polimerización interna del material de recubrimiento tras la rotura del chorro y antes de la purificación, y (4) purificación eficiente de las agrupaciones celulares recubiertas a partir de la fase oleaginosa y del material de recubrimiento libre de biomaterial.

Cada uno de estos puntos ha sido abordado usando modelos computacionales y mediante optimización experimental, tal como se describe más detalladamente a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: A. Esquema que muestra los resultados del recubrimiento conformal mediante los métodos de la invención (izquierda) frente a la encapsulación mediante métodos previos (derecha). Los métodos de la invención permiten el recubrimiento de células y agrupaciones celulares de tal modo que el tamaño de la cápsula es proporcional al tamaño de las células/agrupaciones celulares encapsuladas. B. Esquema que muestra el procedimiento de recubrimiento conformal, en el que la fase acuosa que contiene la disolución de recubrimiento y las agrupaciones celulares es inyectada coaxialmente en una fase oleaginosa externa y se hace fluir a través de una región de enfoque de tal modo que la fase acuosa interna puede experimentar una transición desde goteo a formación de chorro dentro de la fase oleaginosa y el chorro de agua es elongado. La tensión superficial entre la fase acuosa y la fase aceite activa entonces una inestabilidad de Rayleigh-Plateau entre las dos fases que finalmente hace que el chorro se rompa en gotitas de microlitros de tamaño constante, lo que da como resultado el recubrimiento de las agrupaciones celulares con cápsulas que tienen un diámetro proporcional al tamaño de la agrupación. C. Modelo computacional que muestra una geometría 2D axisimétrica usada con: "más enfoque" (parte superior izquierda), "menos enfoque" (parte superior central), y diferentes puntos de inyección de agua (parte superior derecha). La malla ha sido creada imponiendo un tamaño máximo del elemento en el eje central ($r=0$) igual a 10^{-5} m (parte inferior).

FIGURAS 2-11: Modelos computacionales con los parámetros especificados en la Tabla 1.

Los resultados de cada simulación son: gráfico de superficie de la distribución de fase acuosa dentro de la fase aceite para el último punto temporal (A); gráfico de superficie de los perfiles de velocidad para el último punto temporal (B); y gráfico de frontera (eje-z, a $r=0$) del esfuerzo total en la dirección r (T_r , C izquierda) y del esfuerzo total en la dirección z (T_z , C derecha) frente a la posición a lo largo del eje z.

- FIGURA 2: Modelo 1.
- FIGURA 3: Modelo 2.
- FIGURA 4: Modelo 3.
- FIGURA 5: Modelo 4.
- FIGURA 6: Modelo 5.
- FIGURA 7: Modelo 6.
- FIGURA 8: Modelo 7.
- FIGURA 9: Modelo 8.
- FIGURA 10: Modelo 9.
- FIGURA 11: Modelo 10.

FIGURA 12: diseño de la cámara de flujo que se caracteriza por una cámara con una región de enfoque de flujo (estrechamiento 10 a 1), un sistema de inyector coaxial y un canal de salida de flujo coaxial estrecho. A. Ensamblaje de las diferentes partes y tabla con la descripción de cada parte. B. Vista de sección plana frontal.

FIGURA 13: Esquema que muestra la funcionalización de PEG con dVS (superior al 90%) mediante adición de tipo Michael de dVS en presencia de NaH.

FIGURA 14: Izquierda: esquema que muestra el marcaje de PEG-dVS con fluoresceinamina mediante adición de tipo Michael en un tampón de carbonato sódico (1bis). Derecha: imagen de microscopio fluorescente de cápsulas de gel FITC-PEG.

FIGURA 15: imágenes confocales de partículas recubiertas con FITC-PEG. Izquierda: proyección ortogonal de un escaneo-z de la partícula recubierta completa. Derecha: reconstrucción 3D de la serie de escaneos-z, seccionada en el plano medio.

FIGURA 16: imágenes de microscopio de fluorescencia de la morfología de partículas recubiertas, que muestran diferentes resultados obtenidos variando las condiciones experimentales. Se ha añadido FITC-

PEG-dVS a la fase acuosa en una concentración del 1% para marcar fluorescentemente el recubrimiento. A. Proporción baja de partículas recubiertas frente a partículas poliméricas vacías y partículas secundarias grandes. B. Proporción baja de partículas recubiertas frente a partículas poliméricas vacías pero partículas secundarias más pequeñas. C. Proporción más alta de partículas recubiertas frente a partículas poliméricas vacías y partículas secundarias más pequeñas pero baja eficiencia de encapsulación. D-F. Proporción elevada de partículas recubiertas frente a partículas poliméricas vacías, partículas secundarias pequeñas y elevada eficiencia de encapsulación (protocolo optimizado).

FIGURA 17: permeabilidad y permselectividad de los hidrogeles para recubrimiento conformal. A. Permeabilidad de diferentes hidrogeles basados en ALGINATO y PEG a 10 kDa FITC dextrano según el desarrollo de c/c_{inf} con el tiempo. B. Permselectividad de PEG ALG DTT a FITC dextrano de diferente peso molecular según el desarrollo de c/c_{inf} con el tiempo.

FIGURA 18: Biocompatibilidad de diferentes hidrogeles basados en ALGINATO y PEG en la zona subcutánea y bajo la cápsula renal en el día 7.

FIGURA 19: recubrimiento conformal de isletas de Langerhans de rata. A. Microscopía de contraste de fase de isletas recubiertas. B. Imágenes confocales de recubrimientos de PEG marcados con FITC. C. Imágenes confocales de FITC dextrano de 2000 kDa atrapado en recubrimientos de PEG. Azul: contra-tinción nuclear. Barras de escala: 100 μ m.

FIGURA 20: respuesta funcional (liberación de insulina tras estimulación de glucosa) de isletas de rata encapsuladas con diferentes composiciones de hidrogel. A. PEG-dVS 8-brazos 10 kDa reticulado con DTT: isletas recubiertas conformalmente a diferentes porcentajes de PEG y MVG alginato (ALG) frente a isletas dentro de masas y varillas de PEG. B. Isletas recubiertas conformalmente con PEG-dVS 8-brazos 10 kDa reticulado con DTT frente a HS-PEG-SH multi-brazo frente a adición de MVG alginato (ALG). Bajo1: 60 mg/dL de glucosa, Alto: 300 mg/dL, Bajo2: 60 mg/dL.

FIGURA 21: Efecto del tiempo entre aislamiento / encapsulación / evaluación funcional de la viabilidad de isleta y de la respuesta funcional (liberación de insulina tras estimulación de glucosa) de isletas de rata encapsuladas con un 5% de PEG-dVS 8-brazos 10 kDa 0,8% de MVG reticulado con DTT (PEG ALG). A. Tinción viva (verde) / muerta (rojo) de isletas de rata encapsuladas con PEG ALG dos días después del aislamiento y con imágenes obtenidas justo después de la encapsulación (izquierda), 24 horas después de la encapsulación (centro) o 48 horas después de la encapsulación (derecha). B. Respuesta funcional de isletas desnudas 2, 3 ó 4 días tras el aislamiento. C. Respuesta funcional de isletas encapsuladas con PEG ALG un día después del aislamiento y evaluadas 24 y 48 horas después de la encapsulación. D. Respuesta funcional de isletas encapsuladas con PEG ALG dos días después del aislamiento y evaluadas 24 y 48 horas después de la encapsulación. L1: 60 mg/dL de glucosa, H: 300 mg/dL, L2: 60 mg/dL.

FIGURA 22: Función *in vivo* de isletas de ratón (C57BL/6) recubiertas conformalmente con PEG ALG y trasplantadas bajo la cápsula renal de ratones singénicos diabéticos inducidos químicamente, expresada como glucosa en sangre de ratones receptores con el tiempo. Se llevó a cabo una nefrectomía para confirmar que la normoglucemia se debía a la función de isletas recubiertas.

FIGURA 23: Evaluación histológica (H&E, izquierda) e inmunohistológica (insulina: derecha) a tiempo de rechazo de controles desnudos (parte superior, día 11) e isletas recubiertas conformalmente (parte inferior, día 5%) trasplantadas bajo la cápsula renal de receptores xenogénicos concordantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a los métodos y a los medios para inmuoaislar biomateriales, por ejemplo, células y agrupaciones celulares, para prevenir el rechazo inmune, inflamación y/o destrucción autoinmune, a la vez que se preserva la funcionalidad celular cuando los biomateriales son implantados en un sujeto.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para recubrir conformalmente un biomaterial con un material de recubrimiento, que comprende las etapas de:

- a) inyectar una fase acuosa dentro de una fase oleaginosa coaxial en un dispositivo de recubrimiento que permite la transición desde goteo a formación de chorro y la elongación del flujo de la fase acuosa dentro de la fase oleaginosa;
- b) añadir el biomaterial y el material de recubrimiento a la fase acuosa, en donde se produce la polimerización del material de recubrimiento aguas abajo de la rotura del chorro de fase acuosa para formar partículas, dando como resultado el recubrimiento conformal del biomaterial con el material de recubrimiento; y
- c) recolectar el flujo de salida del dispositivo de recubrimiento; y opcionalmente, que comprende la etapa o etapas de:

d) purificar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial de la fase oleaginoso; y

5 e) separar el biomaterial recubierto conformalmente del material de recubrimiento libre de biomaterial; en donde el biomaterial comprende células o agrupaciones celulares. Véase, por ejemplo, la Figura 1B.

10 Los métodos de la invención pueden usarse para encapsular cualquier material que pueda beneficiarse de un inmunoaislamiento cuando se implanta en un sujeto. El material puede ser no uniforme. En una realización, el material que puede beneficiarse del inmunoaislamiento es un biomaterial. En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden usarse para encapsular una o más células, agrupaciones de células, orgánulos subcelulares, sustancias biológicas tal como proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos, y no biológicas (por ejemplo, moléculas pequeñas) tal como fármacos. En algunas realizaciones, los métodos de la invención se usan para encapsular células y/o agrupaciones celulares. En una realización particular, los métodos de la invención se usan para encapsular células de isleta pancreáticas y agrupaciones celulares.

15 En determinadas realizaciones, las células y agrupaciones celulares recubiertas conformalmente pueden comprender una o más isletas pancreáticas autólogas, heterólogas, singénicas, alogénicas o xenogénicas (por ejemplo, células de Sertoli, células mesenquimales y derivadas de médula ósea, células progenitoras endoteliales, células madre, células T reguladoras T_{reg}, etc., referidas todas ellas de forma general como "células colaboradoras" de implante) que proporcionan factores de crecimiento y/u otros agentes beneficiosos para el establecimiento, el mantenimiento o la expansión de las células recubiertas conformalmente, o para ayudar a las células recubiertas conformalmente a proporcionar su efecto terapéutico cuando son implantadas en un hospedante. En una realización, las células colaboradoras son células madre mesenquimales.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "hospedante" se refiere al receptor del biomaterial implantado e incluye a todos los animales. En una realización, el hospedante es un mamífero. En un ejemplo de realización, el hospedante es humano.

25 Los métodos de la invención pueden usarse de forma ventajosa para el recubrimiento conformal en sistemas de modelo de terapia celular. Las células recubiertas conformalmente pueden proporcionar un beneficio terapéutico, por ejemplo, expresando un factor terapéutico *in vivo* tras el implante. Los ejemplos de dichas células incluyen, aunque sin limitación, células que producen: insulina para tratar la diabetes; dopamina para tratar la enfermedad de Parkinson (Minquez-Castellanos et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatri*, *in press* (2007)); hormona de crecimiento para tratar el enanismo (Chang et al., *Trends Biotechnol* 17: 78-83 (1999)); factor VIII y factor IX (Chang et al., *Trends Biotechnol* 17, 78-83 (1999)) para tratar la hemofilia; y eritropoyetina para tratar la anemia (Rinsch et al., *Kidney Intern* 62: 1395-1401 (2002)). Se pueden imaginar muchos más factores beneficiosos producidos por células o actividades celulares/tisulares. En algunas realizaciones, las células recubiertas conformalmente pueden expresar y/o proporcionar más de un factor terapéutico, o pueden comprender dos o más tipos de células que proporcionan uno o más factores terapéuticos. En algunas realizaciones, las células recubiertas conformalmente también, o

30
35
40

alternativamente, expresan y/o proporcionan un antagonista, agonista, análogo, derivado, quimera, fusión o fragmento de un factor terapéutico para proporcionar un efecto terapéutico cuando se implantan en un hospedante.

45 En algunas realizaciones, al menos parte de las células recubiertas conformalmente también, o alternativamente, proporcionan un efecto terapéutico sin secretar un factor difusible. En determinadas realizaciones, las células recubiertas conformalmente proporcionan una actividad enzimática que, por ejemplo, convierte un sustrato en un producto que tiene un efecto beneficioso, y/o metaboliza, secuestra o absorbe una sustancia perjudicial. En determinadas realizaciones, las células recubiertas conformalmente proporcionan un efecto terapéutico a través de un factor ligado a material biológico, tal como un factor ligado a superficie celular.

50 En algunas realizaciones, las células recubiertas conformalmente proporcionan de forma natural un efecto terapéutico, sin modificaciones genéticas, tras ser implantadas en un hospedante. En algunas realizaciones, las células recubiertas conformalmente son modificadas genéticamente para proporcionar un efecto terapéutico. Como ejemplos no limitativos, las células pueden ser transfectadas con vectores de expresión, o transducidas con vectores lentivíricos, que hacen que las células sean capaces de expresar uno o más factores celulares terapéuticos y/o colaboradores. En otra realización, las células pueden comprender, constar de, o consistir esencialmente en células transfectadas con vectores de expresión que hacen que las células sean capaces de expresar uno o más factores celulares terapéuticos y/o colaboradores. Dicha expresión puede producirse de una forma constitutiva o regulada, por ejemplo, en respuesta a moduladores biológicos del torrente sanguíneo o a tejidos a los que se exponen las células.

55
60

En algunas realizaciones, las células para recubrimiento conformal son derivadas de tejido muerto o de tejido vivo. En algunas realizaciones, las células son de origen no mamífero o de origen mamífero, de origen no humano o de origen humano, propias o ajenas. Las células pueden ser pluripotentes, multipotentes, totipotentes o células madre embrionarias o adultas diferenciadas; células primarias diferenciadas; o células inmortalizadas, entre otros tipos de células. En determinadas realizaciones, las células madre comprenden, por ejemplo, células derivadas de sangre de

65

cordón umbilical, de fluido amniótico, de sangre menstrual, placenta, gelatina de Wharton, citotropoblastos, y similares. Las células también pueden comprender cualquier combinación de los tipos celulares enumerados.

Los ejemplos de factores terapéuticos que pueden ser proporcionados por las células recubiertas conformalmente incluyen, aunque sin limitación, uno o más de: insulina, glucagón, eritropoyetina; Factor VIII; Factor IX; hemoglobina; albúmina; neurotransmisores tales como dopamina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), ácido glutámico, serotonina, norepinefrina, epinefrina y acetilcolina; factores de crecimiento tales como factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF), factor de diferenciación colinérgica/factor inhibidor de leucemia (CDF/LIF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); inhibidores del dolor tales como Sustancia P, catecolaminas, dinorfinas, endorfinas o encefalinas; hormonas tales como la hormona paratiroidea o la hormona del crecimiento; inmunomoduladores tales como el factor estimulador de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF); neuromoduladores; linfocinas; citocinas; cofactores; anticuerpos; aptámeros y enzimas. La elección de uno o más factores terapéuticos y las concentraciones a las que se producen y se liberan desde las células vienen dictadas por las necesidades del paciente en tratamiento, y se pueden determinar fácilmente de forma empírica por el especialista en la técnica.

En algunas realizaciones, las células recubiertas conformalmente producen un factor terapéutico que tiene actividad de tipo insulina o reguladora de insulina. En determinadas realizaciones, el factor terapéutico es insulina. En determinadas realizaciones, el factor terapéutico es una forma precursora de la insulina, tal como preproinsulina o proinsulina. En determinadas realizaciones, el factor terapéutico es una proteína quimérica de insulina o una proteína de fusión de insulina.

En algunas realizaciones, el efecto terapéutico proporcionado por las células recubiertas conformalmente comprende la regulación de los niveles de insulina en sangre. En determinadas realizaciones, el efecto terapéutico comprende la regulación de los niveles de glucosa en sangre. En otras realizaciones, el efecto terapéutico comprende la regulación de los niveles de uno o más reguladores de respuesta biológica adicionales en la sangre del paciente.

En algunas realizaciones, el(los) factor(es) terapéutico(s) se libera(n) de las células recubiertas conformalmente debido a la recepción de un estímulo o señal. Para células implantadas, el estímulo o señal pueden recibirse desde el hospedante (por ejemplo, cambios en los niveles en sangre de glucosa, hormonas, agentes de señalización metabólica, moléculas de señalización química, etc.).

En algunas realizaciones, las células y/o las agrupaciones de células de la invención generalmente presentan un tamaño uniforme. En otras realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares de la invención no presentan un tamaño uniforme. En determinadas realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares varían entre 10 μm y 10000 μm de diámetro; entre 25 μm y 500 μm de diámetro; o entre 40 μm y 400 μm de diámetro. En una realización particular, las células y/o agrupaciones celulares varían entre 50 y 300 μm de diámetro. En algunas realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares que varían entre 50 y 300 μm de diámetro comprenden células de isleta.

El material de recubrimiento usado en los métodos de recubrimiento conformal de la invención es biocompatible y es estable mecánica y químicamente. Adicionalmente, los materiales preferidos para el recubrimiento conformal no interfieren, o no interfieren sustancialmente, con la función del biomaterial encapsulado, y reducen, minimizan o eliminan una respuesta inmune cuando el biomaterial encapsulado es implantado en un hospedante. En determinadas realizaciones, el material de recubrimiento puede ser polimerizado mediante gelación interna. En determinadas realizaciones, el material usado en los métodos de recubrimiento conformal de la invención es biodegradable.

En algunas realizaciones, el material de recubrimiento comprende uno o más de polietileno glicol (PEG), óxido de polietileno (PEO), poli(N-vinil pirrolidina) (PVP), polietil oxazolona, polivinil alcohol (PVA), politoloxazolona (PEOX), poli(aminoácidos) y Biodritin®; polisacáridos tales como alginato, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dextrano, sulfato de dextrano, heparina, sulfato de heparina, sulfato de heparano, quitosán, goma gellan, goma xantana, goma guar, derivados de celulosa solubles en agua y carragenano; y proteínas tales como gelatina, colágeno y albúmina. En determinadas realizaciones, el material de recubrimiento es polietileno glicol (PEG).

En determinadas realizaciones, el material de recubrimiento es de mono-brazo. En determinadas realizaciones, el material de recubrimiento es multi-brazo.

En algunas realizaciones, el recubrimiento conformal tiene características de permeabilidad que permiten el intercambio de nutrientes y subproductos celulares, y la liberación de factores terapéuticos, pero también pueden evitar que entren en las cápsulas moléculas efectoras inmunes del hospedante y/u otros elementos no deseados. En determinadas realizaciones, el recubrimiento conformal comprende poros con un tamaño de corte de 100, 110, 120, 130, 140, 145, 150, 155, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 ó 250 kDa. En determinadas realizaciones, el

recubrimiento conformal comprende poros con un tamaño de corte de 150 kDa. En determinadas realizaciones, el recubrimiento conformal comprende poros con un tamaño de corte de 150 kDa. En determinadas realizaciones, el recubrimiento conformal comprende poros con un tamaño de corte de hasta 500 kDa.

5 El espesor del recubrimiento conformal no depende del tamaño/diámetro del material recubierto. En algunas realizaciones, el espesor del recubrimiento oscila entre 1 μm y 100 μm , entre 5 μm y 50 μm , o entre 8 μm y 25 μm . En algunas realizaciones, el espesor del recubrimiento oscila entre 25-50 μm . En algunas realizaciones, el espesor del recubrimiento oscila entre 10-20 μm .

10 En algunas realizaciones, el recubrimiento se visualiza marcando el recubrimiento de material con un marcador detectable. El marcador puede ser, por ejemplo, una marca fluorescente, enzimática, quimioluminiscente o epitópica. En determinadas realizaciones, el recubrimiento se puede visualizar mediante el atrapamiento de FITC dextrano de elevado peso molecular dentro del material de recubrimiento. En una realización particular, el material de recubrimiento marcado es PEG-dVS-FITC.

15 En algunas realizaciones, el material de recubrimiento puede ser alterado químicamente para contener grupos funcionales. En algunas realizaciones, los grupos funcionales ayudan a estabilizar el recubrimiento. Adicionalmente, el material de recubrimiento puede comprender factores terapéuticos u otras moléculas que se asocian con dichos factores terapéuticos, tales como receptores o agentes de afinidad (véase, por ejemplo, Kim et al., *Biomacromolecules* 4(5): 1214-1223 (2003)). Los factores terapéuticos pueden incorporarse en el material de recubrimiento mediante reticulación covalente, emulsión, interacciones iónicas, interacciones de afinidad específica, atrapamiento simple, o cualquier combinación de los mismos.

20 En una realización, el recubrimiento de material comprende moléculas anti-inflamatorias para reducir la respuesta inflamatoria del hospedante tras implante de las células recubiertas conformalmente. Los ejemplos de agentes anti-inflamatorios incluyen corticosteroides (dexametasona, cortisol, prednisolona, loteprednol etabonato, flucinolona acetónide, y otros), interleucina-1 (IL-1), interleucina-10 (IL-10), alfa 1-antitripsina (AAT), lisofilina, pentoxifilina, inhibidores de COX-2, péptido antagonista de receptor de interleucina-1 (IRAP), interleucina-10 (IL-10), alfa 1-antitripsina (AAT), TGF-beta; anticuerpos de IL-1, interferón-gamma, y TNF-alfa; factor anti-tejido, e inhibidores de complemento. En algunas realizaciones, el material de recubrimiento comprende moléculas de matriz extracelular (ECM) tales como colágeno de tipo I o IV, laminina, fibronectina, o péptidos arginina-glicina-aspartato (Beck et al., *Tissue Eng* 13(3): 1-11 (2007)). En algunas realizaciones, las moléculas anti-inflamatorias y/o ECM son ancladas a la superficie del material de recubrimiento. En determinadas realizaciones, las moléculas son recubiertas o encapsuladas para una liberación lenta.

35 El recubrimiento conformal del biomaterial se produce en un dispositivo de recubrimiento. Tal como se usa en la presente memoria, el término "dispositivo de recubrimiento" se refiere a cualquier dispositivo que es capaz de recubrir conformalmente un biomaterial. En algunas realizaciones, el dispositivo de recubrimiento es un dispositivo que permite una transición de un goteo a formación de chorro y elongación de una fase acuosa dentro de una fase no miscible (por ejemplo, oleaginosa), en donde la fase acuosa es sometida a una rotura de chorro en partículas. En algunas realizaciones, el dispositivo de recubrimiento es una cámara de flujo que comprende una o más entradas de fase aceite, una o más entradas de fase acuosa (que pueden ser las mismas o diferentes de las de fase aceite), y una o más regiones de enfoque del flujo aguas debajo de las entradas, donde los chorros co-fluyentes de la fase oleaginosa enfocan a la fase acuosa. La cámara de flujo puede comprender además uno o más canales aguas debajo de la(s) región(es) de enfoque de flujo. El diámetro de el(los) canal(es) de fase acuosa puede ser, por ejemplo, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 ó 4 mm de diámetro. El diámetro de el(los) canal(es) de fase oleaginosa puede ser, por ejemplo, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5 ó 20 mm de diámetro. En determinadas realizaciones, el diámetro de el(los) canal(es) de fase oleaginosa puede ser de hasta 100 mm. La longitud de el(los) canal(es) puede ser, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 mm. Los canales pueden conducir a una o más salidas de la cámara de flujo. Véase, por ejemplo, la Figura 12 para ejemplos de detalles de diseño y fabricación de la cámara de flujo.

