

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 613**

51 Int. Cl.:

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2013 PCT/US2013/023802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2013 E 13744385 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2809782**

54 Título: **Método mejorado para la fabricación de macroperlitas**

30 Prioridad:

31.01.2012 US 201261592949 P

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

22.12.2017

73 Titular/es:

**THE ROGOSIN INSTITUTE, INC. (100.0%)
505 East 70th Street
New York, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**GAZDA, LAWRENCE;
LARAMORE, MELISSA;
HAMILTON, TIMOTHY y
SMITH, BARRY**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 647 613 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

Método mejorado para la fabricación de macroperlitas

5 Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere a métodos mejorados para fabricar una composición química que comprende células, en particular células secretoras, atrapadas en una perlita permeable o en otra estructura, que a continuación es recubierta con agarosa. La perlita puede comprender o consistir en agarosa. La agarosa Litex es especialmente preferida para las perlitas.

Antecedentes y técnica anterior

[0002] La elaboración de composiciones químicas que contienen células viables, atrapadas en un medio permeable, ha demostrado ser importante en diversos campos, tales como la terapia de la diabetes, el tratamiento del cáncer y el mantenimiento de las células madre. A este respecto, véase, por ejemplo, la Reedición 40, 555; las Patentes de EE.UU. nº 7.838.291; 6.818.230; 6.808.705; 6.303.151; 6.224.912; 5.888.497; y 5.643.569, y la solicitud de patente publicada 2007/0071732, todas las cuales se incorporan como referencia en su totalidad.

[0003] El proceso para la elaboración de estas composiciones químicas, denominadas en lo sucesivo "encapsulados", ha sido esencialmente el mismo, independientemente del tipo de célula usada. Después del aislamiento o de la protección de las células de interés, éstas se suspenden en una solución acuosa de un agente tal como agarosa, colágeno, o combinaciones de estos, o se coloca en un material tal como una esponja de gelatina. Cuando se usan soluciones acuosas se forman perlitas semisólidas que contienen las células de interés colocando la suspensión en aceite mineral. Si se usa una esponja de gelatina, el producto que contiene las células se hace rodar hasta obtener una esfera, tras lo cual se vierte la agarosa sobre ella para formar una perlita.

[0004] Después, las perlitas se ponen en contacto con una solución de agarosa, por ejemplo, en una cuchara de Teflon. Las perlitas ruedan en la mezcla, para formar lo que se denomina en la materia y se menciona más arriba macroperlitas recubiertas de agarosa.

[0005] Las enseñanzas iniciales según se muestran, por ejemplo, en el documento RE 40.555 y en la Patente de EE.UU. nº 5.888.497 que enseñan la encapsulación de células secretoras, tales como islotes productores de insulina y células cancerosas, han estado seguidas por mejoras, incluyendo la encapsulación de células madre, según se muestra en la Patente de EE.UU. nº 7.838.291 y a través de mejoras en los materiales usados, cómo se observa, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada 2007/0071732.

[0006] Además, en el documento WO 2012/034871 se describe un proceso para la producción automática de perlitas de un principio activo con un material portador de tipo gel y con un material biológicamente activo embebido en dicho portador material.

[0007] El documento US 2007/0071732 describe la fabricación y el uso de células secretoras que contienen estructuras de perlitas recubiertas con agarosa, y el documento US 2007/0069408 notifica un proceso y un aparato para la formación de perlitas de agarosa o recubiertas con agarosa.

[0008] Por lo tanto, existe una continua necesidad de mejorar la metodología para la elaboración de estos útiles materiales.

[0009] Una mejora, que es muy deseable en este campo, es la capacidad para automatizar lo que es un proceso manual.

[0010] En el transcurso de la automatización del proceso de fabricación, los inventores han desarrollado unas herramientas especiales que facilitan el proceso de fabricación. Además, han averiguado que al finalizar el proceso a través de la colocación de las macroperlitas en un recipiente de aceite mineral con un gradiente de temperatura, se pueden producir macroperlitas con una forma más uniforme y una textura más lisa de lo que se creía posible.