55 En algunas realizaciones, el dispositivo proporciona un flujo enfocado desde un canal de 10d hasta un canal de d (restricción 1/10 del diámetro para permitir una transición de goteo a formación de chorro). En determinadas realizaciones, d oscila entre 0,5-10 mm. En determinadas realizaciones, d oscila entre 1-4 mm. En una realización particular, d es alrededor de 1 mm. En algunas realizaciones, el ángulo de enfoque del dispositivo oscila entre 100 y 5 grados (de mayor a menor enfoque). En determinadas realizaciones, el ángulo de enfoque oscila entre 90 y 10 grados. En determinadas realizaciones, el ángulo de enfoque es superior a 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 ó 90 grados. En determinadas realizaciones, el ángulo de enfoque del dispositivo es de aproximadamente 60 grados. En algunas realizaciones, la región de enfoque de flujo tiene una longitud de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ó 150. En determinadas realizaciones, la región de enfoque de flujo tiene una longitud de 100 mm.

65 En algunas realizaciones, el diámetro de la cámara (cilindro) de fase aceite externa es de 1-20 mm. En algunas realizaciones, el diámetro de la cámara de fase aceite externa es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 mm. En una

- 5 realización particular, el diámetro de la cámara de fase aceite externa es de 10 mm. En algunas realizaciones, la cámara de fase aceite externa se alimenta a través de un puerto lateral situado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 mm aguas arriba (en distancia axial del cilindro) del puerto de inyección coaxial de la fase acuosa. En determinadas realizaciones, el puerto lateral está situado 5 mm aguas arriba del puerto de inyección de la fase acuosa. En determinadas realizaciones, la cámara de fase aceite externa se alimenta a través de más de un puerto lateral situado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 mm aguas arriba (en distancia axial del cilindro) del puerto de inyección coaxial de la fase acuosa.
- 10 En algunas realizaciones, la punta de la aguja de inyección de agua se co-localiza con la base de la región de enfoque del dispositivo. En algunas realizaciones, la punta de la aguja de inyección de agua está posicionada aproximadamente 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4 ó 5 mm aguas arriba o aguas abajo (en distancia axial de cilindro) de la base de la región de enfoque del dispositivo. En una realización particular, la punta de la aguja de inyección está posicionada aproximadamente 0,5 mm aguas arriba de la región de enfoque.
- 15 En una realización particular, el dispositivo se caracteriza por una cámara de fase aceite externa con un diámetro de 10 mm, alimentada a través de un puerto lateral situado 5 mm aguas arriba del puerto de inyección coaxial de la fase acuosa, que está 0,5 mm aguas arriba de la región de enfoque del flujo, y el enfoque del flujo se produce en un canal que constriñe el diámetro de 10 mm a 1 mm y que tiene una longitud de 100 mm, con un ángulo de enfoque de 60 grados.
- 20 En algunas realizaciones, el dispositivo es capaz de recubrir células y/o agrupaciones celulares con un diámetro mayor de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ó 1000 μm . En determinadas realizaciones, el dispositivo es capaz de recubrir células y/o agrupaciones celulares con un diámetro superior a 40 μm . En algunas realizaciones, el dispositivo es capaz de recubrir células y/o agrupaciones celulares de hasta 1000 μm de diámetro.
- 25 En algunas realizaciones, el flujo de fase acuosa, el flujo de fase oleaginoso, o ambos, se mantienen mediante una bomba peristáltica. En algunas realizaciones, el flujo de fase acuosa, el flujo de fase oleaginoso, o ambos, se mantienen mediante una bomba de jeringa. En una realización, el flujo de fase acuosa se mantiene mediante una bomba de jeringa y el flujo de fase oleaginoso se mantiene mediante una bomba peristáltica.
- 30 En algunas realizaciones, los métodos de recubrimiento conformal de la invención no implican: (1) la generación de gotitas del material de recubrimiento mezcladas con isletas mediante una bomba de chorro de aire o mediante generadores de gotas electrostáticos; (2) la formación del recubrimiento capa a capa directamente sobre las células; (3) el recubrimiento mediante una reacción química directamente sobre la superficie celular; y/o (3) fotopolimerización.
- 35 En algunas realizaciones, la concentración de células/agrupaciones de células de la fase acuosa puede oscilar entre 100-1.000.000 células/mL, 500-750.000 células/mL, 1.000-500.000 células/mL ó 2.500-250.000 células/mL. En determinadas realizaciones, la concentración de células/agrupaciones celulares añadidas a la fase acuosa oscila entre 5.000 y 100.000 células/mL. En una realización particular, las 5.000 a 200.000 células/mL añadidas a la fase acuosa son células de isleta pancreática, que pueden estar enriquecidas opcionalmente en células o agrupaciones de células beta secretoras de insulina.
- 40 La fase acuosa puede comprender un tensioactivo. En algunas realizaciones, el tensioactivo comprende uno o más de, por ejemplo, co-polímeros de bloque Pluronic (F-68 y/o F-127) y PEG-PPS. En una realización, el tensioactivo es Pluronic F-68. En algunas realizaciones, la concentración de tensioactivo en la fase acuosa oscila entre 0-10%, 0-8%, 0-6%, 0-5%, 0-4%, 0-3%, 0-2,5%, 0-1,5% ó 0-1%. En determinadas realizaciones, la concentración de tensioactivo es del 2%. En otra realización, la concentración de tensioactivo es del 1%.
- 45 La fase acuosa puede comprender un agente para recubrir la superficie de la isleta y prevenir la aglomeración. En algunas realizaciones, el agente comprende alginato de grupos-G de viscosidad media (MVG). En determinadas realizaciones, el agente comprende alginato sódico con un 60% de guluronato (G) y una viscosidad de 200000 – 300000 g/mol (PRONOVA UP MVG, Producto nº 4200106, NovaMatrix, Sandvika, Noruega). En otras realizaciones, el agente comprende adicional o alternativamente un compuesto cargado sintético o natural polimérico (por ejemplo, ácido poliacrílico) o no polimérico (por ejemplo, heparina).
- 50 En algunas realizaciones, el pH de la fase acuosa es 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,5 u 8. En realizaciones particulares, el pH de la fase acuosa es 4,5, 5,5, 6,5 ó 7. En una realización, el pH de la fase acuosa es 6-7.
- 55 En determinadas realizaciones, la fase acuosa comprende células/agrupaciones celulares en el medio, tensioactivo, y uno o más reactivos tiolantes o reductores (que pueden ser, por ejemplo, agentes mono- o multi-funcionales que son lineales o multi-brazo). En algunas realizaciones, las células/agrupaciones celulares comprenden isletas celulares, el medio está libre de suero o es una Disolución Salina Equilibrada de Hank (HBSS), el tensioactivo es
- 60
- 65

Pluronic-F68, y/o el agente tiolante o reductor es DTT. En algunas realizaciones, la fase acuosa comprende 5-10% de PEG (por ejemplo, 5% o 10% de PEG), 0-0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media (por ejemplo, 0, 0,4% o 0,8% de MVG), 0-2% de Pluronic-F68 (por ejemplo, 0%, 1% o 2% de Pluronic-F68), 50.000-100.000 células de isleta/mL (por ejemplo, 50.000 ó 75.000 células de isleta/mL y 0,31-0,62% p/v de DTT (por ejemplo, 0,31% o 0,62% p/v de DTT) en medio libre de suero o HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 4,5-7,4 (por ejemplo, pH 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7 ó 7,4); y la fase oleaginoso comprende 0-0,2% de trietanolamina (por ejemplo, 0%, 0,02% o 0,2% de trietanolamina). Los métodos de recubrimiento conformal de la invención abarcan cualquier combinación de dichos valores. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la fase acuosa comprende 5-10% de PEG, 2% de Pluronic-F68, 75.000 células de isleta/mL y 0,31-0,62% p/v de DTT en medio libre de suero a pH 6,5. En otras realizaciones, la fase acuosa comprende 5-10% de PEG, 75.000 células de isleta/mL y 0,31-0,62% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 4,5 ó 5. En otras realizaciones, la fase acuosa comprende un 5% o un 10% de PEG, 0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media, 3% de Pluronic-F68, 50.000 células de isleta/mL y 0,31 ó 0,62% p/v de DTT en HBSS libre de calcio y magnesio a pH 7. En otras realizaciones, la fase acuosa comprende un 5% o un 10% de PEG, un 0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media, 75.000 células de isleta/mL, y 0,31 ó 0,62% p/v de DTT en HBSS libre de calcio y magnesio a pH 6. En una realización, la invención proporciona un método en donde la fase acuosa comprende un 10% de PEG, 2% de Pluronic-F68, 75.000 células de isleta/mL y 0,62% p/v de DTT en medio libre de suero a pH 6,5; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende además un 0,02% de trietanolamina (TEA). En otra realización particular, la invención proporciona un método en donde la fase acuosa comprende un 5% de PEG, 1% de Pluronic-F68, 75.000 células de isleta/mL y un 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 4-6; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende además un 0,02% de trietanolamina. En otra realización particular, la invención proporciona un método en donde la fase acuosa comprende un 5% de PEG, 1% de Pluronic-F68, 0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media, 75.000 células de isleta/mL y 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 7; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende además un 0,02% de trietanolamina. En otra realización particular, la invención proporciona un método en el que la fase acuosa comprende un 5% de PEG, 0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media, 75.000 células de isleta/mL y 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 6; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende además un 0,02% de trietanolamina. En otra realización particular, la invención proporciona un método en el que la fase acuosa comprende un 5% de PEG, 0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media, 75.000 células de isleta/mL y 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 5; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende además un 0,02% de trietanolamina. En cualquiera de las reivindicaciones descritas en la presente memoria, la fase oleaginoso puede comprender opcionalmente, por ejemplo, 0,01%-0,5% de trietanolamina, por ejemplo, 0,02%-0,2% de etanolamina. En algunas realizaciones, la fase oleaginoso puede comprender opcionalmente un 0,2% de trietanolamina, por ejemplo, en lugar de un 0,02% de trietanolamina.

En determinadas realizaciones, la fase oleaginoso comprende uno o más, por ejemplo, de polipropileno glicol (PPG) o aceite mineral con una viscosidad de al menos 2,5 veces superior a la viscosidad de la fase acuosa. La fase oleaginoso puede comprender además uno o más reactivos seleccionados, por ejemplo, entre Span80 y/o trietanolamina.

En algunas realizaciones, la fase oleaginoso comprende PPG. En determinadas realizaciones, la fase oleaginoso comprende PPG con 1-20%, 5-15%, 6-14%, 7-13%, 8-12%, 9-11% o 10% de Span80, y/o 0-2%, 0,005-0,5%, 0,008-0,05% o 0,01-0,02% de trietanolamina. En una realización particular, la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80. En algunas realizaciones, la fase oleaginoso que comprende PPG con un 10% de Span80 además comprende un 0,01%, 0,02% o 0,2% de trietanolamina (TEA).

En algunas realizaciones, los caudales de la fase acuosa (Q_w) y la fase oleaginoso (Q_o) se seleccionan respectivamente de: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 3,5 mL/min ; 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 3,5 mL/min ; 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 7 mL/min ; 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 0,5 mL/min ; 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 2,5 mL/min ; 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 0,5 mL/min ; y 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 2,5 mL/min . En algunas realizaciones, se inyecta aire antes de la fase acuosa para permitir la estabilización del agua en el chorro de aceite. En determinadas realizaciones, se introduce aire en un catéter de inyección que contiene la fase acuosa, de tal modo que la burbuja de aire puede inyectarse en la fase oleaginoso antes de la inyección de fase acuosa en la fase oleaginoso para ayudar a visualizar el comienzo de la fase acuosa.

Los caudales de la fase acuosa y de la fase oleaginoso pueden ajustarse con el tiempo. En algunas realizaciones, la fase acuosa se reduce con el tiempo a la vez que se incrementa la fase oleaginoso. En una realización particular, la fase acuosa entra en la fase oleaginoso en primer lugar con un caudal de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y después se reduce a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. En determinadas realizaciones, el caudal de fase oleaginoso se aumenta gradualmente desde 0,5 hasta 3,5 mL/min a la vez que se reduce la fase acuosa, y después se mantiene constante durante el proceso completo de encapsulación, o el caudal de fase oleaginoso se mantiene constante a 3,5 mL/min a lo largo del proceso de encapsulación.

En algunas realizaciones, la ratio entre la velocidad de la fase oleaginosa y la velocidad de la fase acuosa está entre 70 y 500. En determinadas realizaciones, la ratio es 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 450 ó 500. En una realización particular, la ratio es 350.

- 5 En algunas realizaciones, la ratio entre la viscosidad de la fase oleaginosa y la viscosidad de la fase acuosa está entre 2,5 y 100. En determinadas realizaciones, la ratio es 2,5, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100. En una realización particular la ratio es 3,5.

10 Tras la rotura del chorro de agua, el material a encapsular (por ejemplo, células y/o agrupaciones celulares) es recubierto con una capa de agua que contiene un material de recubrimiento delgado que es proporcional al tamaño del chorro, lo que permite el recubrimiento conformal. Las células/agrupaciones celulares recubiertas son recolectadas entonces del flujo de salida del dispositivo de recubrimiento. En algunas realizaciones, tras la recolección, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas se mantienen en agitación durante, por ejemplo, 1-30, 5-20 u 8-12 minutos para evitar la coalescencia hasta que se complete la polimerización del recubrimiento. En algunas realizaciones, la agitación tiene lugar a entre 4 y 25°C. En realizaciones particulares, la agitación tiene lugar a 25°C. En algunas realizaciones, la velocidad de agitación está entre 50-500 rpm o 100-300 rpm. En una realización, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas se mantienen en agitación durante aproximadamente 10 minutos. En otras realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas son recolectadas en un recipiente y se dejan sedimentar por gravedad. En algunas realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas se mantienen sin agitación en el baño externo durante, por ejemplo, 1-30, 5-20 u 8-12 minutos para permitir que se complete la polimerización del recubrimiento. En algunas realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas son recolectadas dentro de un recipiente que comprende PPG y un 10% de Span80 y un 0,02% de TEA. En otras realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas son recolectadas en un recipiente que comprende PPG y un 10% de Span80 y un 0,2% de TEA. En otras realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas son recolectadas en un recipiente que comprende PPG y un 0,02 o un 0,2% de TEA.

20 A continuación la fase oleaginosa se puede separar de la fase acuosa. En algunas realizaciones, la separación se produce mediante centrifugación y/o extracción con hexano. En determinadas realizaciones, dicha centrifugación comprende las etapas de:

- 30 a) centrifugar el flujo de salida para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial de la fase oleaginosa; y
 b) retirar el sobrenadante de la fase oleaginosa del biomaterial recubierto conformalmente y del material de recubrimiento libre de biomaterial.

En determinadas realizaciones, la fase oleaginosa se separa de la fase acuosa mediante centrifugación durante 5-20 minutos a 1000-2000 rpm seguido de 1-10 minutos a 100-1000 g. En una realización particular, la fase oleaginosa se separa de la fase acuosa mediante centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm seguido de 1 minuto a 500 g.

40 En algunas realizaciones, la extracción con hexano comprende las etapas de:

- 45 a) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en una composición que comprende hexano;
 b) centrifugar la mezcla de la etapa a) para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial del hexano; y
 c) retirar el sobrenadante de hexano.

En algunas realizaciones, la extracción con hexano comprende además, o alternativamente, las etapas de:

- 50 d) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en una composición que comprende hexano y un tampón;
 e) centrifugar la mezcla de la etapa d) para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial del hexano y del tampón; y
 55 f) retirar el sobrenadante de hexano/tampón.

El biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial pueden resuspenderse entonces en una disolución acuosa, por ejemplo, en un tampón.

60 En otras realizaciones, la extracción con hexano comprende además, o alternativamente, las etapas de:

- d) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en una composición que comprende o que consiste en hexano;
 e) añadir el tampón a la composición de hexano y mezclar, por ejemplo, invirtiendo el recipiente;

- f) centrifugar la mezcla de la etapa e) para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial de la composición de hexano y tampón; y
- g) retirar el sobrenadante de hexano/tampón.

5 En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo una segunda extracción con hexano.

En una realización particular, la extracción con hexano comprende las etapas de:

- 10 a) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material libre de biomaterial en una composición que comprende hexano;
- b) añadir tampón (HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) al biomaterial recubierto y al material de recubrimiento libre de biomaterial y a la mezcla de hexano y mezclar, por ejemplo, invirtiendo el recipiente;
- c) centrifugar la mezcla de la etapa b) durante 5 minutos a 500 g;
- 15 d) eliminar el sobrenadante de hexano y tampón, añadir tampón (HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) y resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial;
- e) centrifugar la mezcla de la etapa d) durante 30 segundos a 500 g;
- f) eliminar el sobrenadante de tampón, añadir hexano y resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial; añadir tampón (HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) y resuspender el material;
- 20 g) centrifugar la mezcla de la etapa f) durante 30 segundos a 500 g; y
- h) retirar el sobrenadante de hexano/PBS.

A continuación se puede resuspender en PBS el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial.

25 Puede ser deseable separar las células y/o agrupaciones celulares recubiertas del material de recubrimiento libre de biomaterial. Esta separación se puede lograr mediante cualquiera de una serie de técnicas de separación basadas en tamaño o densidad bien conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante centrifugación de gradiente. En determinadas realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas son purificadas adicionalmente del material de recubrimiento mediante centrifugación de gradiente, que comprende las etapas de:

- 30 a) estratificar disoluciones para formar un gradiente de densidad capaz de separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial;
- b) aplicar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial al gradiente de densidad;
- 35 c) centrifugar el gradiente de densidad para separar el biomaterial recubierto conformalmente del material de recubrimiento libre de biomaterial; y
- d) retirar la parte del gradiente que contiene el material de recubrimiento libre de biomaterial.

40 En una realización, las disoluciones estratificadas para formar el gradiente tienen las densidades de (1) 1-1,1 g/mL, por ejemplo, 1,042 g/mL, y (2) densidad del medio. En algunas realizaciones, se purifica más del 50, 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% del biomaterial recubierto del material de recubrimiento libre de biomaterial. En una realización determinada, se purifica más del 95% del biomaterial recubierto del material de recubrimiento libre de biomaterial.

45 En una realización particular, la invención proporciona un método en el que la fase acuosa comprende 10% de PEG, 2% de Pluronic-F68 y 0,62% p/v de DTT en medio libre de suero a pH 6,5;

50 en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso comprende opcionalmente un 0,02% de trietanolamina. En otra realización particular, la invención proporciona un método en donde la fase acuosa comprende un 5% de PEG, 1% de Pluronic-F68 y un 0,31% p/v de DTT en HBSS a pH 5,5; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende un 0,02% de trietanolamina. En otra realización particular, la invención proporciona un método en donde la fase acuosa comprende un 5% de PEG, 1% de Pluronic-F68, 0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media y un 0,31% p/v de DTT en HBSS a pH 7; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende un 0,02% de trietanolamina. En otra realización particular, la invención proporciona un método en donde la fase acuosa comprende un 5% de PEG, 0,8% de alginato de grupos G de viscosidad media y 0,31% p/v de DTT en HBSS a pH 4-7; en donde la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende un 0,02-2% de trietanolamina (por ejemplo, 0,02% o 0,2% de trietanolamina). En cualquiera de dichas realizaciones, el dispositivo de recubrimiento puede comprender una cámara de flujo que comprende una región de enfoque de flujo "de mayor enfoque" con una reducción del diámetro interno del canal desde 10 mm a 1 mm, con un ángulo de enfoque de 60 grados, y un canal aguas abajo de la región de enfoque de flujo que tiene un diámetro de aproximadamente 1 mm y una longitud de 100 mm;

65

en donde el método comprende las etapas de:

- a) aplicar la fase oleaginoso a la cámara de flujo;
- 5 b) inyectar aire en la cámara de flujo a través de una aguja cuya punta está localizada 0,5 mm aguas arriba de la base de la región de enfoque;
- c) inyectar la fase acuosa en la cámara de flujo a través de dicha aguja, en donde la fase acuosa es inyectada primero a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y después se reduce a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, mientras que la fase oleaginoso se mantiene a 3,5 mL/min , de tal modo que la tensión superficial entre la fase acuosa y la fase oleaginoso hace que el chorro de agua se rompa en gotas de tamaño de microlitros que comprenden el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial;
- 10 d) recolectar el flujo de salida de la cámara de flujo;
- e) centrifugar el flujo de salida para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial de la fase oleaginoso;
- 15 f) retirar el sobrenadante de la fase oleaginoso del biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial;
- g) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en una composición que comprende hexano, y añadir tampón y mezclar (por ejemplo, invirtiendo el recipiente);
- 20 h) centrifugar la mezcla de la etapa g) para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial del hexano y del tampón;
- i) eliminar el sobrenadante hexano/tampón;
- j) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en una composición que comprende un tampón;
- 25 k) centrifugar la mezcla de la etapa j) para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial del tampón;
- l) retirar el sobrenadante de tampón;
- m) opcionalmente, repetir las etapas g) – j);
- n) estratificar las disoluciones para formar un gradiente de densidades capaz de separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial;
- 30 o) aplicar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial al gradiente de densidades;
- p) centrifugar el gradiente de densidades para separar el biomaterial recubierto conformalmente del material de recubrimiento libre de biomaterial; y
- 35 q) retirar la parte del gradiente que contiene el material de recubrimiento libre de biomaterial.

En determinadas realizaciones, las células de isleta y/o el PEG son añadidos a la fase acuosa antes de inyectarlas en la cámara de flujo, o alternativamente, tras inyectarlas en la cámara de flujo.

40 Si el material de recubrimiento tiene una marca fluorescente, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas conformalmente pueden ser visualizadas, por ejemplo, mediante microscopía de fluorescencia, fluorocitometría, tecnología de clasificación celular de citometría de flujo, o mediante un lector de placas fluorescente. En algunas realizaciones, las células recubiertas conformalmente marcadas fluorescentemente pueden ser detectadas y/o aisladas usando, por ejemplo, citometría de flujo o FACS.

45 En algunas realizaciones, los métodos de la invención son escalados para recubrir conformalmente al menos 50.000; 100.000; 150.000; 200.000; 300.000; 400.000; 500.000; 600.000; 700.000; 800.000; 900.000 ó 1.000.000 de células y/o agrupaciones celulares al mismo tiempo. En algunas realizaciones, este escalado se consigue llevando a cabo los métodos de la invención en una serie de cámaras. En una realización, los métodos de la invención son escalados montando una serie de cámaras verticales paralelas, por ejemplo, en configuración radial, en la que un flujo radial para cada cámara alimenta la fase acuosa a cada cámara separada con unas características de flujo hidrodinámico comparables. En algunas realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas y el material de recubrimiento libre de biomaterial de cada cámara son recolectadas en recipientes separados. En algunas realizaciones, las células y/o agrupaciones celulares recubiertas y el material de recubrimiento libre de biomaterial procedentes de cada cámara son recolectadas en el mismo recipiente y se purifican al mismo tiempo.

55 En algunas realizaciones, los métodos de la invención proporcionan un recubrimiento conformal superior al 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% del biomaterial introducido en el dispositivo de recubrimiento. En determinadas realizaciones, los métodos de la invención proporcionan un recubrimiento conformal superior al 95% del biomaterial introducido.

60 En algunas realizaciones, la viabilidad y la función de las células y/o agrupaciones celulares recubiertas se determina mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayo MTT, tinción viva/muerta, y/o (en el caso de isletas) estimulación de glucosa estática de perfusión. En los casos en los que las células recubiertas son isletas, se puede evaluar la inmunoprotección de las isletas trasplantadas mediante

recubrimiento conformal, por ejemplo, monitorizando el nivel de glucosa y/o el peso del paciente trasplantado, y/o mediante evaluación histológica.

La invención proporciona además métodos para tratar un trastorno en un paciente, que comprenden las etapas de implantar en el paciente el biomaterial recubierto conformalmente aislado mediante los métodos referidos en la presente memoria. Dichos trastornos incluyen, aunque sin limitación: diabetes, hemofilia, fallo renal, amiloidosis, trastornos del sistema inmune, inflamaciones, dolor crónico, artritis, hipertensión, trastornos del sistema nervioso, trastornos metabólicos, trastornos endocrinos, trastornos linfoproliferativos, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, trastornos de células madre, trastornos de fagocitos, trastornos histiocíticos, anomalías de eritrocitos o plaquetas, trastornos de células plasmáticas, leucemias agudas, leucemias crónicas, malignidades (carcinoma de mama, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, carcinoma de célula renal, etc.), hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipogonadismo, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra hospedante (GVD), enfermedad veno-oclusiva, efectos secundarios de quimioterapia pre-trasplante (tales como sangrado excesivo, infertilidad y complicaciones renales, pulmonares o de corazón), y otros trastornos y enfermedades que serían reconocidos por el médico especialista.

Tal como se refiere en la presente memoria, el término "paciente" se refiere al receptor de un tratamiento terapéutico e incluye todos los animales. En una realización, el paciente es un mamífero. En una realización particular, el paciente es humano.

El biomaterial recubierto conformalmente producido mediante los métodos de la invención puede ser implantado en cualquier lugar apropiado dentro de un paciente. El biomaterial puede implantarse en sitios naïve o pre-vascularizados; en sitios fisiológicos o transformados; y dentro de tejidos y órganos o adyacente a los mismos. En determinadas realizaciones, la localización del implante no es la cavidad abdominal.

En algunas realizaciones, el biomaterial recubierto conformalmente producido mediante los métodos de la invención se coloca en un dispositivo antes de la implantación en un paciente, para reducir la respuesta inmune del paciente y/o para prolongar la supervivencia de las células. El dispositivo puede ser cualquier dispositivo adecuado para la implantación de material biológico en un paciente, por ejemplo, el dispositivo tal como se describe en la Publicación de EE.UU. nº 2006/0024276 o en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 6.716.246. En algunas realizaciones, el biomaterial recubierto conformalmente es implantado dentro de, o adyacente a, un sustrato estructural natural o sintético, biodegradable o no biodegradable.

Para que la presente invención pueda entenderse mejor, se presentan los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen propósito meramente ilustrativo y no deben considerarse como limitativos del alcance de la invención en modo alguno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Modelo computacional

Se ha desarrollado un modelo computacional en Comsol Multiphysics (función de parámetros a dos niveles del módulo de ingeniería química) para determinar el efecto de diferentes parámetros geométricos ("más enfoque" y "menos enfoque" en la cámara de flujo y diferentes puntos de inyección de la fase oleaginoso) y parámetros dinámicos (ratio entre los caudales de agua y aceite, ratio entre las viscosidades de agua y aceite, y tensión interfacial entre las dos fases) en la transición de goteo a formación de chorro de la fase acuosa, en el tamaño del chorro de agua final, y en la tensión total que actúa en el centro del chorro de agua.

Se ha usado una geometría 2D axisimétrica con dos parámetros de enfoque diferentes: "más enfoque" y "menos enfoque" y diferentes puntos de inyección de agua. Se ha creado la malla imponiendo un tamaño máximo de elemento en el eje central ($r=0$) igual a 10^{-5} m (Figura 1C).

La Tabla 1 muestra los valores de los diferentes parámetros fluidodinámicos experimentales (viscosidad de las fases acuosa y oleaginoso, velocidad de las fases acuosa y oleaginoso, tensión superficial) y de la geometría de la cámara (punto de inyección de la fase acuosa en el aceite y tipo de geometría de enfoque) para cada modelo computacional desarrollado. La Tabla 1 también indica si el conjunto de parámetros experimentales elegidos para cada modelo da como resultado la formación de chorro o de goteo de la fase acuosa dentro de la fase oleaginoso, así como los valores máximos de la tensión radial total.

No fue posible ejecutar el modelo con los valores verdaderos de las velocidades de agua y aceite, ya que los tiempos de compilación habrían sido inaceptables y la memoria de ordenador disponible habría limitado las compilaciones. Por lo tanto, aumentamos en 10^3 la magnitud de las velocidades. De esta manera, los resultados (especialmente en relación a los valores de tensiones de cizalla) no son representativos de los valores reales del sistema experimental que se describe más detalladamente a continuación, pero aportan información para la comparación entre las diferentes condiciones.

Tabla 1

	Viscosidad aceite	Viscosidad agua	Máxima velocidad aceite	Máxima velocidad agua	Tensión superficial	Punto de inyección	Geometría de enfoque	Chorro (jetting) o goteo (dripping)	Tensión total máxima
Modelo nº	η aceite (Pa·s)	η agua (Pa·s)	vmax aceite (m/s)	vmax agua (m/s)	σ (N/m)	estándar / más cerrado	menos / más	J / D	Tr max (din/cm ²)
1	0,34	0,01	5×10^{-2}	1×10^{-2}	0,005	std	más	J	$2 \cdot 10^6$
2	0,34	0,01	5×10^{-2}	1×10^{-2}	0,005	std	menos	D	$2 \cdot 10^6$
3	0,34	0,01	5×10^{-2}	5×10^{-2}	0,005	std	menos	J	$2 \cdot 10^6$
4	1,301	0,01	5×10^{-2}	5×10^{-2}	0,005	std	menos	J	$7,5 \cdot 10^6$
5	1,301	0,01	5×10^{-2}	5×10^{-2}	0,005	más cerrado	menos	J	$7,5 \cdot 10^6$
6	1,301	0,01	5×10^{-2}	50×10^{-2}	0,005	std	menos	J	$8 \cdot 10^6$
7	1,301	0,1	1×10^{-2}	700×10^{-2}	0,005	std	más	J	$6 \cdot 10^6$
8	1,301	0,01	1×10^{-2}	700×10^{-2}	0,005	std	más	J	$5 \cdot 10^6$
9	1,301	0,01	1×10^{-2}	350×10^{-2}	0,005	std	más	J	$3,5 \cdot 10^6$
10	1,301	0,01	1×10^{-2}	125×10^{-2}	0,005	std	más	J	$2,5 \cdot 10^6$

- 5 Los resultados se muestran en las Figuras 2-11.
- Ejemplo 2: Diseño y realización de la cámara de flujo
 Se han diseñado cámaras de flujo (con geometría de “más enfoque” y de “menos enfoque”, con diferentes diámetros de las cámaras co-axiales) y se han fabricado para evaluar experimentalmente los efectos de las diferentes geometrías y de los diferentes parámetros hidrodinámicos sobre la encapsulación de isletas.
- 10 Las cámaras de flujo se caracterizan por una región de enfoque del flujo (“más” o “menos” enfoque) y un canal recto estrecho aguas abajo.
- 15 La fase acuosa que contiene las disoluciones de recubrimiento y las agrupaciones celulares es inyectada en el canal central mediante un catéter (Figura 12A: 11, geometría de “más enfoque”) que está conectado al tubo de inyección y a una bomba a través de un anillo de cierre integral macho Luer (Figura 12A: 10), y es enfocada en la cámara principal (Figura 12A: 3) al interior del canal estrecho aguas abajo (Figura 12A: 4, 5, 7) desde la cámara principal mediante el flujo conjunto de una corriente externa de aceite que es inyectada dentro de la cámara a través de un puerto paralelo (Figura 12A: 9). El aire atrapado se elimina a través de un puerto lateral (Figura 12A: 8) aguas arriba del puerto de inyección de aceite. El catéter de inyección de agua (Figura 12A: 11) se asegura en su posición óptima mediante un tapón de cierre (Figura 12A: 1) para la cámara interior (Figura 12A: 2).
- 20 El flujo de fase oleaginosa se mantiene mediante una bomba peristáltica mientras que el flujo de la fase acuosa se mantiene con una bomba de jeringa de 2 mL.
- 25 Se han evaluado ambas cámaras de flujo, la de “más enfoque” y la de “menos enfoque”, obteniéndose resultados más prometedores para la cámara de flujo de “más enfoque” (ver el diseño de ejemplo de cámara de flujo: Figura 12).
- 30 También se han evaluado diferentes posiciones de inyección de la fase acuosa dentro de la fase oleaginosa y se ha descubierto que las posiciones óptimas son: (1) la estándar en la que la punta de la aguja de inyección de agua se co-localiza con la base de la región de enfoque del dispositivo, y (2) una posición en la que la punta de la aguja de inyección de agua está 0,5 mm por encima de la región de enfoque (Figura 12).
- 35 Llevamos a cabo experimentos de optimización usando partículas de tipo isleta (poliestireno rojo) que presentan un tamaño similar a las isletas (50-300 μ m).
- 40 Llevamos a cabo experimentos para determinar:
- la ratio óptima de velocidades de agua frente a aceite;
 - la concentración óptima de partículas de tipo isleta en la fase acuosa;
 - la instalación óptima para permitir la inyección de la fase acuosa dentro de la fase oleaginosa sin que se produzca un retroceso de flujo en la fase oleaginosa hacia la aguja de inyección de agua;
 - la composición óptima de la fase acuosa para evitar la coalescencia de agrupaciones celulares;
- 45

- la composición y el pH óptimos de la fase acuosa y la fase oleaginoso para permitir la gelificación de la disolución de recubrimiento aguas debajo de la rotura del chorro;
- el método óptimo para purificar las partículas recubiertas y no recubiertas con PEG, y las gotas de PEG de la fase oleaginoso de PPG en el flujo de salida; y
- el método óptimo para purificar las partículas recubiertas de las partículas de PEG vacías.

Los resultados se discuten a continuación.

Ejemplo 3: Funcionalización con PEG y gelificación

La gelificación con PEG se obtiene por reticulación de PEG de 8 brazos de 10 kDa, que ha sido funcionalizado con divinil sulfona (PEG-dVS) o con maleimida (PEG-MAL), mediante la adición de ditioneitol (DTT) y ajustando el pH desde menos de 6,5 a 7,4 con trietanolamina (TEA). La gelificación de hidrogeles alternativos no basados en PEG (por ejemplo, VLVG) se consigue mediante reticulación de monómeros que han sido funcionalizados con divinil sulfona (dVS) o con maleimida (MAL) mediante adición de ditioneitol (DTT), y ajustando el pH desde menos de 6,5 a 7,4 con trietanolamina (TEA).

En la Figura 13 se muestra un esquema de la funcionalización de PEG con dVS (superior al 90%) mediante adición de tipo Michael de dVS en presencia de NaH (1).

Para ser capaces de obtener imágenes del gel de PEG mediante microscopía de fluorescencia, marcamos el PEG-dVS con fluoresceinamina mediante adición de tipo Michael en un tampón de carbonato sódico (1bis) (Figura 14).

Ejemplo 4: Parámetros hidrodinámicos y experimentales

En las cámaras de flujo que hemos diseñado, hemos optimizado la formación de chorro y la rotura en gotas de pequeño tamaño que contienen isletas, en paralelo a un modelo computacional y unas determinaciones empíricas.

La fase oleaginoso se prepara con polipropileno glicol (PPG) 4000 (Sigma) con un 10% de Span80 (Sigma), con o sin un 0,02% o un 0,2% de trietanolamina (TEA) para controlar la velocidad de polimerización. Se añade TEA al baño de aceite aguas debajo del flujo de salida (Figura 12A: 5).

La fase acuosa se prepara con un 5% p/v de PEG-dVS o PEG-MAL (PEG-dVS-FITC añadido en una ratio 1:10 con PEG-dVS o 3000 kDa FITC dextrano a una concentración de 1 mg/mL cuando se requiere marcaje de fluorescencia de gel PEG), 3,1 mg/mL de DTT (4 moles de DTT por 1 mol de PEG-dVS), 0,8% de MVG (Novamatrix) y 75.000 partículas de tipo isleta (partículas rojas de poliestireno) o agrupaciones celulares por mL en tampón (HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+}). El pH de la disolución de PEG ha sido ajustado por debajo de 6 (5 para PEG-dVS y 3,5 para PEG-MAL).

La fase acuosa se inyecta a través de una aguja en la fase oleaginoso primero a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y después se reduce a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. El caudal de fase oleaginoso se mantiene constante a 3,5 mL/min mientras que la fase acuosa se disminuye para evitar un retroflujo de aceite en la aguja de inyección de fase acuosa, y a continuación se mantiene constante durante el proceso de encapsulación completo. Se inyecta aire antes del agua para evitar desperdiciar polímero y productos de partículas y para permitir la estabilización del agua en el chorro de aceite.

Ejemplo 5: Purificación y caracterización de agrupaciones celulares encapsuladas

También hemos optimizado los métodos para purificar partículas modelo recubiertas o agrupaciones celulares recubiertas de la fase oleaginoso. Las partículas de tipo isleta recubiertas y las agrupaciones celulares recubiertas y las gotas de PEG son recogidas del flujo de salida de la cámara de flujo en un tubo cónico de 50 mL que contiene fase oleaginoso con un 0,02% o un 0,2% de trietanolamina (TEA) hasta que se completa la polimerización del recubrimiento de PEG (entre 5 y 10 minutos después de que la última agrupación encapsulada haya alcanzado la salida).

La fase oleaginoso se separa de la fase acuosa primero mediante centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm en tubos cónicos de 50 mL. Posteriormente, se logra la eliminación completa de PPG mediante extracción con hexano varias veces (50% de hexano y 50% de HBSS) centrifugando primero durante 5 minutos a 1500 rpm en un tubo cónico de 50 mL y después durante 1 minuto a 500 g en tubos Eppendorf de 1,5 mL hasta que el aceite es eliminado completamente de la fase acuosa y los resultados de HBSS están libres de PPG (una emulsión blanquecina formada entre las dos fases revela fácilmente la presencia de PPG en HBSS). Se añade una disolución 50 mM de CaCl_2 en tampón equilibrado osmóticamente para permitir la gelificación de MVG.

Las gotas de PEG se pueden separar de las partículas recubiertas de PEG o de las agrupaciones recubiertas de PEG mediante centrifugación de gradiente (el gel de PEG tiene una densidad inferior a las isletas) mediante estratificación en disoluciones Ficoll con las siguientes densidades: 1,042 g/mL y medio. Tras centrifugación, las partículas o agrupaciones recubiertas irán al fondo mientras que las partículas vacías se estratificarán en la parte superior de la capa de 1,042 g/mL y en el medio. Se desecha el sobrenadante y las partículas y agrupaciones recubiertas son recolectadas y lavadas. El recubrimiento de PEG de partículas o agrupaciones puede visualizarse

mediante microscopía de fluorescencia o mediante microscopía confocal si se añade PEG-dVS-FITC o FITC dextrano de 3000 kDa a la fase acuosa.

5 Optimizando la instalación experimental, mejoramos la eficacia del recubrimiento de partículas y agrupaciones celulares con PEG desde un 10 a un 95%, logrando un buen rendimiento de partículas o agrupaciones recubiertas frente a no recubiertas. Las partículas recubiertas presentan una cobertura de PEG uniforme alrededor de su volumen de entre aproximadamente 10 y 20 μm , y el espesor de dicho recubrimiento no depende del tamaño de partícula (que varía entre 50 y 300 μm).

10 La obtención de imágenes confocales y el procesado de imágenes mediante Imaris permite la evaluación de la calidad del recubrimiento, con algunas limitaciones relativas a la penetración del láser confocal a través de las muestras (no se pueden obtener imágenes de ambos lados del recubrimiento). La Figura 15 muestra algunos ejemplos de imágenes confocales de partículas recubiertas con FITC-PEG; izquierda: proyección ortogonal de un escaneo-Z de la partícula recubierta completa, derecha: reconstrucción 3D de la serie de escaneos-Z y seccionado en el plano medio.

Ejemplo 6: Optimización de la encapsulación para espesor y grado total de recubrimiento usando modelos de partículas heterogéneas

20 Las características del recubrimiento conformal que buscamos conseguir son las siguientes: (1) elevada eficacia de recubrimiento (alta proporción de partículas recubiertas frente a partículas no recubiertas), (2) alta eficacia de productos polímeros primarios frente a secundarios (reducir el número de partículas poliméricas vacías y el tamaño de productos secundarios de la rotura del chorro), y (3) alto rendimiento de partículas recubiertas tras purificación desde de la fase oleaginosa.

25 Llevamos a cabo varios experimentos en los que se evaluó el efecto de los siguientes parámetros como un indicador de resultado:

- (a) concentración de partículas en la fase acuosa (desde 5.000 a 100.000 IEQ/mL),
- (b) concentración de tensioactivo en la fase acuosa (para evitar la coalescencia de partículas tras el recubrimiento, de 0 a 2,5% de Pluronic F-68),
- (c) ratio de los caudales de la fase acuosa (Q_w) con respecto a la fase oleaginosa (Q_o) y caudal absoluto de la fase oleaginosa (se han evaluado las siguientes combinaciones Q_w/Q_o : 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 0,5 mL/min; 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 2,5 mL/min; 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 0,5 mL/min; 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 2,5 mL/min),
- (d) diseño de la cámara de flujo (se han modificado tanto el ángulo de enfoque del dispositivo que permita una transición de goteo a formación de chorro de la fase acuosa en el aceite como el diámetro del canal aguas abajo (diámetro: d), dando como resultado cuatro diseños de dispositivo diferentes: más enfoque / d=1 mm; menos enfoque / d= 1 mm; más enfoque / d= 3 mm; menos enfoque / d= 3 mm),
- (e) posición de la aguja de inyección de la fase acuosa con respecto al canal de enfoque del dispositivo (esto afecta a la transición de goteo a formación de chorro) (de 0 mm a 1 mm por encima de la región de enfoque),
- (f) composición e instalación de los medios de recolección del flujo de salida (100% de fase oleaginosa y 0% de fase acuosa y diferentes % de trietanolamina en aceite, y agitación magnética frente a ausencia de agitación del flujo de salida recogido),
- (g) extracción de partículas recubiertas de la fase oleaginosa y separación de las partículas poliméricas secundarias y la fase oleaginosa (adición de diferentes volúmenes de disolvente hexano para la eliminación de fase oleaginosa y diferentes ciclos de centrifugación y periodos de sedimentación de partículas recubiertas).

50 La Figura 16 muestra ejemplos de morfologías de partículas recubiertas resultantes de diferentes combinaciones de los anteriores parámetros experimentales. En estos ejemplos, se ha añadido FITC-PEG-dVS a la fase acuosa en una concentración del 1% para marcar fluorescentemente el recubrimiento y para permitir la evaluación de la eficacia de recubrimiento.

55 Un protocolo optimizado para el recubrimiento de partículas resultante de los anteriores experimentos de optimización es el siguiente:

- Composición de fase acuosa: 10% de PEG-dVS, 2% de Pluronic F-68, 50000 IEQ/mL y 0,62% p/v de DTT en medio libre de suero, pH 6,5;
- Parámetros de flujo: $Q_w = 50 \mu\text{L}/\text{min}$ / $Q_o = 0,5 \text{ mL}/\text{min}$ ($Q_o/Q_w = 350$ y $V_o/V_w = 3,5$);
- Diseño de dispositivo: dispositivo de más enfoque, d = 1 mm, ángulo de enfoque de 60 grados, aguja de inyección de 0,5 mm aguas arriba de la región de enfoque;
- Salida de flujo: 5 mL de PPG con 0,02% de trietanolamina agitado a 300 rpm / tubo de salida de flujo dentro de la fase aceite y lejos del cono de agitación; y
- Purificación: recogida del flujo de salida en un tubo cónico de 15 mL. Centrifugación a 1500 rpm / 5 minutos. Desechar todo el PPG. Resuspender las partículas recubiertas y las partículas de polímero secundario en 1

mL de hexano y transferir a un tubo Eppendorf de 2 mL. Centrifugar 1 minuto / 500 g. Desechar el sobrenadante de hexano. Añadir 0,5 mL de hexano y resuspender, a continuación añadir 1 mL de PBS. Centrifugar 1 minuto / 500 g. Desechar el sobrenadante de hexano / PBS. Resuspender en 1 mL de PBS. Proceder con una centrifugación de gradiente (descrita anteriormente) para purificar las partículas recubiertas de las partículas de PEG secundarias vacías.

Ejemplo 7: Optimización de la composición del material de recubrimiento para obtener la permeabilidad y permselectividad deseadas

Dependiendo de la aplicación de la tecnología de encapsulación descrita en la presente memoria, pueden ser necesarios diferentes valores de permeabilidad y permselectividad. Nosotros hemos validado métodos experimentales existentes para determinar dichos parámetros en varios hidrogeles basados en PEG y alginato. Encontramos una correlación negativa entre el grado de reticulación y la rigidez de la red de los hidrogeles basados en PEG-dVS y su permeabilidad a proteínas de peso molecular conocido (Figura 17A). A fin de disminuir el grado de reticulación de PEG-dVS de 8-brazos y 10 kDa a través de DTT, realizamos un "capping" de los grupos funcionales VS mediante exposición a beta-mercaptoetanol en diferentes relaciones molares respecto a los grupos funcionales (cap 0: des-funcionalizar 0 de 8 grupos VS del PEG; cap 2: des-funcionalizar 2 de 8 grupos VS del PEG; cap 4: des-funcionalizar 4 de 8 grupos VS del PEG). Para reducir la rigidez de las redes de hidrogel, incluimos alginato (MVG de Novamatrix) como "espaciador" de red y sustituimos el DTT con un agente reticulante de mayor longitud (PEGdiTiol 1 kDa) o usamos PEG-dVS de 4-brazos y 20 kDa como monómero en lugar del PEG-dVS de 8-brazos y 10 kDa. Se añadió FITC dextrano de 10 kDa en una concentración de 1 mg/mL a las partículas de hidrogel y se midió la cantidad (como concentración: c) que difundió al exterior con el tiempo mediante lectura de fluorescencia del baño exterior en el que estaban depositadas las partículas. Se representó la ratio entre c y la concentración de equilibrio calculada (c_{inf}) frente al tiempo, que representa la cinética de difusión hacia el exterior de dextrano de 10 kDa de cada composición de hidrogel en comparación con MVG al 1,6%. Para cada composición de hidrogel, se midió la permselectividad añadiendo proteínas de diferente peso molecular a las partículas de hidrogel y midiendo la concentración de cada proteína en el lote exterior a diferentes tiempos. El porcentaje de proteínas que han difundido hacia el exterior a tiempos mayores para cada proteína representa la capacidad de cada proteína para moverse selectivamente a través de la red de hidrogel. Para PEG-dVS de 8-brazos y 10 kDa, y 0,8% de MVG reticulado con DTT, se puede asumir que la permselectividad está entre 250 y 500 kDa (Figura 17B).