[0011] Cómo se lleva esto a cabo se observará en la divulgación, que sigue.

Breve descripción de las figuras

[0012]

La Figura 1 muestra la dispensación automatizada de células y de agarosa en una matriz multipocillo que contiene un aceite mineral.

Las Figuras 2a - 2c presentan diferentes vistas de una realización preferida de la "herramienta de trompeta" de la invención.

La Figura 3 muestra una segunda realización de la herramienta de trompeta.

Las Figuras 4a y 4b muestran diferentes realizaciones de la invención de herramienta de paja.

La Figura 5 representa un resumen del proceso de la invención.

La Figura 6 muestra un dispositivo usado para mantener el gradiente de temperatura en la operación de la invención.

La Figura 7 representa los niveles de producción de insulina a partir de perlitas hechas con diferentes concentraciones y tipos de agarosa.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

[0013] Se hace referencia a las Patentes de EE.UU. mencionadas más arriba, todas las cuales describen metodologías manuales detalladas para la elaboración de macroperlitas, que contienen diferentes tipos de células, tales como células secretoras según se define en ese documento. La invención descrita en el presente documento modifica esos métodos mediante la sustitución de la etapa final de poner en contacto las perlitas de agarosa con un recubrimiento de agarosa con un aceite mineral en una cuchara o en una superficie de Teflon, con un recipiente que contiene un aceite mineral mantenido en un gradiente de temperatura, como se describe a continuación.

[0014] Las macroperlitas tales como las que se describen en estas patentes también pueden ser fabricadas robóticamente o a través de una automatización. Una de dichas metodologías se describe en el presente documento.

[0015] En una realización, según se representa en la Figura 1, un dispensador robótico, tal como una matriz de pipetas, dispensa las células secretoras en una placa de pocillos múltiples, tal como una placa de 96 pocillos típica. Después se añade agarosa fundida a los pocillos. Las células y la agarosa fundida se transfieren después, a través, por ejemplo, de un medio automatizado tal como una matriz multipipeta, a recipientes de pocillo único o multipocillo que contienen un medio tal como un aceite mineral, tales como placas de 96 pocillos, para formar las perlitas.

[0016] Después, las perlitas son extraídas de los pocillos, preferentemente a través del uso de la denominada "herramienta de trompeta," representada en las Figuras "2 a-c y 3." La herramienta de trompeta, fabricada según lo sucesivo, está diseñada de forma que no altere la superficie de la perlita.

[0017] En una realización adicional, se proporciona un medio de salida en el fondo del pocillo, a través del cual las perlitas escapan del pocillo y pueden usarse en las etapas siguientes. En otra realización adicional, las perlitas resultantes del proceso analizado más arriba pueden ser transferidas a la parte superior del aceite mineral a través de un medio automatizado, tal como una plataforma desplazable, y extraerse también del aceite mineral que contiene el medio a través de sistemas automatizados.

[0018] Después de la recogida mediante la herramienta de trompeta, o del paso a través del medio de salida, y la eliminación de cualquier aceite mineral adherido por medio de un aclarado con una solución apropiada, tal como una solución salina equilibrada, las perlitas se colocan en pocillos que contienen agarosa reciente y caliente. Después de esto, las perlitas se extraen junto con la agarosa caliente, preferentemente usando la denominada "herramienta de paja," según se muestra en las Figuras 4a y 4b, usando una succión suave, y son dispensadas en los recipientes que contienen el aceite mineral en un gradiente de temperatura controlado.

[0019] El recipiente que contiene el aceite mineral puede ser, por ejemplo, un tubo de ensayo, una cubeta, un vaso de precipitados o cualquier otro objeto que sea adecuado, aunque se prefieren los tubos de ensayo y las cubetas de diversos tamaños. El material usado para la elaboración de estos recipientes, es decir, los tubos de ensayo, las cubetas, etc., puede variar. El vidrio es especialmente preferido, aunque pueden usarse otros materiales, tales como los recubiertos con una sustancia para proporcionar una capa hidrófila.

[0020] El gradiente de temperatura del recipiente puede ser mantenido mediante cualquier método conocido en la materia. Es clave que la temperatura del aceite mineral sea mayor en la parte superior del recipiente que en el fondo del mismo. La temperatura y la cantidad del gradiente variarán basándose, por ejemplo, en la longitud del recipiente, el tipo de célula encapsulada, el tipo de agarosa usada, y similares. Los factores que son importantes para establecer estos valores incluyen, por ejemplo, las temperaturas a las cuales son viables las células encapsuladas, la temperatura a la que solidificará la agarosa empleada, y similares. La temperatura al inicio del gradiente es preferentemente de entre 20 °C y 80 °C, más preferentemente de entre 20 °C y 50 °C, e incluso más preferentemente, de entre 20 °C y 40 °C. Idealmente, la temperatura de partida es de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C. La temperatura en el fondo del recipiente también puede variar, variando, por ejemplo,

entre 0 °C y -10 °C, más preferentemente entre 0 °C y -8 °C, y lo más preferentemente entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -2 °C. El diferencial total entre la mayor y la menor temperatura es preferentemente de entre 20 °C y 50 °C, más preferentemente de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C.

5 **[0021]** Las perlitas formadas a través de dicho proceso anterior tienen un diámetro de entre 4-12 mm y/o un recubrimiento de agarosa de entre 0,5 y 5 mm de espesor.

[0022] Las figuras, que son parte de esta solicitud, ampliarán la descripción precedente.

10 **[0023]** La Figura 1 muestra cómo tanto las células como la agarosa son dispensadas en los pocillos de las placas. Después de la extracción del aceite mineral, por ejemplo, a través de un lavado o de una aspiración, o a través de un medio de salida analizado más arriba, la "herramienta de trompeta" mencionada más arriba, y según se muestra en las Figuras 2a - 2c y 3, es insertada en el pocillo, para extraer las perlitas con las células atrapadas. Esta herramienta de trompeta tiene una fuente de vacío unida en un extremo, que no altera la superficie de la perlita, de forma que se facilite su extracción.

15 **[0024]** La perlita que consiste en una capa de agarosa y las células, es depositada a través de la denominada "herramienta de trompeta" en un nuevo pocillo y lleno con agarosa caliente que sirve como segunda capa o recubrimiento de agarosa. La perlita se extrae junto con la agarosa caliente, usando preferentemente una "herramienta de paja," tal como una de las mostradas en las Figuras 4a y 4b, preferentemente con la ayuda de una succión leve, y la perlita es dispensada en un recipiente que contiene el aceite mineral con el gradiente de temperatura. El gradiente de temperatura puede ser mantenido, por ejemplo, mediante el dispositivo mostrado en la Figura 5, pero el artesano experto estará familiarizado con otras opciones. Cuando la macroperlita ha atravesado el recipiente y ha alcanzado el fondo, puede usarse una forma alargada de la herramienta de trompeta, con succión, para extraer las macroperlitas para lavarlas en un medio, o como se ha mencionado más arriba, puede emplearse un medio de salida para la extracción de la perlita. En este punto, las macroperlitas están listas para su uso, aunque en diferentes situaciones puede ser preferible permitir que las células proliferen y/o maduren en las perlitas hasta que haya presente un número suficiente o hasta que un producto específico sea expresado por las células. Este periodo de tiempo podría variar, por ejemplo, desde una semana hasta varios meses.

20 **[0025]** Haciendo referencia ahora a las figuras de la invención reivindicada, las Figuras 2a, 2b, 2c y 3 muestran diferentes vistas de los dispositivos según la invención, la denominada "herramienta de trompeta."