Ejemplo 8: Optimización de la composición del material de recubrimiento en términos de biocompatibilidad en el sitio de implante deseado

Dependiendo de la aplicación de la tecnología de encapsulación descrita en la presente memoria, son deseables diferentes sitios de implante. Al ser la biocompatibilidad para un determinado hidrogel dependiente del sitio de implante, nosotros hemos establecido y validado un método para evaluar la biocompatibilidad de diferentes composiciones de hidrogel en ratones. Generamos macropartículas de hidrogel (con un tamaño de entre 0,5 y 2 mm) y las implantamos en condiciones de esterilización dentro de HBSS en diferentes sitios en ratones y ratas: subcutánea, bajo la cápsula renal, grasa epididimal, intraperitoneal, en la bolsa omental). Se evaluó un examen histológico de infiltrados celulares y un remodelado tisular en la interfaz biomaterial-tejido y se puntuó para comparar la biocompatibilidad de diferentes materiales. Hemos observado que la biorreactividad de PEG-dVS es mayor que la PEG-MAL y la de ALG-VS, independientemente del sitio de implante (Figura 18), y que los sitios subcutáneos y subcapsular renal son sitios más reactivos para el implante del biomaterial.

Ejemplo 9: Optimización de la encapsulación para recubrimiento completo usando isletas de rata

Las características de recubrimiento conformal que perseguíamos alcanzar son las siguientes: (1) alta eficacia de recubrimiento (alta ratio de isletas recubiertas frente a no recubiertas), (2) alta eficacia de productos poliméricos primarios frente a secundarios (reducir el número de partículas poliméricas vacías y el tamaño de los productos secundarios de la rotura de chorro), y (3) alto rendimiento de isletas recubiertas tras purificación de la fase oleaginososa.

Realizamos varios experimentos en los que se evaluó el efecto de los siguientes parámetros como indicadores de resultado:

- (a) concentración de isletas en la fase acuosa (entre 5.000 y 100.000 IEQ/mL),
- (b) concentración de tensioactivo y alginato en la fase acuosa (para prevenir la coalescencia de isletas tras el recubrimiento, de 0 a 2,5% de Pluronic F-68 y de 0 a 1,6% de MVG de Novamatrix),
- (c) la ratio de caudales entre la fase acuosa (Q_w) y la fase oleaginososa (Q_o) y el caudal absoluto de fase oleaginososa (por ejemplo, se han evaluado las siguientes combinaciones de Q_w/Q_o : 50 μ L/min – 0,5 mL/min; 50 μ L/min – 2,5 mL/min; 150 μ L/min – 0,5 mL/min; 150 μ L/min – 2,5 mL/min),
- (d) el diseño de la cámara de flujo (se han modificado tanto el ángulo de enfoque del dispositivo, que permite la transición de goteo a formación de chorro de la fase acuosa en el aceite, como el diámetro del canal aguas abajo (diámetro: d), dando como resultado cuatro diseños diferentes de dispositivo: más enfoque / d = 1 mm; menos enfoque / d = 1 mm; más enfoque / d = 3 mm; menos enfoque / d = 3 mm),

(e) la posición de la aguja de inyección de la fase acuosa con respecto al canal de enfoque del dispositivo (esto afecta a la transición de goteo a formación de chorro) (entre 0 mm y 1 mm aguas arriba de la región de enfoque),

(f) la composición y la instalación del medio de recolección del flujo de salida (100% fase aceite y 0% fase agua y diferentes % de trietanolamina en aceite, y agitación magnética frente a ausencia de agitación del flujo de salida recogido),

(g) la extracción de isletas recubiertas de la fase oleaginosa y la separación de las partículas poliméricas secundarias y la fase oleaginosa (adición de diferentes volúmenes de disolvente hexano para la eliminación de la fase oleaginosa y de diferentes ciclos de centrifugación y periodos de sedimentación de isletas recubiertas).

La Figura 19 muestra la morfología de las isletas recubiertas como resultado de las combinaciones óptimas de los anteriores parámetros experimentales. En estos ejemplos, se ha añadido FITC-PEG-dVS (Figura 19B) o FITC dextrano de 2000 kDa (Figura 19C) a la fase acuosa en un 1% o 1 mg/mL de concentración respectivamente para marcar fluorescentemente el recubrimiento y para permitir la evaluación de un recubrimiento completo y de la eficacia de recubrimiento.

El protocolo optimizado para el recubrimiento de isletas resultante de los anteriores experimentos de optimización es el siguiente:

- Composición de fase acuosa: 5% de PEG-dVS, 0,8% de MVG (Novamatrix), 75000 IEQ/mL y 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} con la disolución de PEG a pH 5;
- Parámetros de flujo: $Q_w = 10 \mu\text{L}/\text{min}$ / $Q_o = 3,5 \text{ mL}/\text{min}$ ($Q_o/Q_w = 350$ y $V_o/V_w = 3,5$);
- Diseño de dispositivo: dispositivo de más enfoque, $d = 1 \text{ mm}$, ángulo de enfoque de 60 grados, aguja de inyección de 0,5 mm aguas arriba de la región de enfoque;
- Salida de flujo: 15 mL de PPG con 0,02% de trietanolamina en un tubo cónico; y
- Purificación: Centrifugación a 1500 rpm / 5 minutos. Desechar todo el PPG. Resuspender las isletas recubiertas y las partículas de polímero secundario en 5 mL de hexano y pipetear arriba y abajo 5 veces sin romper la partícula. Añadir 40 mL de HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} e invertir el tubo dos veces. Centrifugar 5 minutos / 1500 rpm. Desechar el sobrenadante. Añadir 1 mL de HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . Centrifugar 30 segundos / 500 g. Descartar el sobrenadante y resuspender en medio basal de isletas. Llevar a placa las isletas recubiertas a 38 IEQ/cm² en placas Petri que contienen medio completo que había sido equilibrado en una incubadora a 37°C con un 5% de CO₂ durante al menos 15 minutos.

Ejemplo 10: Evaluación de la función in vitro de isletas encapsuladas en función de los materiales de encapsulación

La respuesta funcional (liberación de insulina tras estimulación de glucosa) de isletas de rata encapsuladas con diferentes composiciones de hidrogel ha sido evaluada a través de un método establecido previamente de estimulación estática con diferentes cantidades de glucosa: Baja1: 60 mg/dL de glucosa, Alta: 300 mg/dL, Baja2: 60 mg/dL. Como era de esperar, la respuesta de insulina a la estimulación de glucosa se correlacionó positivamente con el aumento de la permeabilidad de cada composición de recubrimiento de hidrogel (Figuras 17 y 20). Las isletas recubiertas con PEG-dVS de 8-brazos y 10 kDa y reticuladas con DTT presentaron una mejor respuesta a bajos porcentajes de PEG y para recubrimiento conformal frente a masas y varillas (SPAGH) y cuando se añadió alginato MVG (ALG) al hidrogel (Figura 20A). Las isletas recubiertas conformalmente con PEG-dVS de 8-brazos y 10 kDa reticuladas con DTT mostraron una mejor respuesta que los geles reticulados con HS-PEG-SH lineal, mientras que el "capping" de grupos funcionales de PEG-VS con beta-mercaptoetanol no mostró ninguna mejora significativa (Figura 20B). Las isletas recubiertas conformalmente con PEG-dVS de 8-brazos y 10 kDa reticuladas con DTT mostraron una mejor respuesta que la reticulación con HS-PEG-SH multi-brazo (4-brazos y 10 kDa y 4-brazos y 20 kDa, Figura 20C).

Ejemplo 11: Optimización de la encapsulación en términos de viabilidad y función in vitro de las isletas encapsuladas en función de la secuencia temporal

Hemos evaluado el efecto de modificar los tiempos entre aislamiento / encapsulación / evaluación funcional sobre la viabilidad de las isletas (tinción viva/muerta) y la respuesta funcional (liberación de insulina tras estimulación de glucosa) de isletas de rata encapsuladas con un 5% de PEG-dVS de 8-brazos y 10 kDa y un 0,8% de MVG reticuladas con DTT (PEG ALG). Las isletas de rata encapsuladas mediante recubrimiento conformal dos días después del aislamiento son poco viables justo después de la encapsulación y muestran un anillo de muerte en la superficie externa. El cultivo en condiciones estándar durante hasta 48 horas tras la encapsulación permite una recuperación completa de la viabilidad de las isletas (Figuras 21A). Aunque la respuesta funcional (secreción de insulina tras estimulación de glucosa: L1: 60 mg/dL de glucosa, H: 300 mg/dL, L2: 60 mg/dL) de isletas desnudas se deteriora rápidamente durante el cultivo *ex vivo* estándar tras el aislamiento (Figura 21B), la encapsulación mediante recubrimiento conformal con PEG ALG un día (Figura 21C) o dos días (Figura 21D) tras aislamiento, y evaluada a 24 y 48 horas de la encapsulación, es capaz de preservar completamente la función de isleta.

Ejemplo 12: Evaluación de la función in vivo de isletas encapsuladas para restaurar la normoglucemia de ratones diabéticos inducidos químicamente.

Se ha evaluado la función *in vivo* de isletas encapsuladas mediante recubrimiento conformal para determinar su capacidad para restaurar la normoglucemia en ratones inmunocompetentes diabéticos inducidos químicamente, después de trasplantes de isletas singénicas encapsuladas bajo la cápsula renal.

5 Isletas de ratón (C57BL/6) recubiertas conformalmente con PEG ALG y trasplantadas a 700 ó 1500 IEQ/ratón bajo la cápsula renal de ratones singénicos diabéticos inducidos químicamente produjeron una rápida reversión en los ratones receptores y permitieron mantener la normoglucemia durante más de 100 días. Una nefrectomía confirmó que la normoglucemia se debía a la función de las isletas recubiertas (Figura 22).

10 La evaluación histológica (Figura 23, izquierda) e inmunohistoquímica (Figura 23, derecha), en el momento de rechazo de controles desnudos (parte superior, día 11) y recubiertos conformalmente (parte inferior, día 55), de isletas trasplantadas bajo la cápsula renal de receptores xenogénicos concordantes confirma que el recubrimiento conformal es capaz de proteger xeno-trasplantes de isletas frente a la destrucción inmune sin comprometer su viabilidad y su función metabólica.

15 Ejemplo 13: Utilidad del recubrimiento conformal en el inmunoaislamiento de aloinjertos de isletas
Las isletas son aisladas y recubiertas conformalmente mediante los métodos descritos anteriormente, a continuación son implantadas en hospedantes alogénicos diabéticos. La viabilidad y la función de las isletas recubiertas son evaluadas mediante ensayo MTT, tinción viva/muerta y mediante estimulación estática de glucosa pre-implantación, tal y como se ha descrito antes para garantizar de las isletas recubiertas para normalizar la glucemia en hospedantes diabéticos. La inmunoprotección de isletas trasplantadas frente al rechazo por efecto del recubrimiento conformal se evalúa monitorizando el nivel de glucosa en sangre y el peso del hospedante trasplantado y mediante evaluación histológica tras sacrificio.

25 Ejemplo 14: Utilidad del recubrimiento conformal en el inmunoaislamiento de xenoinjertos de isletas
Las isletas son aisladas y recubiertas conformalmente mediante los métodos descritos anteriormente, a continuación son implantadas en hospedantes xenogénicos diabéticos. La viabilidad y la función de las isletas recubiertas son evaluadas mediante ensayo MTT, tinción viva/muerta y mediante estimulación estática de glucosa pre-implantación, tal y como se ha descrito antes para garantizar de las isletas recubiertas para normalizar la glucemia en hospedantes diabéticos. La inmunoprotección de isletas trasplantadas frente al rechazo por efecto del recubrimiento conformal se evalúa monitorizando el nivel de glucosa en sangre y el peso del hospedante trasplantado y mediante evaluación histológica tras sacrificio.

35 Ejemplo 15: Escalado de los métodos de recubrimiento conformal
En las cámaras de flujo que hemos diseñado, la fase oleaginosa se prepara con polipropileno glicol (PPG) 4000 (Sigma) con un 10% de Span80 (Sigma). La fase acuosa se prepara con disolución de hidrogel. La fase acuosa se inyecta a través de una aguja en la fase oleaginosa con un caudal de $\mu\text{L}/\text{min}$. El caudal de fase oleaginosa se mantiene en 3,5 mL/min.

40 Debido a que el dispositivo de recubrimiento está en configuración vertical, el procedimiento puede escalarse para garantizar el recubrimiento conformal de preparaciones humanas de mayor tamaño sin variabilidad entre lotes de la misma preparación. Para permitir la encapsulación de cientos de miles de isletas humanas al mismo tiempo, y con los mismos parámetros experimentales, se puede ensamblar una serie de cámaras verticales paralelas en configuración radial en las que el flujo radial a cada cámara alimenta la fase acuosa que contiene la preparación de isletas a cada cámara separada con unas características hidrodinámicas comparables. De esta manera, la rotura del chorro de agua se produce al mismo tiempo en cada cámara separada, dando como resultado recubrimientos comparables para isletas que proceden de diferentes canales. Las isletas recubiertas y las partículas de polímero vacías son recolectadas a continuación en el mismo recipiente, y se purifican al mismo tiempo para reducir aún más cualquier variabilidad potencial entre lotes.

50 Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en la presente especificación se incorporan a la presente memoria a modo de referencia, como si la publicación o solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada a modo de referencia.

55 Referencias

1. Robertson, R. P. Update on transplanting beta cells for reversing type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**, 655-667, doi:S0889-8529(10)00042-3 [pii] 10.1016/j.ecl.2010.05.010 [doi].
2. de Vos, P., Spasojevic, M. & Faas, M. M. Treatment of diabetes with encapsulated islets. *Adv Exp Med Biol* **670**, 38-53.
3. Teramura, Y. & Iwata, H. Bioartificial páncreas microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 827-840, doi:S0169-409X(10)00036-0 [pii] 10.1016/j.addr.2010.01.005 [doi].

4. de Groot, M., Schuurs, T. A. & van Schilfgaarde, R. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res* **121**, 141-150, doi:10.1016/j.jss.2004.02.018 [doi] S0022480404000629 [pii] (2004).
5. Rabanel, J. M., Banquy, X., Zouaoui, H., Mokhtar, M. & Hildgen, P. Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy. *Biotechnol Prog* **25**, 946-963, doi:10.1002/btpr.226 [doi] (2009).
6. Eggleton, C. D., Tsai, T. M. & Stebe, K. J. Tip streaming from a drop in the presence of surfactants. *Phys Rev Lett* **87**, 048302 (2001).
7. Utada, A. S., Fernandez-Nieves, A., Gordillo, J. M. & Weitz, D. A. Absolute instability of a liquid jet in a coflowing stream. *Phys Rev Lett* **100**, 014502 (2008).
10. Loscertales, I. G. *et al.* Micro/nano encapsulation via electrified coaxial liquid jets. *Science* **295**, 1695-1698, doi:10.1126/science.1067595 [doi] 295/5560/1695 [pii] (2002).
9. Cohen, I., Li, H., Hougland, J. L., Mrksich, M. & Nagel, S. R. Using selective withdrawal to coat microparticles. *Science* **292**, 265-267, doi:10.1126/science.1059175 [doi] 292/5515/265 [pii] (2001).
15. 10. Chabert, M. & Viovy, J. L. Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 3191-3196, doi:0708321105 [pii] 10.1073/pnas.0708321105 [doi] (2008).
11. Wyman, J. L. *et al.* Immunisolating pancreatic islets by encapsulation with selective withdrawal. *Small* **3**, 683-690, doi:10.1002/sml.200600231 [doi] (2007).
20. 12. Cellesi, F. New fully synthetic Materials for cell encapsulation, Doctoral Thesis, ETH Zurich, 2003, pg. 1-130.

REIVINDICACIONES

1. Un método para recubrir conformalmente un biomaterial con un material de recubrimiento, que comprende las etapas de:

- 5
- a) inyectar una fase acuosa dentro de una fase oleaginoso coaxial en un dispositivo de recubrimiento que permite una transición desde goteo a formación de chorro y una elongación del flujo de la fase acuosa dentro de la fase oleaginoso;
 - 10 b) añadir el biomaterial y el material de recubrimiento a la fase acuosa, en donde se produce la polimerización del material de recubrimiento aguas abajo de la rotura del chorro de la fase acuosa en partículas, dando como resultado el recubrimiento conformal del biomaterial con el material de recubrimiento;
 - c) opcionalmente recolectar el flujo de salida del dispositivo de recubrimiento;
 - d) opcionalmente purificar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial de la fase oleaginoso; y
 - 15 e) opcionalmente separar el biomaterial recubierto conformalmente del material de recubrimiento libre de biomaterial;

en donde el biomaterial comprende células o agrupaciones celulares.

20 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde el biomaterial comprende células o agrupaciones de células de isleta pancreática.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde el material de recubrimiento comprende polietileno glicol (PEG).

25 **4.** El método una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde:

- a) la fase acuosa comprende 75.000 células de isleta/mL, y además comprende:
 - 30 i) 10% de PEG, 2% de Pluronic-F68 y 0,62% p/v de DTT en medio libre de suero a pH 6-7;
 - ii) 5% de PEG, 1% de Pluronic-F68 y 0,31% p/v de DTT en medio libre de suero a pH 6-7;
 - iii) 5% de PEG, 1% de Pluronic-F68, 0,8% de alginato de grupos-G de viscosidad media y 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 6-7; o
 - iv) 5% de PEG, 0,8% de alginato de grupos-G de viscosidad media y 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 6-7; y
- 35 b) la fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso comprenden opcionalmente además 0,02 ó 0,2% de trietanolamina.

40 **5.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el dispositivo de recubrimiento comprende una cámara de flujo que comprende una región de enfoque del flujo y un canal aguas abajo de la región de enfoque de flujo; y en donde la cámara de flujo tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- 45 a) el diámetro del canal interior de la región de enfoque del flujo se restringe desde 10d hasta d a lo largo de su longitud, en donde d es aproximadamente 1 mm;
- b) el ángulo de enfoque de la región de enfoque de flujo es de aproximadamente 60 grados;
- c) el canal aguas abajo de la región de enfoque de flujo tiene 1 mm de diámetro; y
- d) la fase acuosa se inyecta en la cámara de flujo a través de una aguja o un catéter cuya punta está localizada aproximadamente 0,5 mm aguas arriba de la región de enfoque.

50 **6.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- a) la ratio entre la velocidad de la fase oleaginoso y la velocidad de la fase acuosa es de 350;
- 55 b) la ratio entre la viscosidad de la fase oleaginoso y la viscosidad de la fase acuosa es de 3,5, 130 ó 13;
- c) la fase acuosa es inyectada en la fase oleaginoso primero a 50 μ L/min y después se reduce a 10 μ L/min, mientras que la fase oleaginoso se mantiene a 3,5 mL/min; y
- d) se inyecta aire en la fase oleaginoso antes de la inyección de la fase acuosa.

60 **7.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la etapa de purificar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial de la fase oleaginoso comprende las etapas de:

- a) centrifugar el flujo de salida del dispositivo de recubrimiento para separar la fase oleaginoso del biomaterial recubierto conformalmente y del material de recubrimiento libre de biomaterial; y
- 65 b) llevar a cabo opcionalmente una extracción con hexano hasta eliminar completamente la fase oleaginoso del biomaterial recubierto conformalmente y del material de recubrimiento libre de biomaterial.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la etapa de separar el biomaterial recubierto conformalmente del material de recubrimiento libre de biomaterial se lleva a cabo mediante centrifugación de gradiente o mediante decantación por gravedad de las agrupaciones recubiertas.

9. El método de la reivindicación 1, en donde:

- a) dicha fase acuosa comprende 5% de PEG, 0,8% de MVG, 75.000 células de isleta/mL, y 0,31% p/v de DTT en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a pH 6-7;
- b) dicha fase oleaginoso comprende PPG con un 10% de Span80, en donde dicha fase oleaginoso opcionalmente comprende 0,02% ó 0,2% de trietanolamina; y
- c) dicho dispositivo de recubrimiento comprende una cámara de flujo que comprende una región de enfoque de flujo con un canal cuyo diámetro interior se reduce de 10 mm a 1 mm con un ángulo de enfoque de 60 grados, y un canal aguas abajo de la región de enfoque de flujo con un diámetro de aproximadamente 1 mm.

10. El método de la reivindicación 9, en donde:

a) dicho método comprende las etapas de:

- i) aplicar la fase oleaginoso a la cámara de flujo;
- ii) opcionalmente inyectar aire en la cámara de flujo a través de un catéter cuya punta está localizada 0,5 mm aguas arriba de la base de la región de enfoque; e
- iii) inyectar el aire, si está presente, y la fase acuosa en la cámara de flujo a través de dicho catéter, en donde la fase acuosa se inyecta primero a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ y después se reduce a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, mientras que la fase oleaginoso se mantiene a 3,5 mL/min, de tal modo que la tensión superficial entre la fase acuosa y la oleaginoso hace que el chorro de agua se rompa en gotas del tamaño de microlitros que comprenden el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial; y

b) dicho método opcionalmente comprende además las etapas de:

- iv) recolectar el flujo de salida de la cámara de flujo;
- v) centrifugar el flujo de salida para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial de la fase oleaginoso;
- vi) eliminar el sobrenadante de la fase oleaginoso del biomaterial recubierto conformalmente y del material de recubrimiento libre de biomaterial;
- vii) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en una composición que comprende hexano;
- viii) centrifugar la mezcla de etapa vii) para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial del hexano;
- ix) eliminar el sobrenadante de hexano;
- x) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en una composición que comprende hexano y un tampón (sin Ca^{2+} y Mg^{2+});
- xi) centrifugar la mezcla de la etapa x) para separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial del hexano y tampón (sin Ca^{2+} y Mg^{2+});
- xii) eliminar el sobrenadante de hexano/tampón; y
- xiii) resuspender el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial en tampón que contiene Ca^{2+} y Mg^{2+} ; y

c) dicho método opcionalmente comprende además las etapas de:

- xiv) estratificar las disoluciones para formar un gradiente de densidad capaz de separar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial;
- xv) aplicar el biomaterial recubierto conformalmente y el material de recubrimiento libre de biomaterial al gradiente de densidad;
- xvi) centrifugar el gradiente de densidad para separar el biomaterial recubierto conformalmente del material de recubrimiento libre de biomaterial; y
- xvii) eliminar el sobrenadante que contiene el material de recubrimiento libre de biomaterial.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- a) más del 95% del biomaterial recubierto conformalmente es purificado del material de recubrimiento libre de biomaterial;
- b) el recubrimiento conformal alrededor del biomaterial oscila entre 10-20 μm de espesor; y

c) más del 90% del biomaterial introducido en el dispositivo de recubrimiento es recubierto conformalmente.

12. Un biomaterial recubierto conformalmente mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho biomaterial comprende células o agrupaciones celulares.

5 **13.** El biomaterial recubierto conformalmente de la reivindicación 12, en donde dicho biomaterial comprende células de isleta o agrupaciones de células de isleta.

10 **14.** Un biomaterial para uso en el tratamiento de un trastorno en un paciente, en donde el biomaterial comprende células o agrupaciones celulares, en donde el biomaterial debe implantarse en el paciente y donde el biomaterial ha sido recubierto conformalmente mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

15 **15.** El biomaterial para uso según la reivindicación 14, en donde dicho trastorno es diabetes y dicho biomaterial recubierto conformalmente comprende células de isleta o agrupaciones de células de isleta.