25 **[0026]** Haciendo referencia a la Figura 2a, se muestra una herramienta de trompeta 40. La descripción de la herramienta como una "herramienta de trompeta" deriva de la semejanza de la sección cónica negativa 41 con una trompeta. En un extremo se proporciona un segmento cónico negativo 41, con un borde 42 unido al extremo cónico 41. El extremo cónico 41 se conecta con una sección longitudinal hueca 43 que está adaptada para el paso de un fluido a través de la misma, tal como aire.

30 **[0027]** Como muestra la Figura 2a, la sección longitudinal hueca 43 discurre a lo largo de la totalidad del dispositivo. Puede observarse el medio de abrazadera 44 está posicionado aproximadamente entre 2/3 y 3/4 del recorrido a lo largo de la longitud de la herramienta de trompeta, con respecto al extremo cónico negativo. El medio de abrazadera 44, así como otras diversas características descritas en el presente documento, son artefactos del proceso de elaboración y no afectan al funcionamiento del dispositivo.

35 **[0028]** El medio de abrazadera 44, marca, sin embargo, el punto en el cual el medio longitudinal expande su circunferencia. La porción del dispositivo representada por 45 se corresponde con un extremo de acoplamiento que, durante su operación, conecta la herramienta a una fuente de fluido, por ejemplo, aire, tal como vacío. La apertura de conexión 46 tiene la circunferencia más ancha de cualquier parte del dispositivo y actúa para completar la conexión, por ejemplo, con un medio de vacío. Las estructuras internas, tales como las mostradas en la Figura 2c, se proporcionan para facilitar la unión al medio de vacío. Estas estructuras pueden variar según el aparato que se esté usando.

40 **[0029]** Se observa un medio de cresta 47 en el dispositivo, así como una serie de proyecciones separadas uniformemente 48 a, b y c, todas las cuales son, al igual que el medio de abrazadera 44, artefactos de fabricación; sin embargo, estas proyecciones también sirven para ayudar a sostener sus herramientas asociadas en su sitio, por ejemplo, en una rejilla de dispensación.

45 **[0030]** El interior del dispositivo puede observarse en ambas Figuras 2b y 2c, donde puede observarse que, de hecho, el dispositivo es hueco a lo largo de la totalidad de su longitud. La vista del segmento cónico negativo de la Figura 2c muestra con más detalle cómo se estrecha hasta un punto en el que la circunferencia es ligeramente menor que un objeto con el que está diseñado para acoplarse, por ejemplo, una perlita.

50 **[0031]** Durante su operación, el dispositivo 40 está conectado a través del extremo de conexión 46, por ejemplo, a un medio de bomba de vacío, y está ubicado verticalmente sobre el objeto que va a ser extraído, tal como una perlita. El medio de bomba de vacío (no mostrado) extrae todo el aire de la herramienta y permite la captación de la

perlita, por ejemplo, a través del control de la fuerza de succión creada por el vacío, la configuración del extremo cónico negativo 41 permite la extracción de una perlita, tal como una perlita de agarosa semi-blanda, desde una posición, y un movimiento hacia otra, tal como una solución de agarosa de recubrimiento. En ese punto la presión de vacío se modifica, por ejemplo, proporcionando aire al medio longitudinal 45, que actúa expeliendo la perlita en la solución de agarosa del extremo cónico 41 sin ningún cambio en la configuración de la perlita.

[0032] La Figura 3 muestra otra realización del dispositivo de las Figuras 2a-2c. Este dispositivo, preparado a través de un medio de fabricación diferente al de la realización de las Figuras 2a-2c, muestra un medio de cresta a lo largo de la sección longitudinal 43. También se apreciará que hay variaciones en el medio de abrazadera, así como en el medio de cresta 47 y 48 a-c. El extremo cónico negativo 41 y su borde, así como el extremo de acoplamiento 45 y la apertura de conexión, funcionan sin embargo de la misma forma que las estructuras comparables de las Figuras 2a-2c.