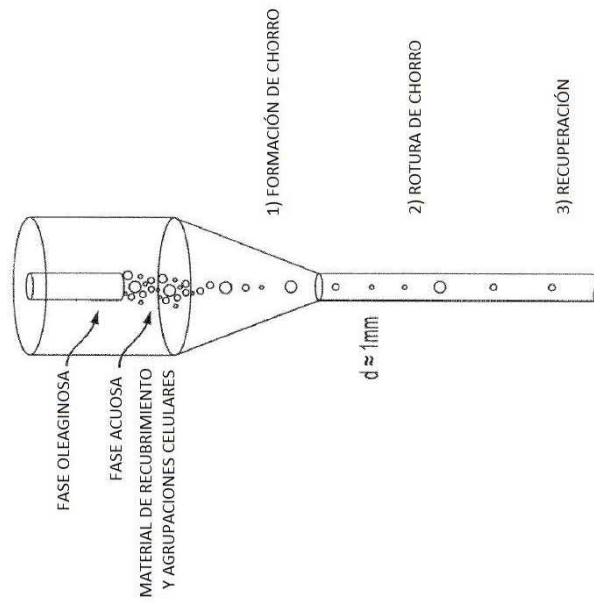


FIG. 1B

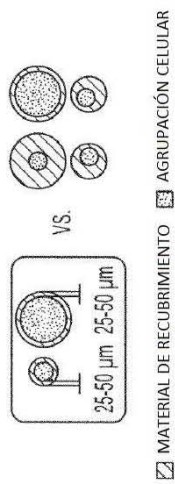


FIG. 1A

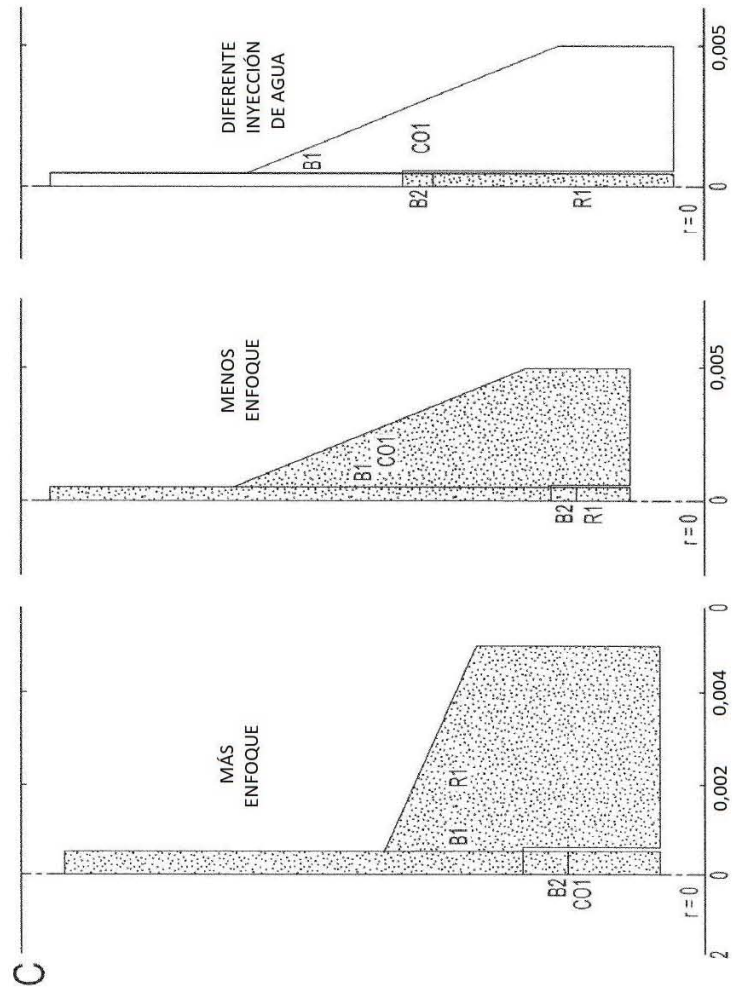


FIG.1
(CONT.)

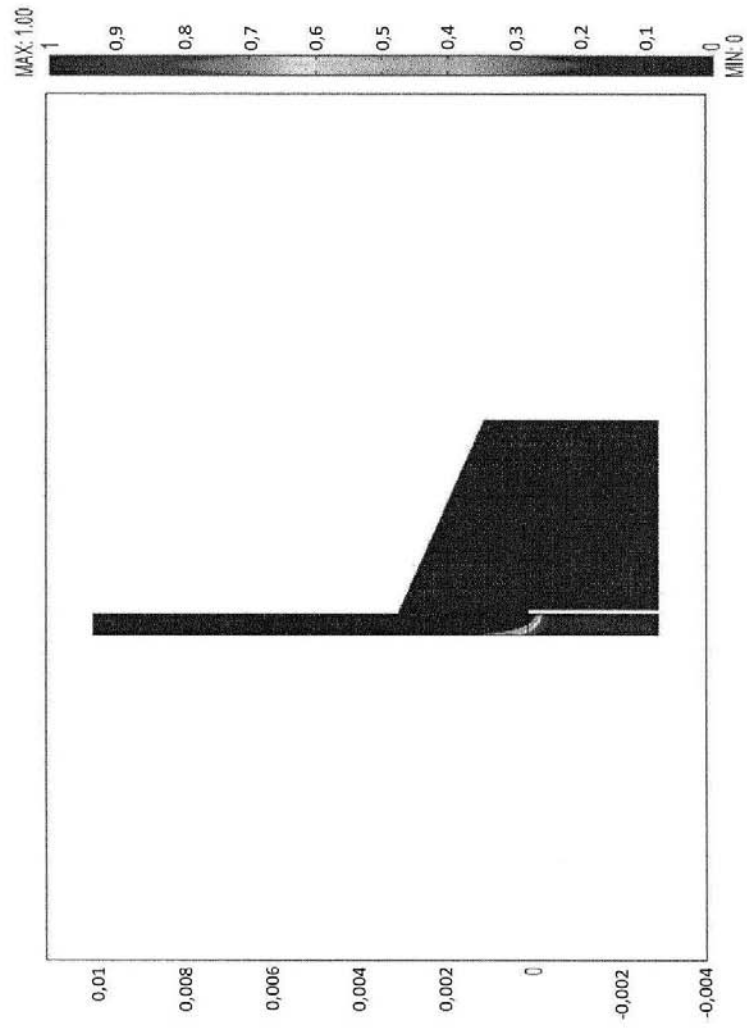


FIG. 2A

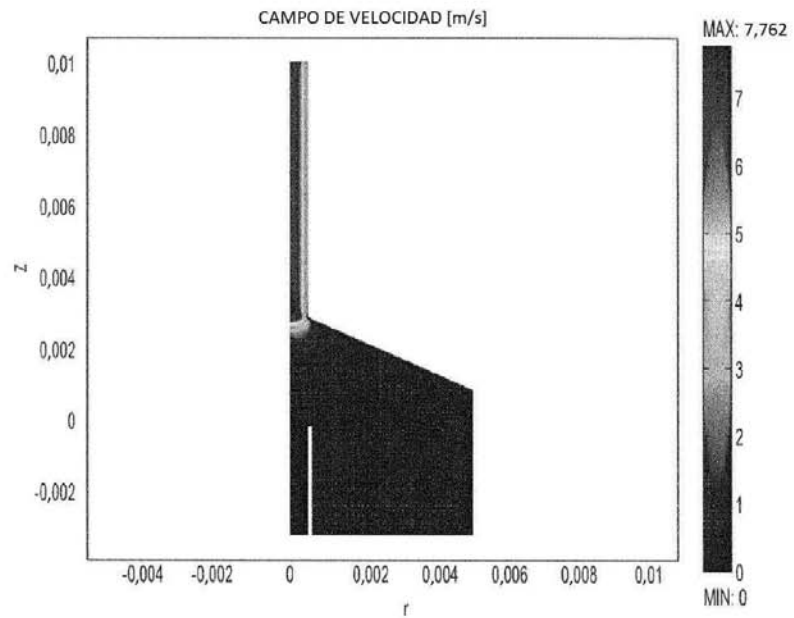


FIG. 2B

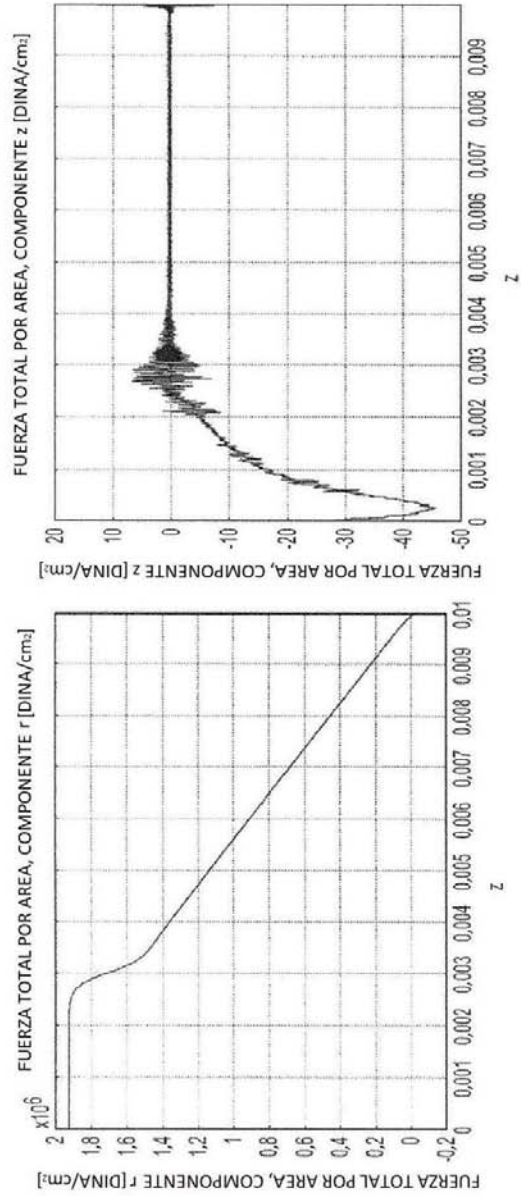


FIG. 2C

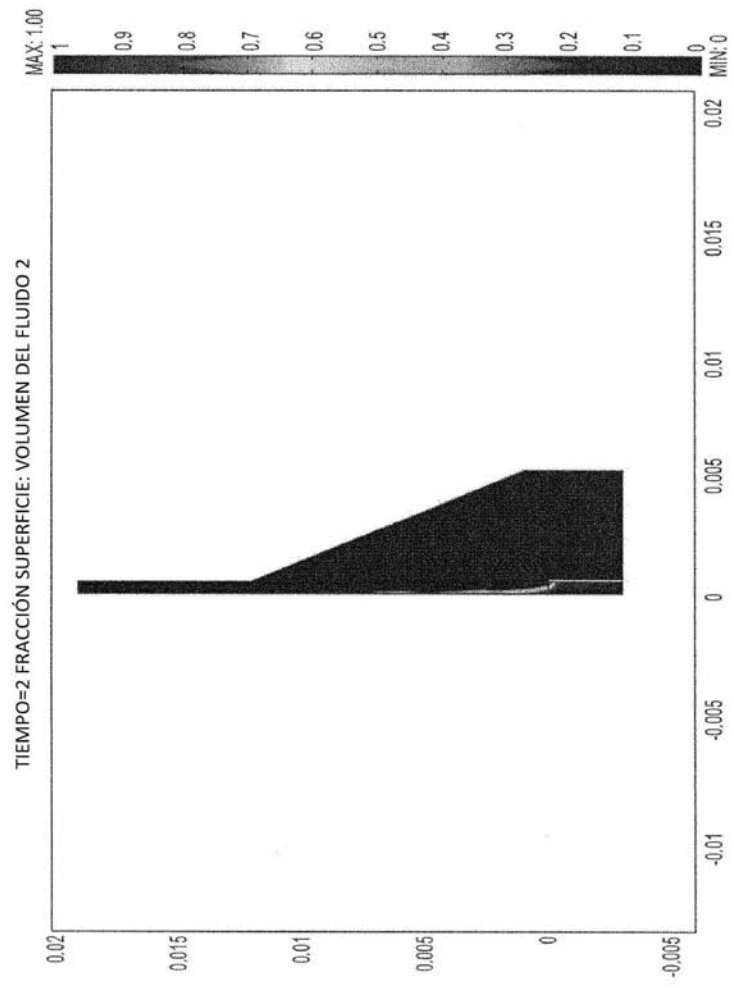


FIG. 3A

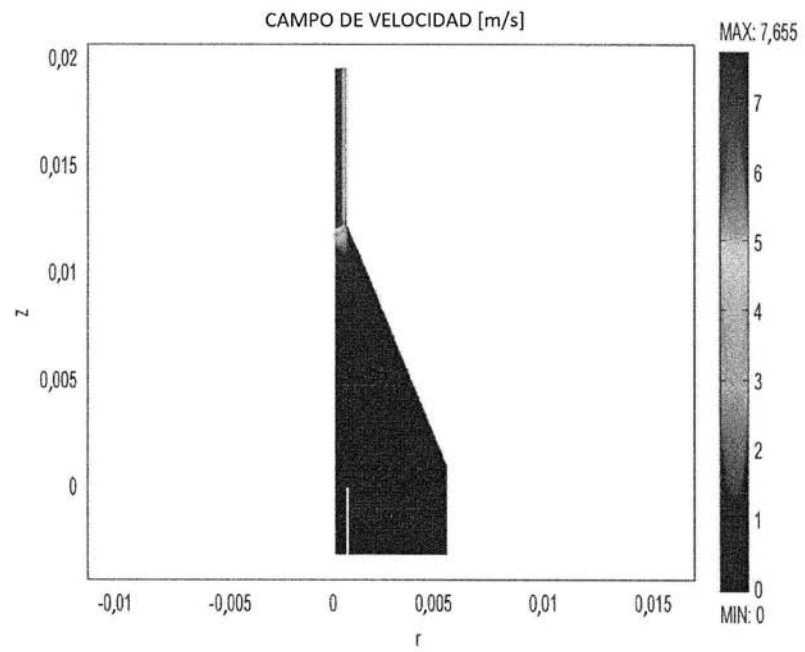


FIG. 3B

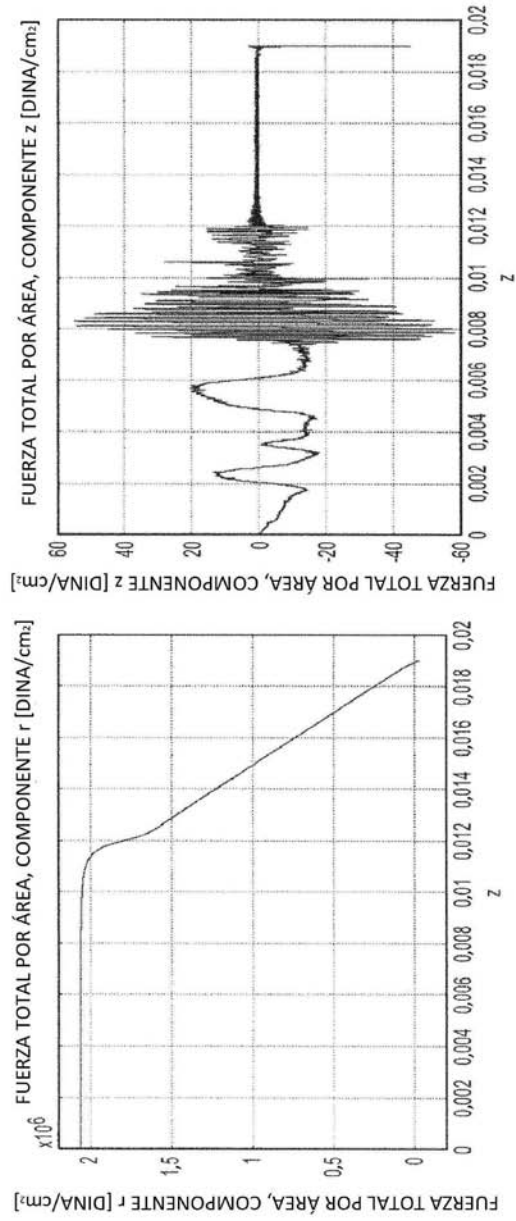


FIG. 3C

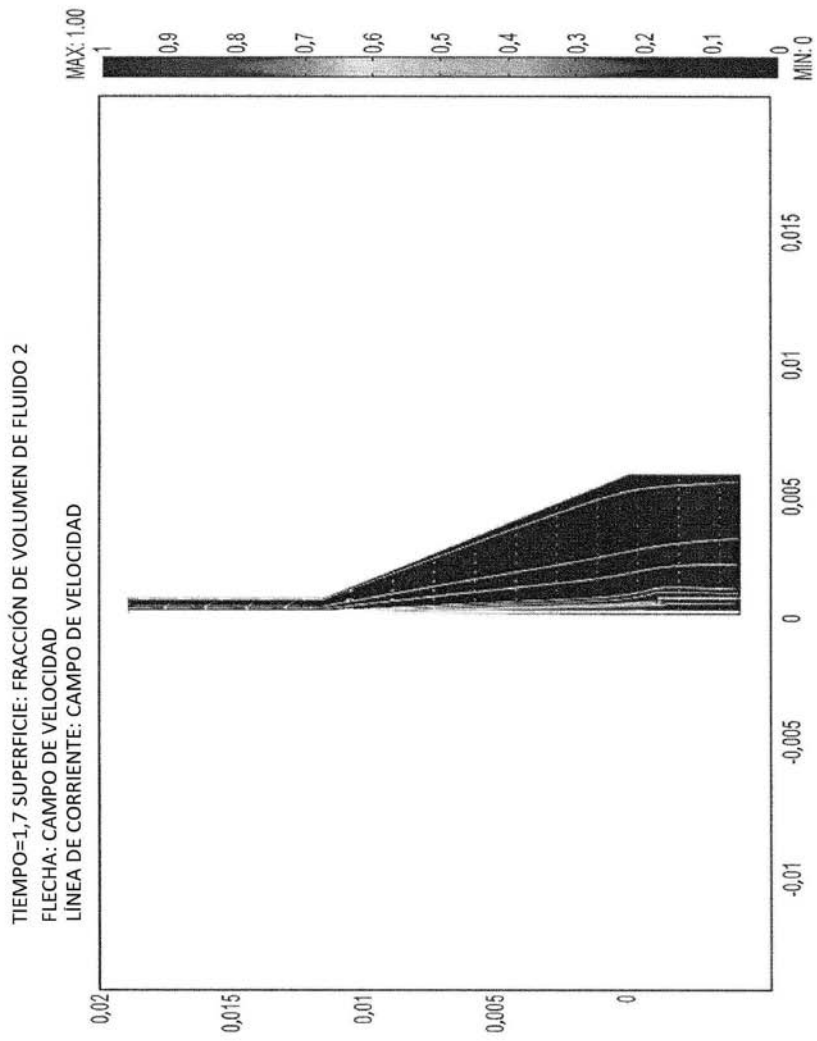


FIG. 4A

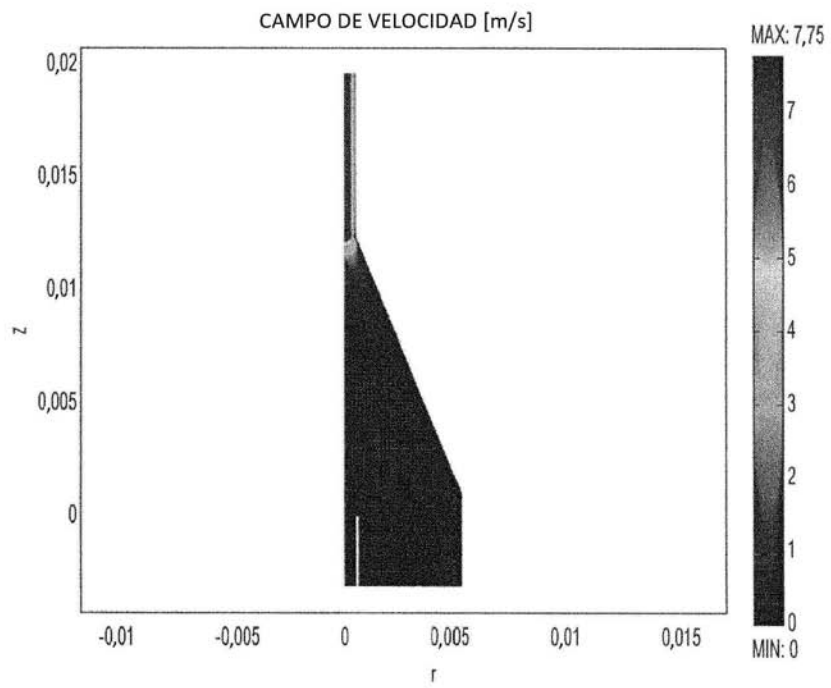


FIG. 4B

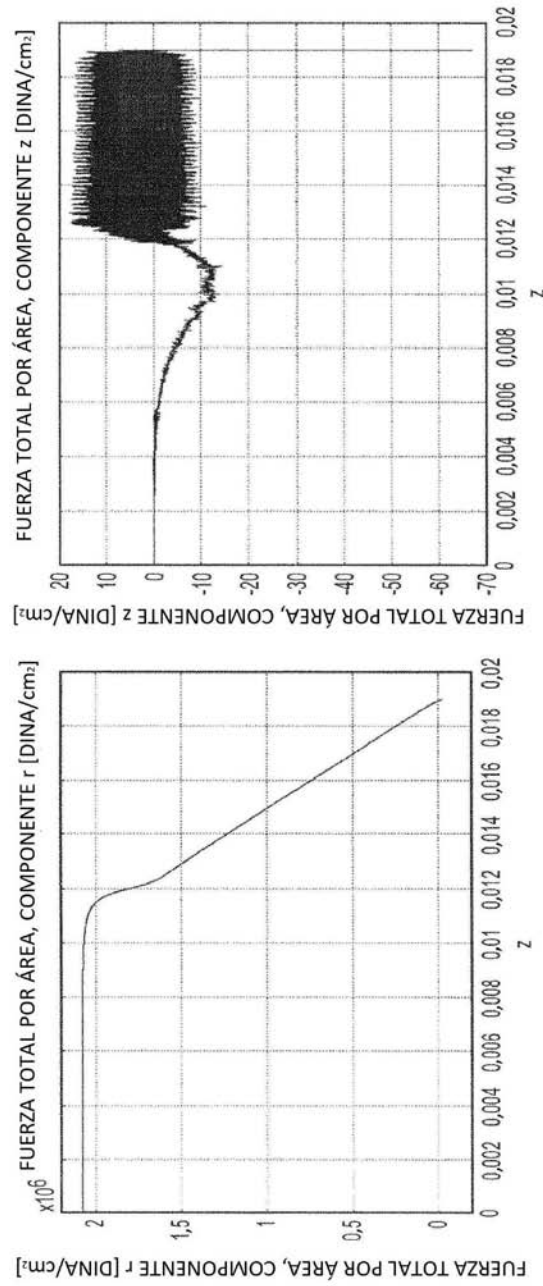


FIG. 4C

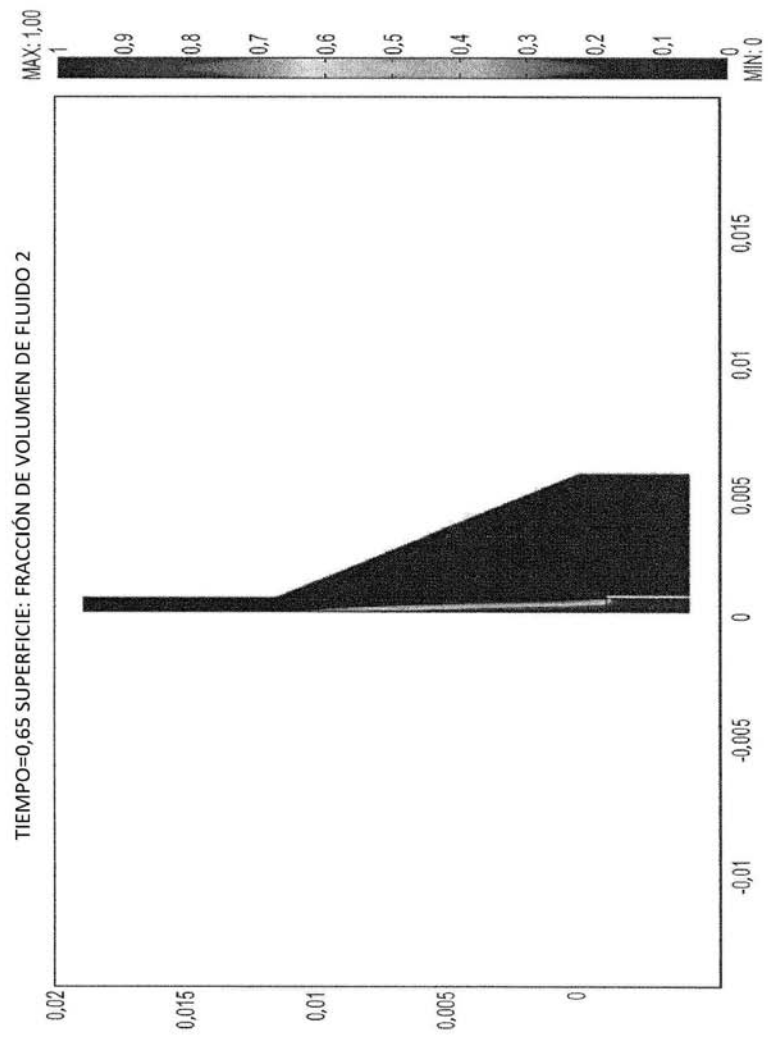


FIG. 5A

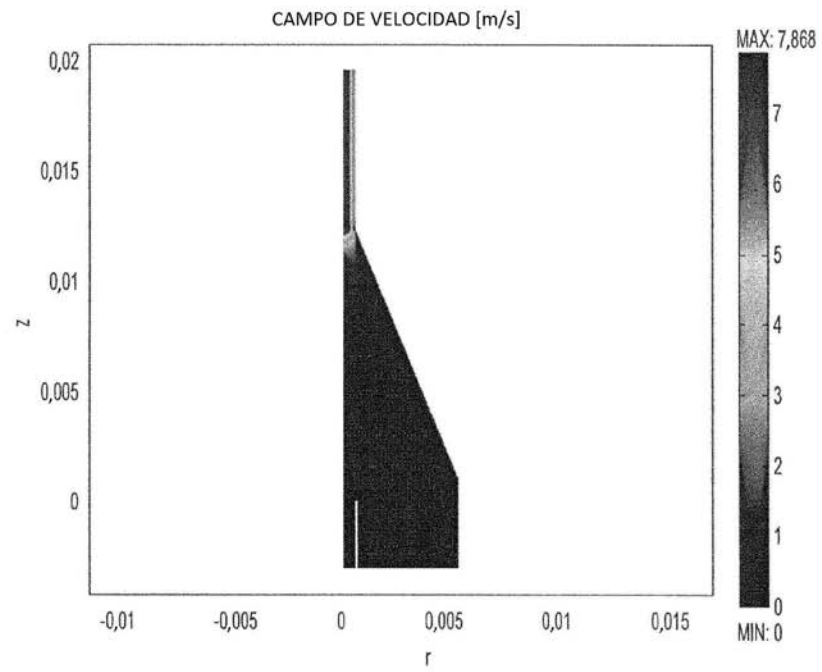


FIG. 5B

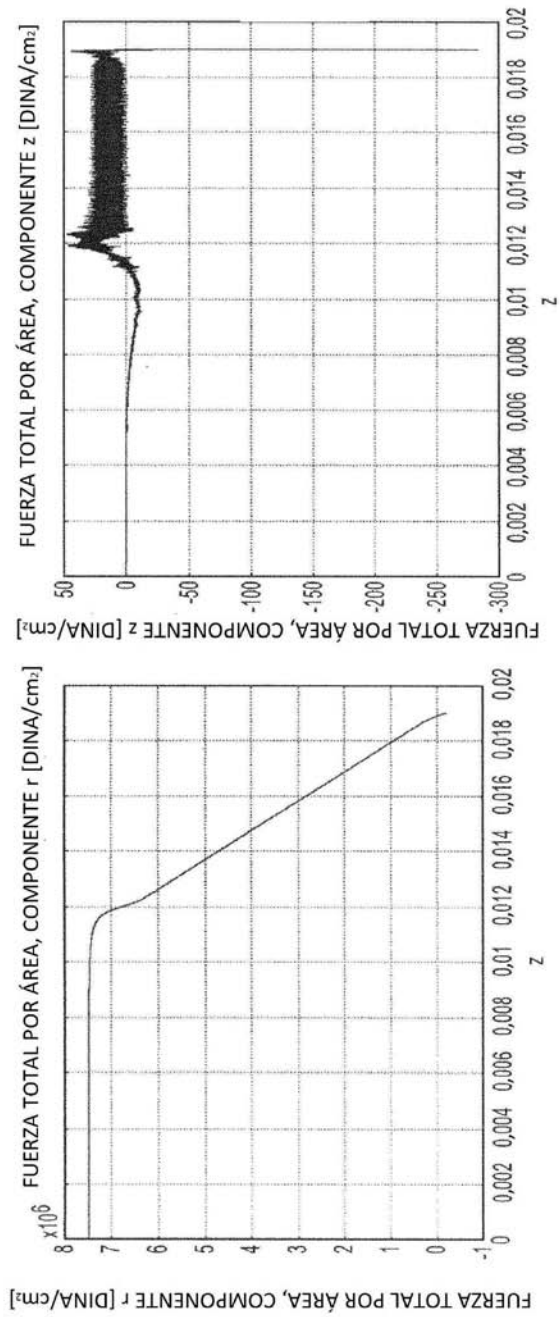


FIG. 5C

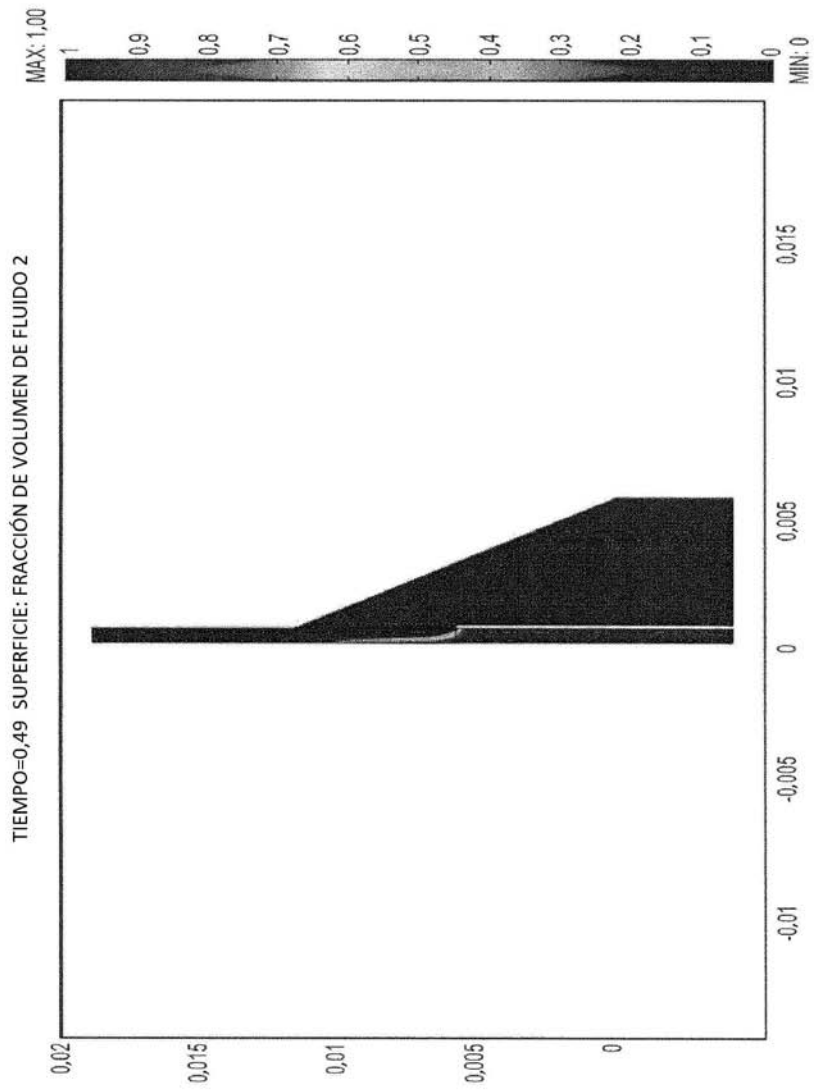


FIG. 6A

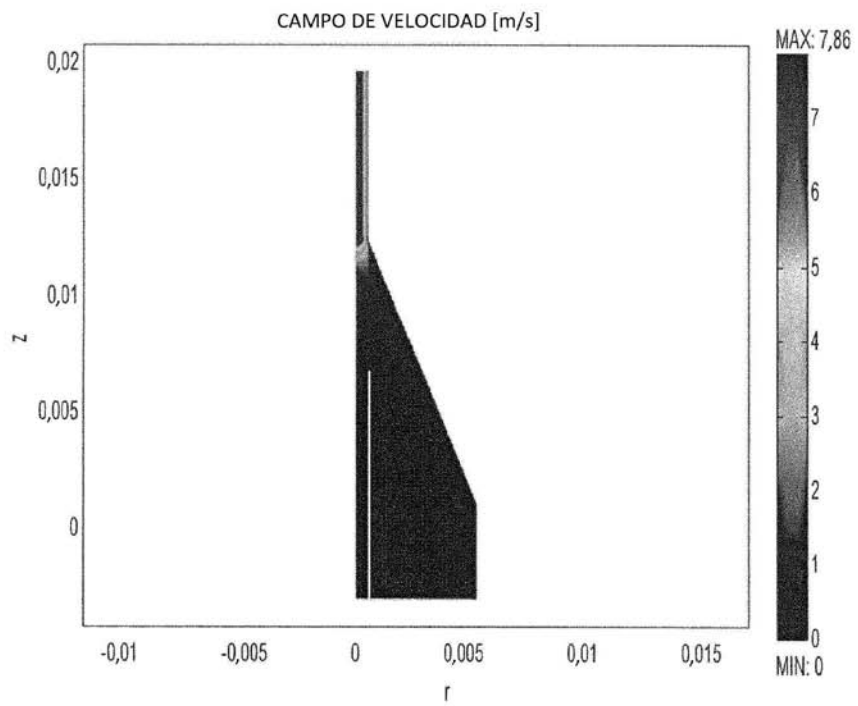


FIG. 6B

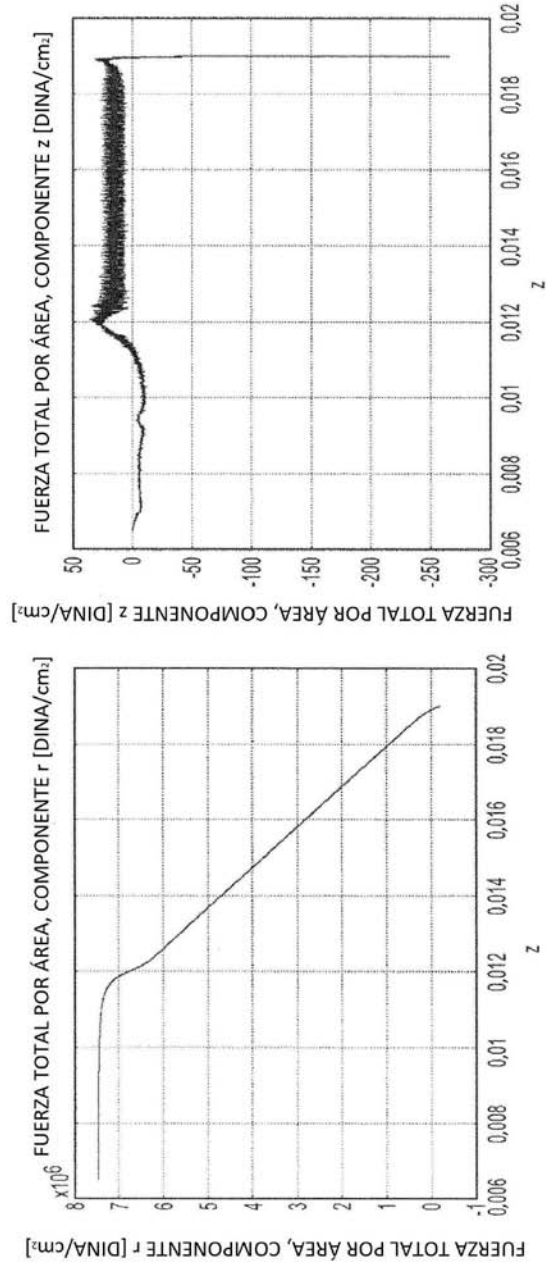


FIG. 6C

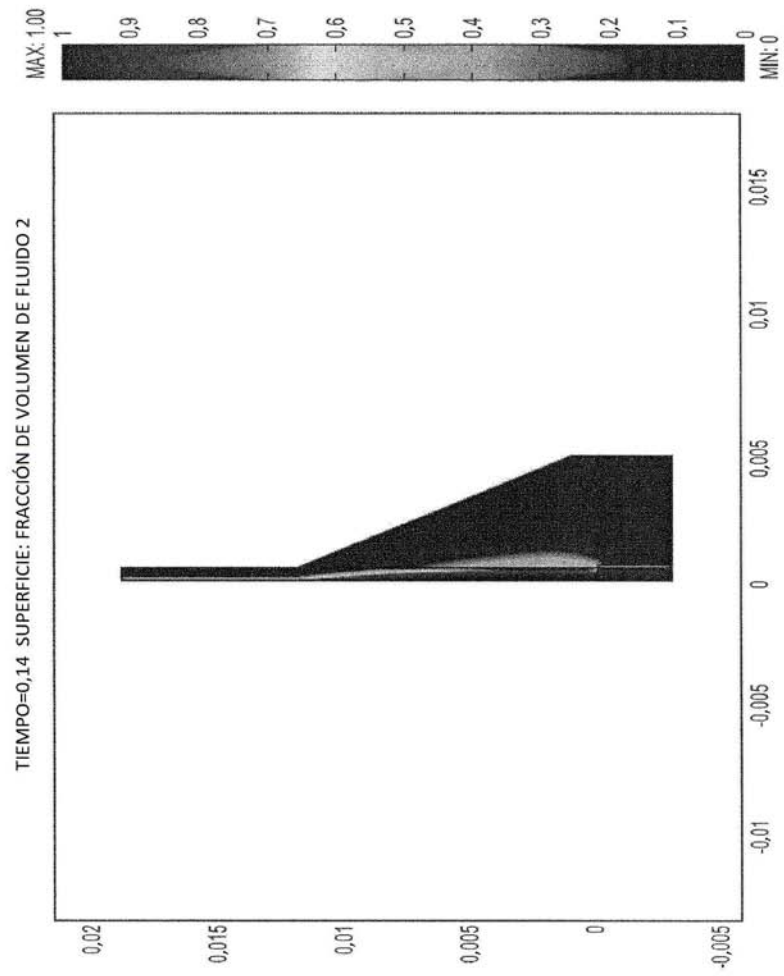


FIG. 7A

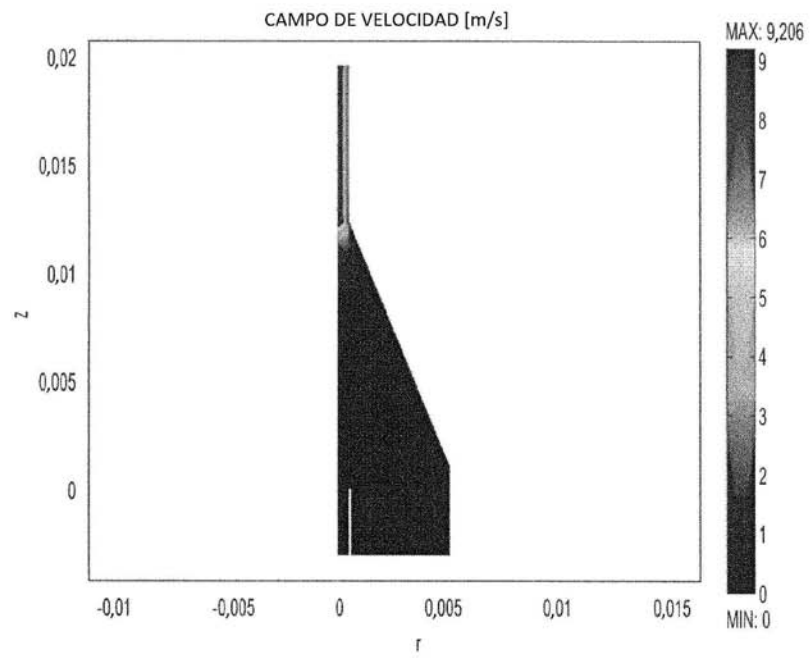


FIG. 7B

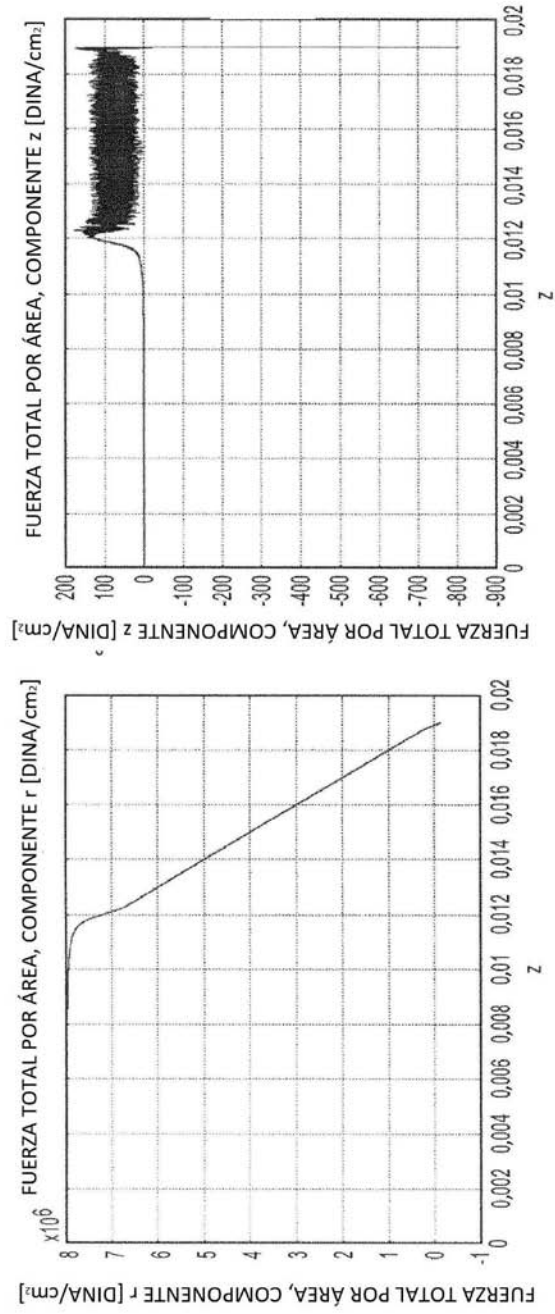


FIG. 7C

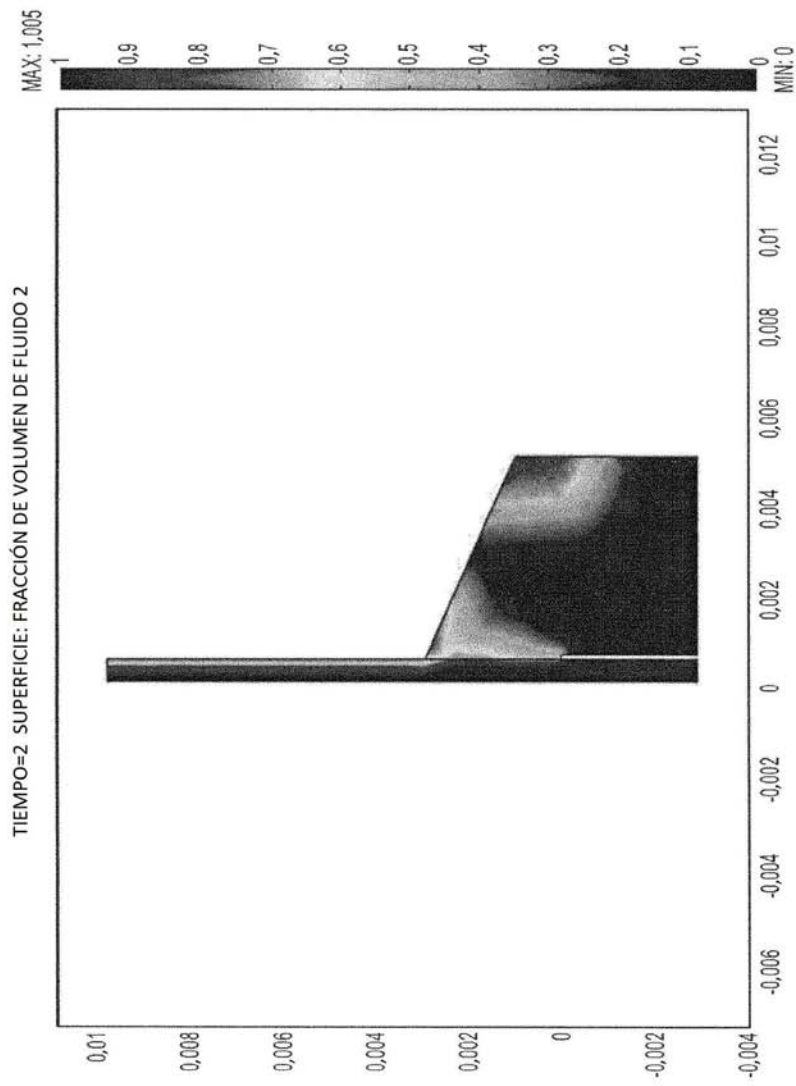


FIG. 8A

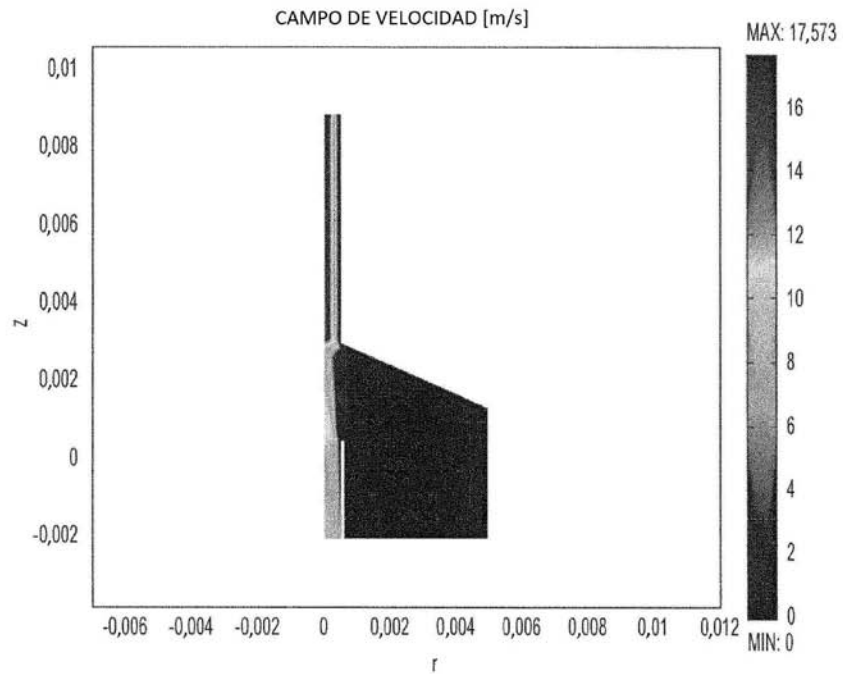


FIG. 8B

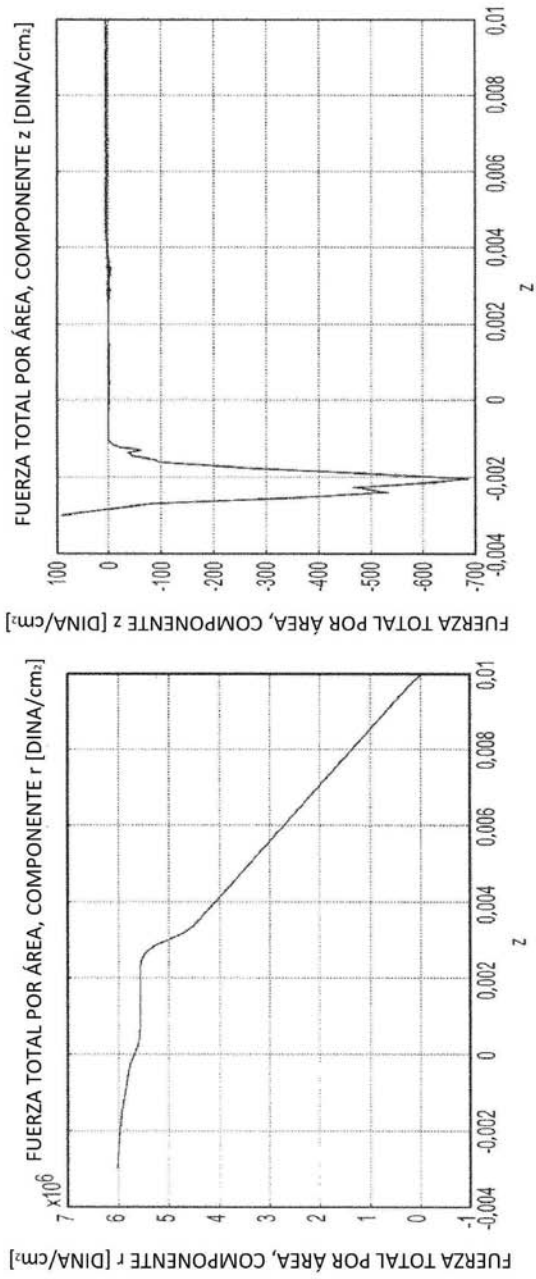


FIG. 8C

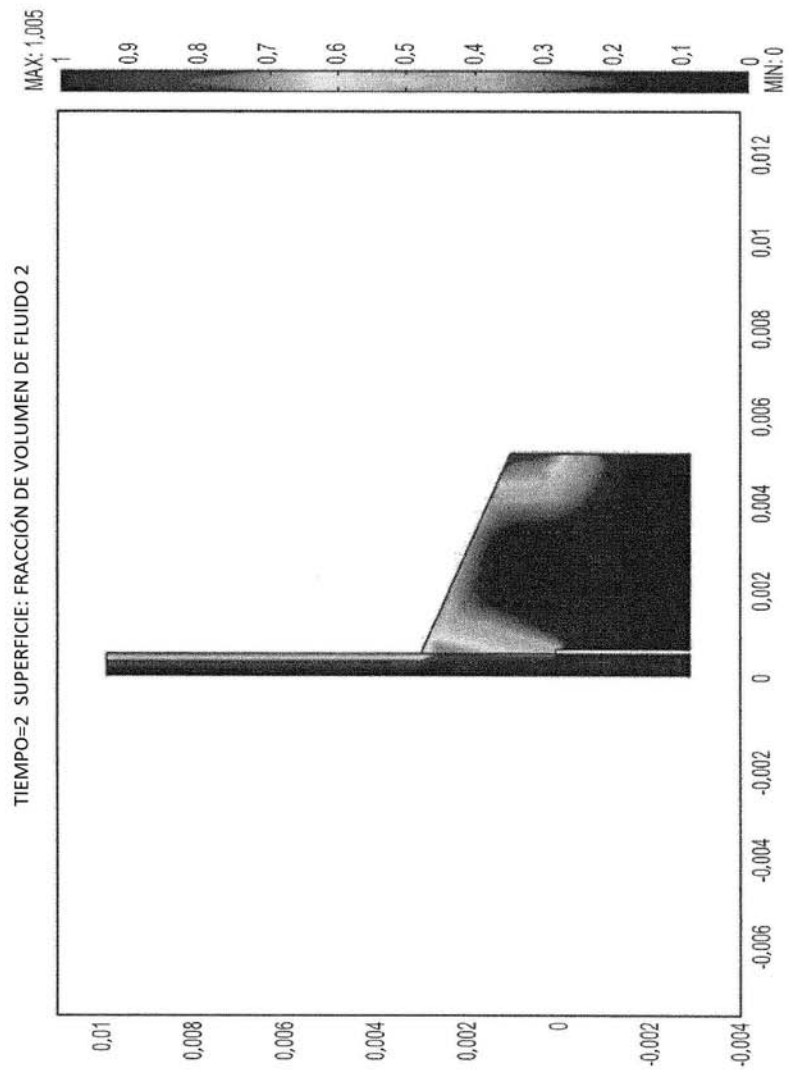


FIG. 9A

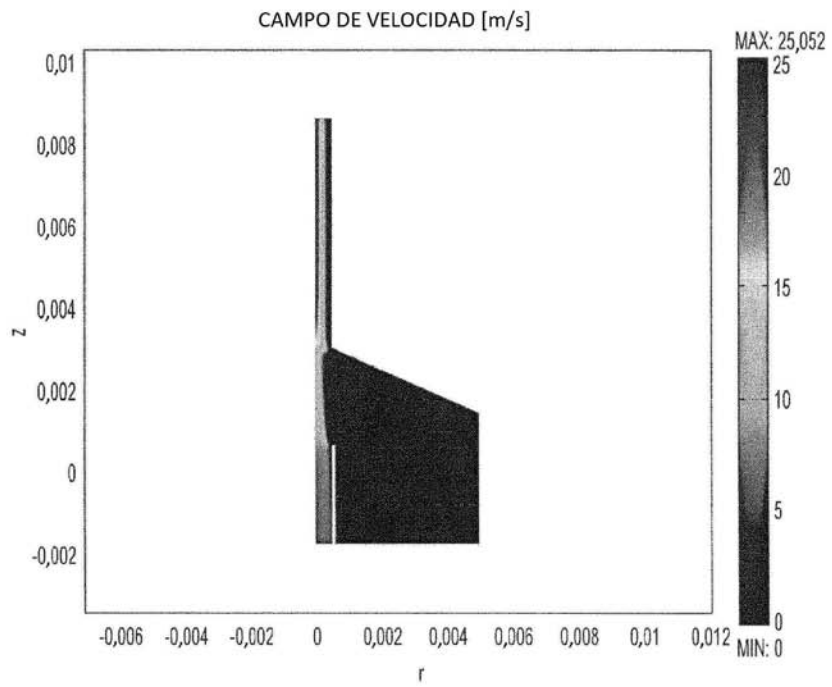


FIG. 9B

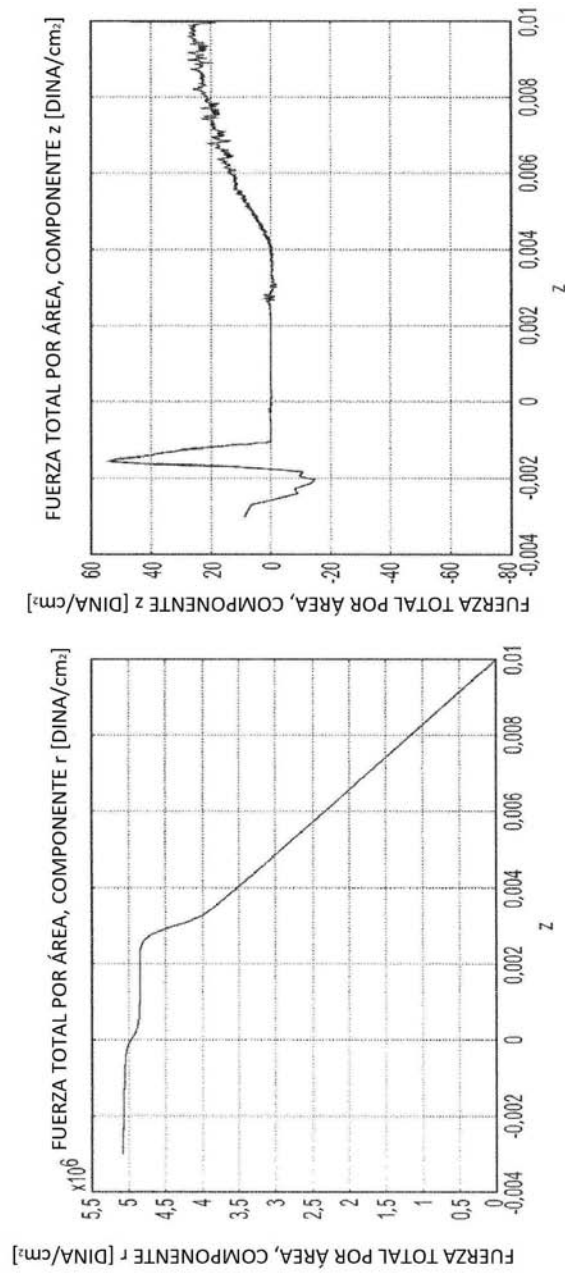


FIG. 9C

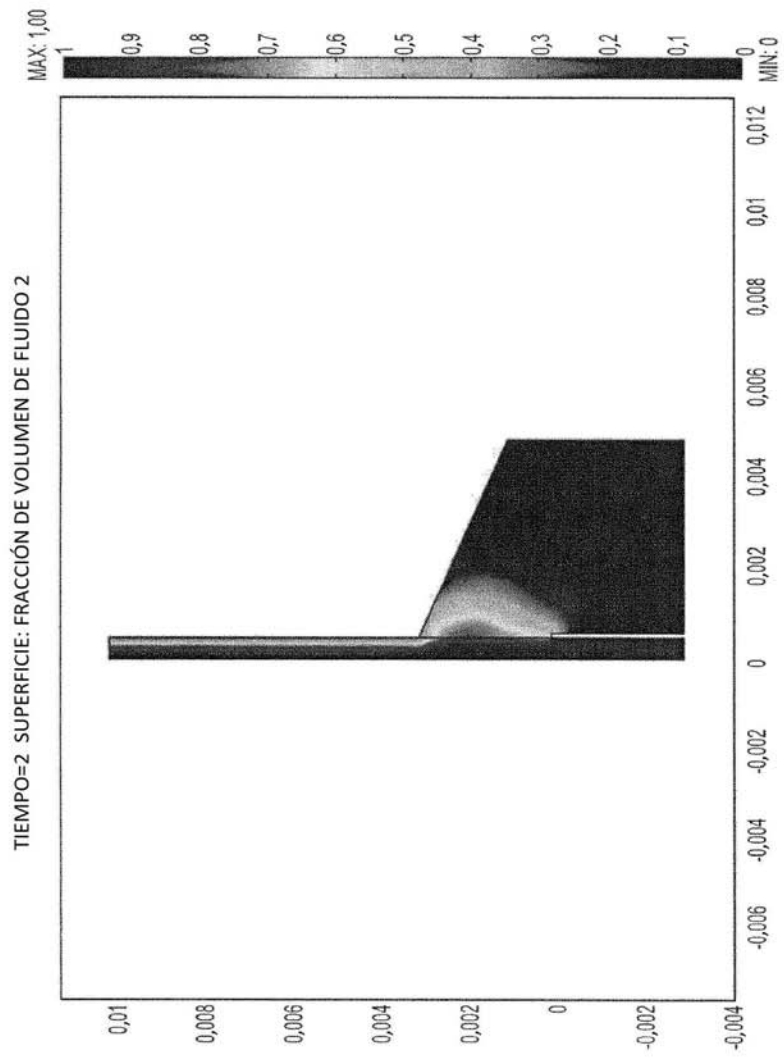


FIG. 10A

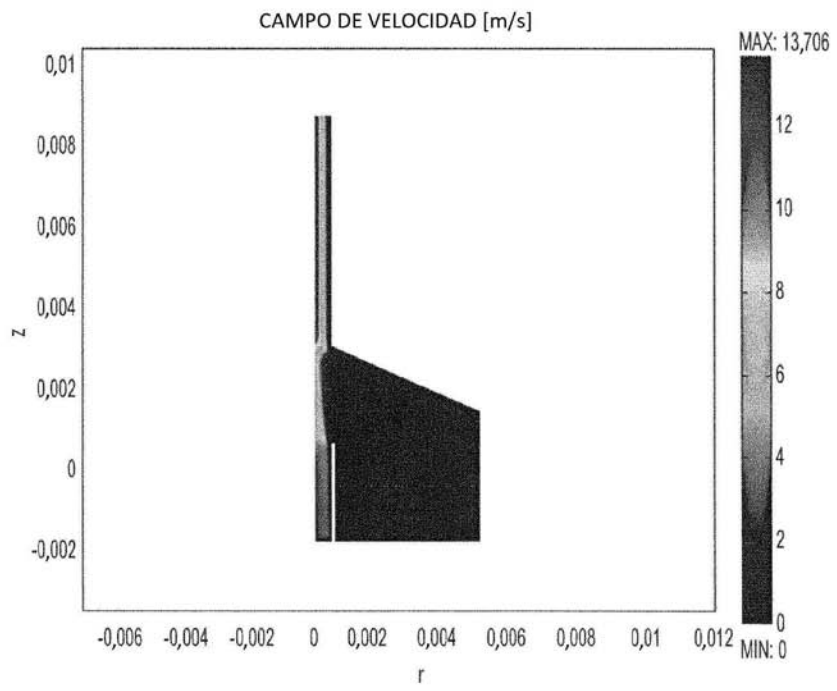


FIG. 10B

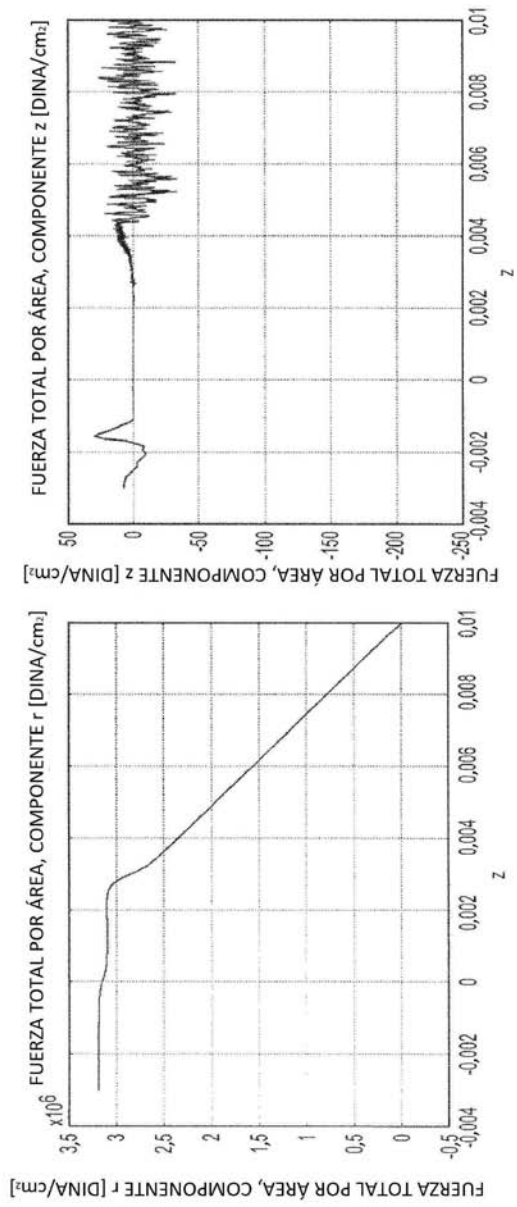


FIG. 10C

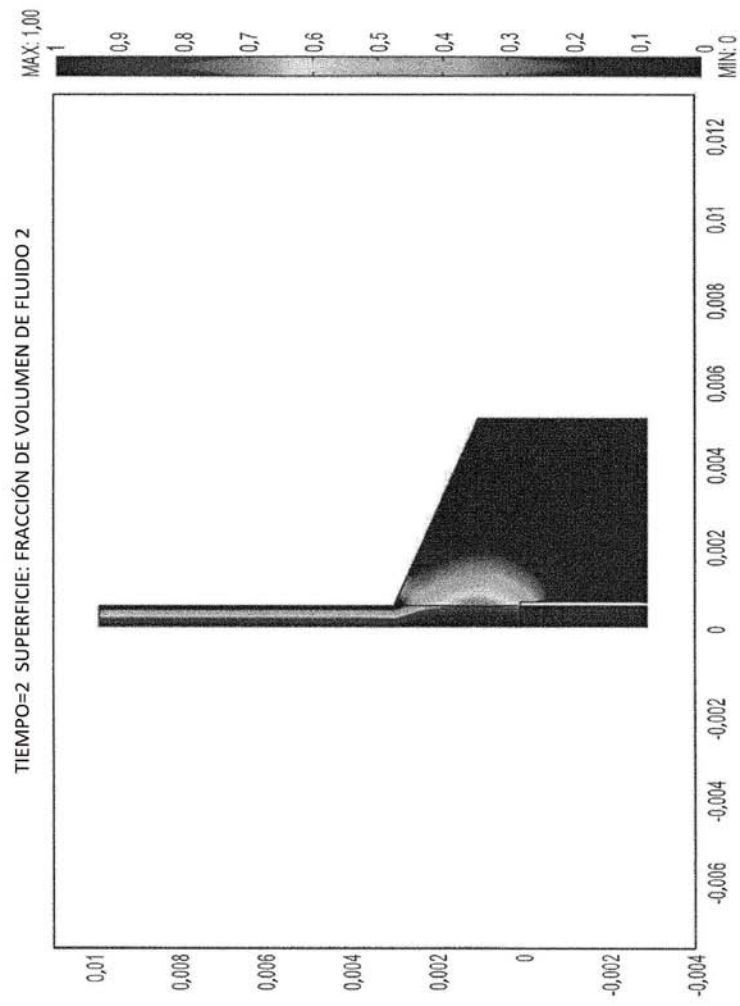


FIG. 11A

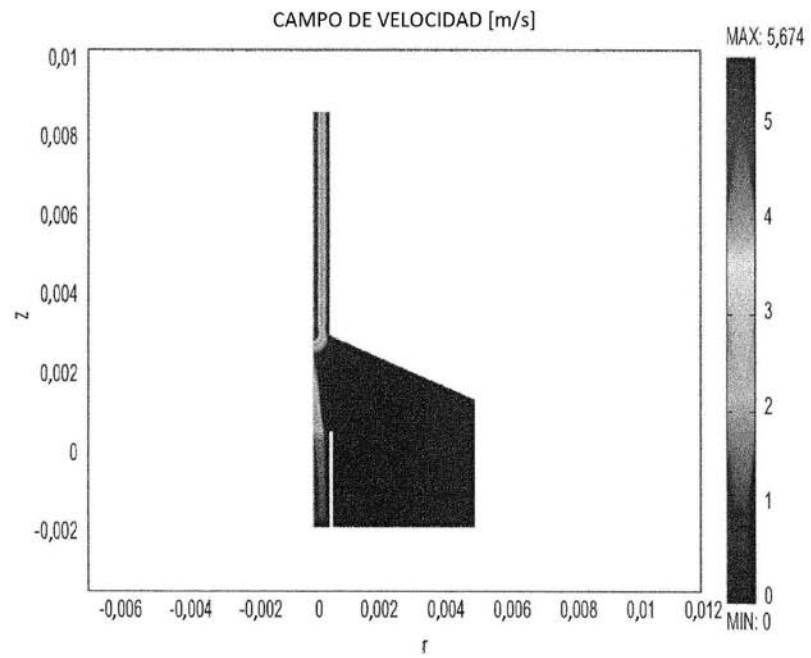


FIG. 11B

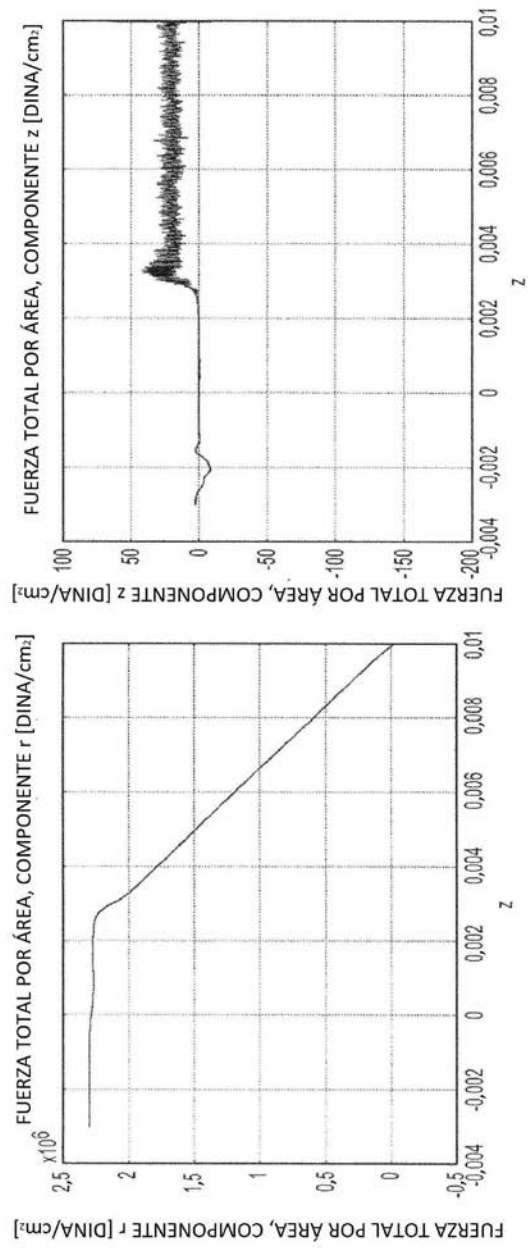
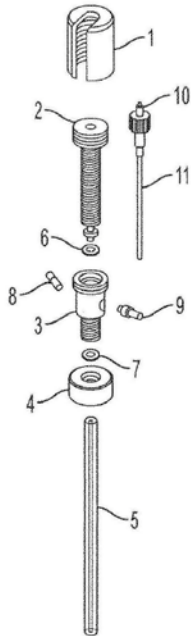


FIG. 11C



DISPOSITIVO DE ENCAPSULACIÓN		
OBJ. Nº	UD.	DESCRIPCIÓN
1	1	TAPÓN DE CIERRE
2	1	CÁMARA INTERIOR
3	1	CÁMARA PRINCIPAL
4	1	ANILLO DE RETENCIÓN TUBO VIDRIO
5	1	VIDRIO BOROSILICATO TERMORESISTENTE 6 mm D.E. X 1,2 mm D.I., 12" LONGITUD
6	1	JUNTA 7/32" X 11/32"
7	1	JUNTA 1/4" X 3/8"
8	1	CONECTOR, TUBO 3/32" (2,4 mm) D.I.
9	1	CONECTOR, TUBO 3/32" (2,4 mm) D.I.
10	1	ANILLA CIERRE INTEGRAL LUER MACHO PARA CONECTOR SERIE 200, TUBO 3/32" (2,4 mm) D.I.
11	1	CATÉTER SURFLASH IV D.E. 1,70 mm

FIG. 12A

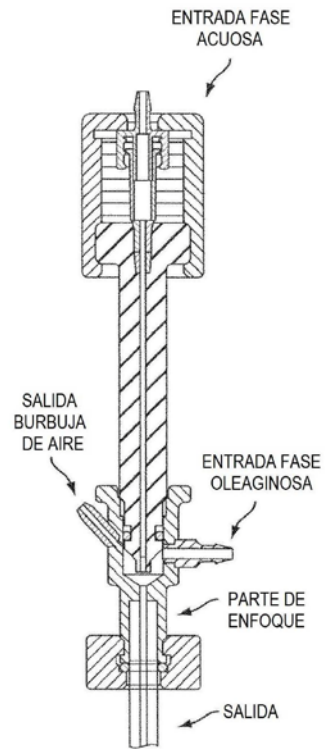


FIG. 12B

1bis) MARCADO DE PEG-dVS CON FLUORESCEINAMINA (1-3 GRUPOS dVS)

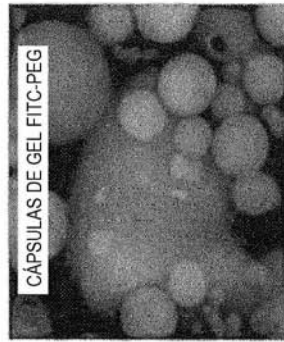
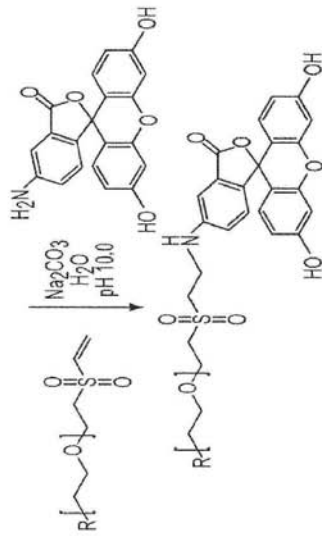


FIG. 14

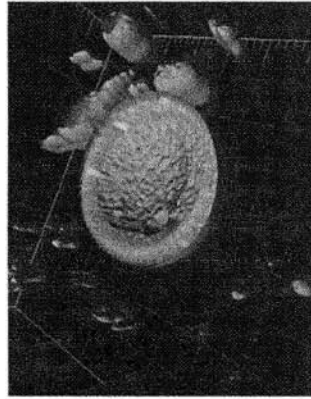


FIG. 15B

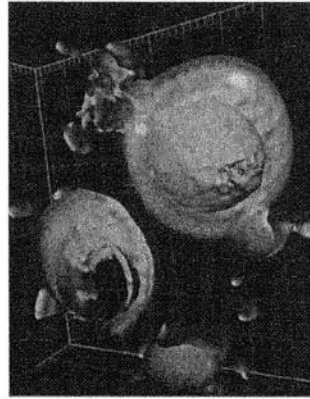


FIG. 15D

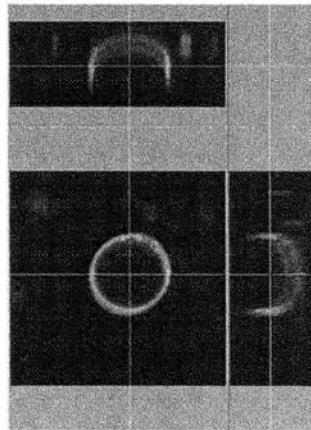


FIG. 15A

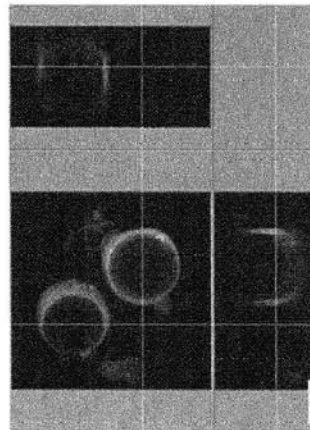


FIG. 15C

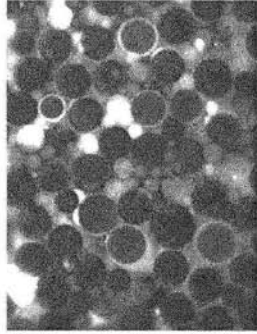


FIG. 16C

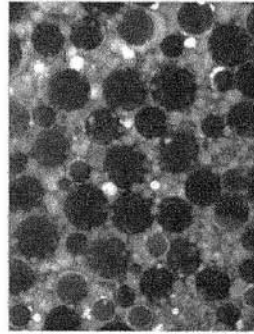


FIG. 16F



FIG. 16B

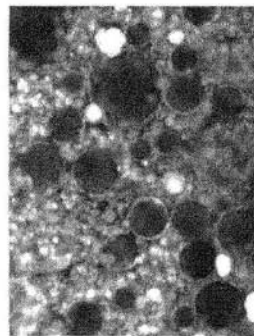


FIG. 16E

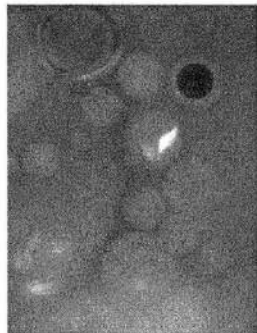


FIG. 16A

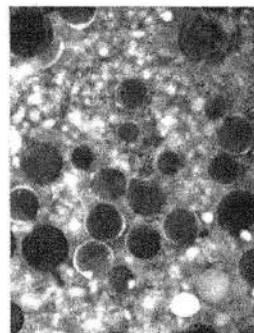


FIG. 16D

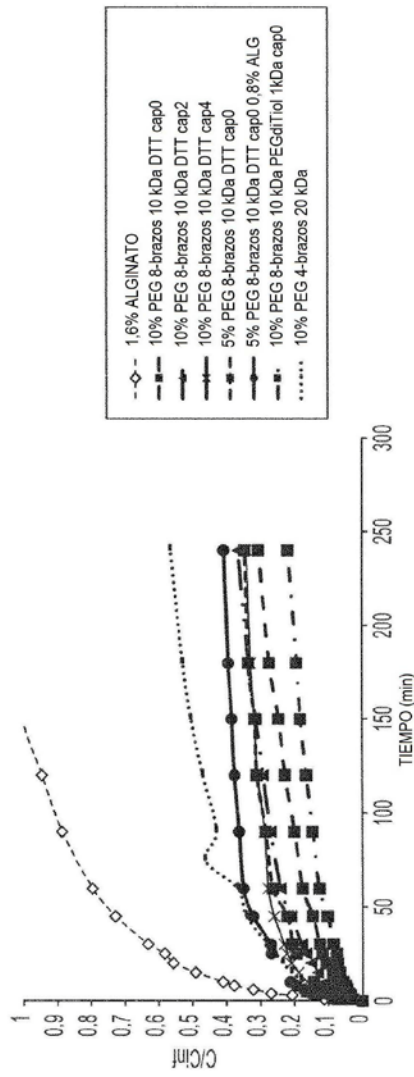


FIG. 17A

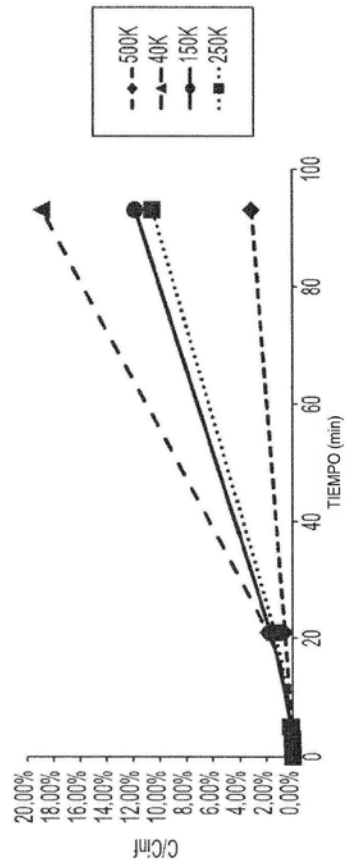


FIG. 17B

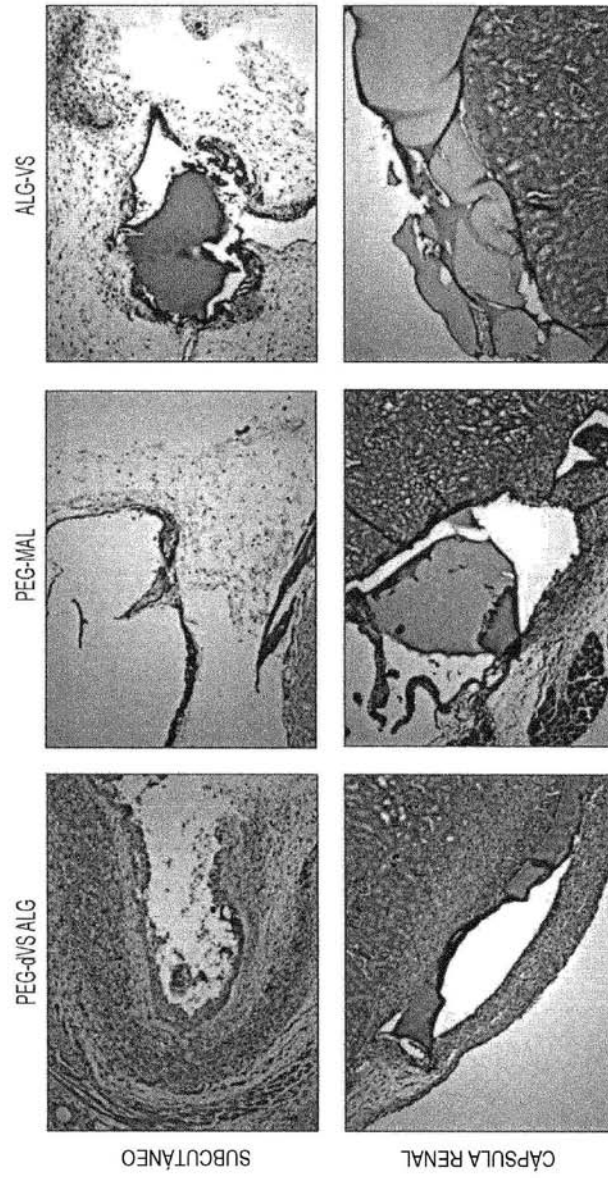


FIG. 18

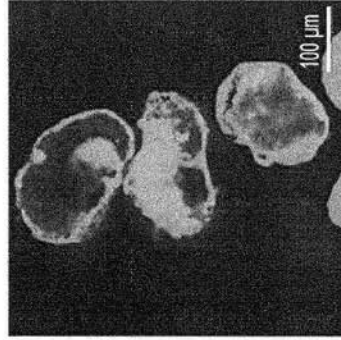


FIG. 19C

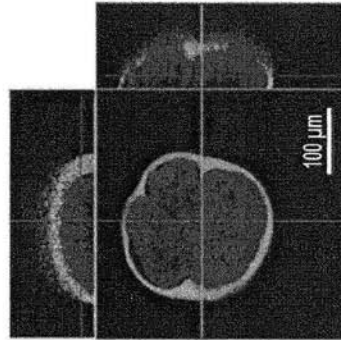


FIG. 19B

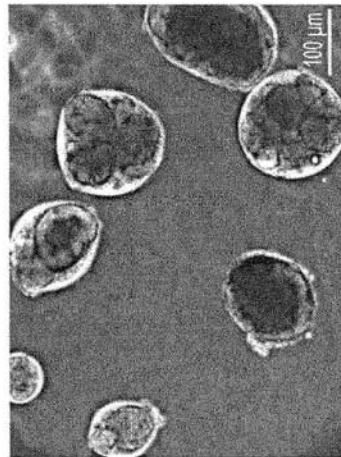


FIG. 19A

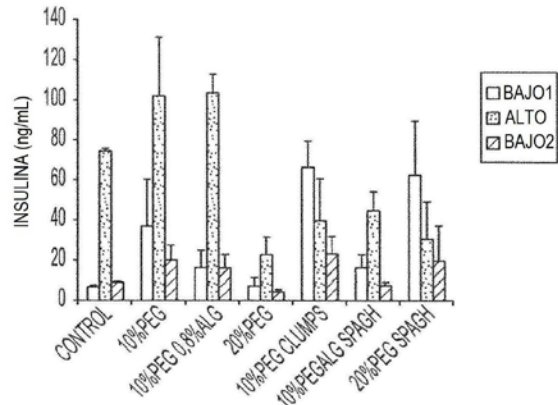


FIG. 20A

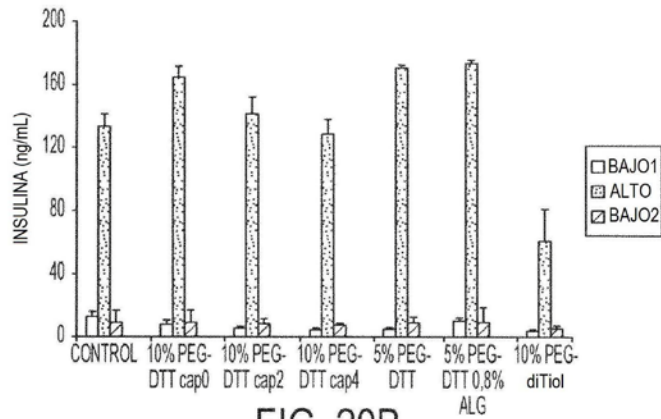


FIG. 20B

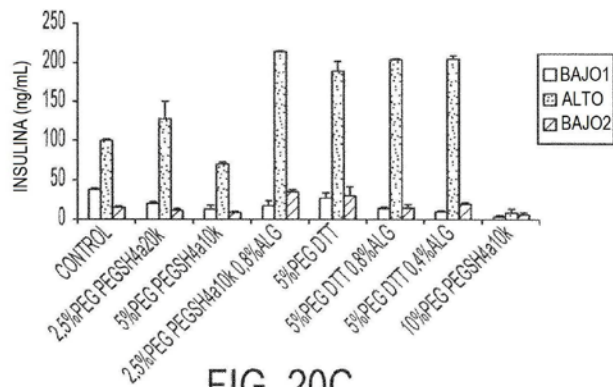


FIG. 20C

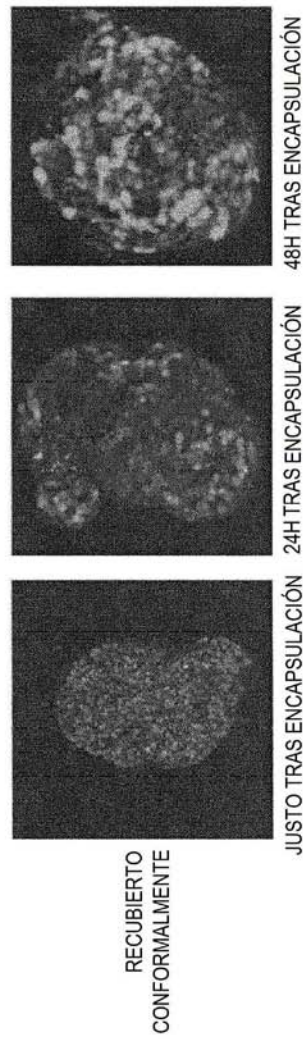


FIG. 21A

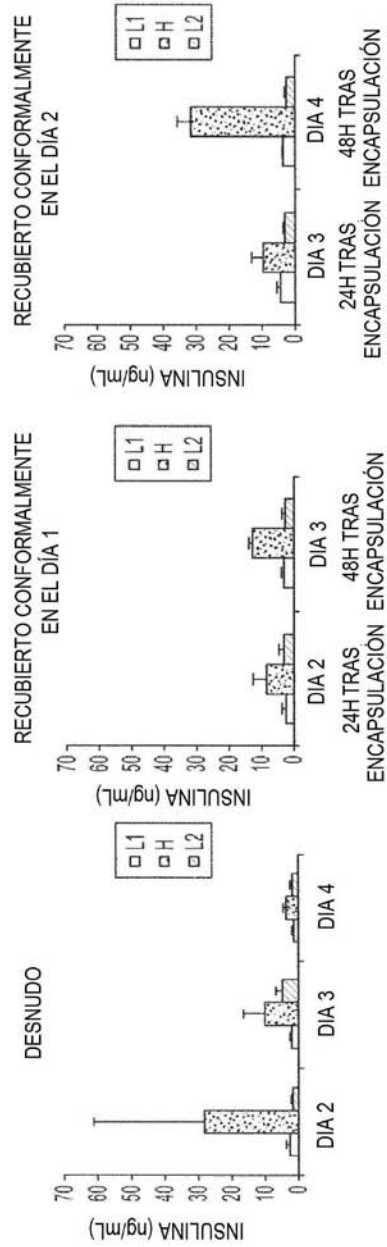


FIG. 21B

FIG. 21C

FIG. 21D

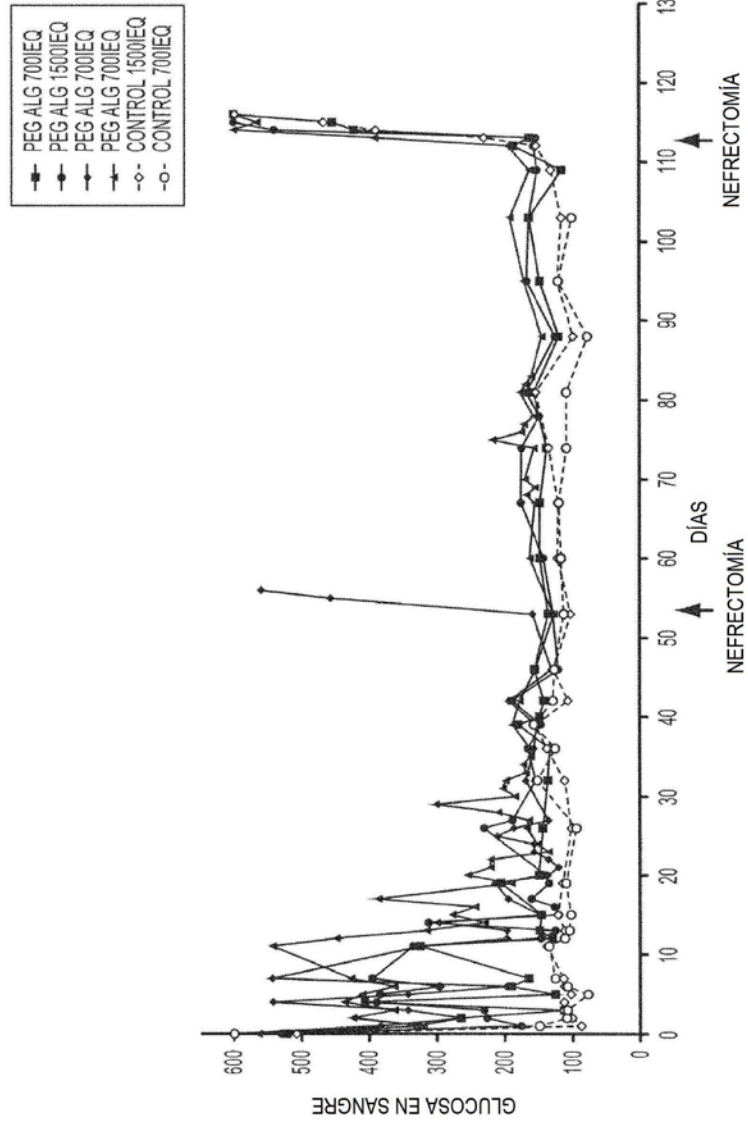


FIG. 22

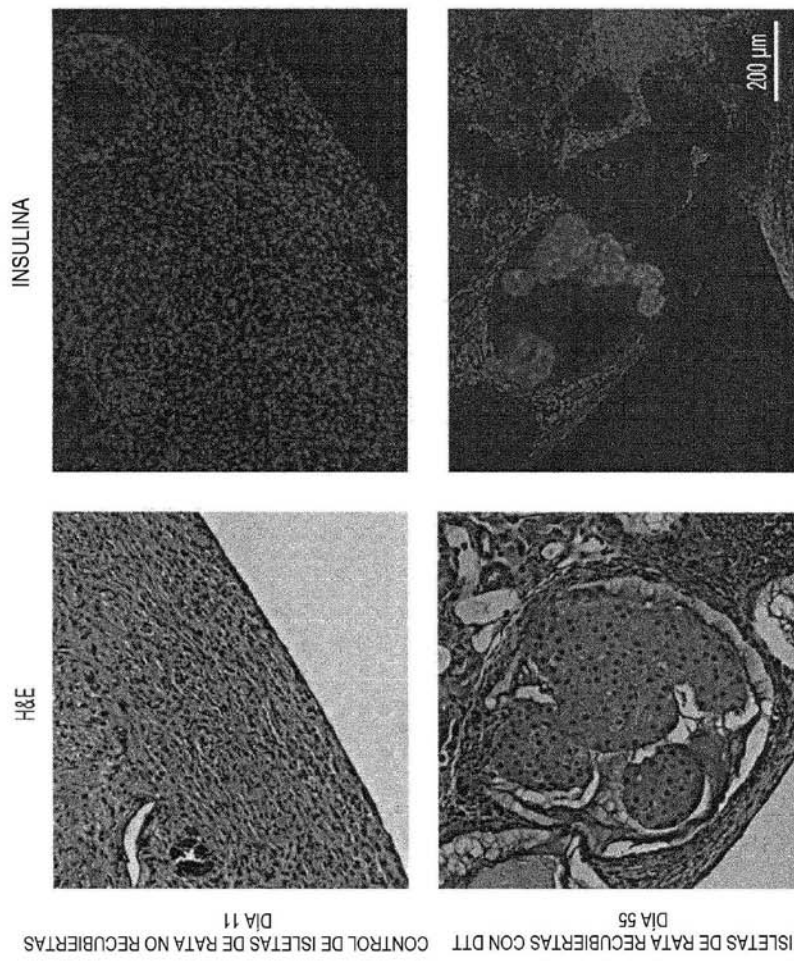


FIG. 23