[0033] Las Figuras 4a y 4b representan realizaciones de un dispositivo conocidas en lo sucesivo como "herramienta de paja." Haciendo referencia ahora a la Figura 4a, se muestra una herramienta de paja 50. La herramienta muestra una geometría esencialmente cilíndrica a lo largo de un eje longitudinal hueco 51, un extremo de acoplamiento 52 y un extremo de recepción 53.

[0034] La herramienta de paja incluye un espacio de receso 54, que se extiende a lo largo del eje longitudinal 51, abriéndose en el extremo de recepción 53.

[0035] El espacio de recepción 54 se extiende a lo largo del eje longitudinal, que es contiguo a una sección de canal 55, que puede tener un diámetro menor que el espacio de recepción. Esta sección de canal 55 se une al medio de conexión 52, y la combinación de "52," "54" y "55" forma un canal de trabajo que acepta cambios en la presión de un fluido, tal como aire u otro gas. Durante su operación, el medio de conexión 52 está acoplado a un dispositivo capaz de cambiar la presión de un fluido en la herramienta de paja, tal como una bomba de aire. La herramienta de paja se coloca a continuación sobre un objeto, tal como una perlita, y tras el cambio en la presión, se extrae la perlita a través de la herramienta de paja. Debería apreciarse que el diámetro de la abertura en el extremo de recepción 53 es lo suficientemente grande como para recoger el objeto, por ejemplo, la perlita, y para permitir que la perlita se mueva verticalmente en la cavidad longitudinal de la herramienta. Una vez que la perlita se ha movido a la ubicación deseada, un segundo cambio en la presión provoca la caída de la perlita, y permite la reutilización de la herramienta de paja.

[0036] Las Figuras 4a y 4b difieren en que las configuraciones del medio de conexión 52 son diferentes; sin embargo, la diferencia en las configuraciones es el resultado de los procesos de fabricación y no afecta a la operación del dispositivo.

[0037] En cada dispositivo, las líneas discontinuas indican la adaptación de la herramienta de paja para la recepción de un medio de conexión a vacío de elección. Se representa un canal de receso 56, que es capaz de aceptar un medio de conexión, tal como un anillo en O expandible. También, una característica del dispositivo es un medio 57, para impedir el progreso de una pipeta. Este "estante de pipeta" detiene el paso de una pipeta o de otro medio de administración para el fluido, por ejemplo, de aire.

[0038] Los ejemplos que siguen deberían tomarse como ejemplares, pero no limitantes, de la invención según se describe en el presente documento.

EJEMPLO 1

[0039] Se disolvió agarosa en polvo (Litex FISB-LV) en medio esencial mínimo hasta una concentración del 0,8 % o del 4,5 % (p/v), y después se trató en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Esto produjo soluciones fundidas viscosas. Las soluciones de agarosa se enfriaron y se mantuvieron a 51-53 °C o a 61-63 °C, respectivamente.

[0040] Se añadió un total de 150.000 células RENCA (cáncer renal) a un pocillo, tras lo cual se añadieron 0,25 ml de la solución de agarosa al 0,8 % para formar una suspensión, y después esta suspensión de célula/agarosa se dispensó bien en aceite mineral a la temperatura ambiente en un bol de plástico, o bien en una placa de plástico de 96 pocillos profundos llenada previamente con un aceite mineral a la temperatura ambiente.

[0041] Se formaron células RENCA que contienen macroperlitas de agarosa en forma de perlitas redondas con unas superficies lisas, y las células distribuidas uniformemente. Después se extrajo mediante una aspiración el aceite mineral de las macroperlitas, y las macroperlitas se lavaron con medio de cultivo celular RPMI.

[0042] El recubrimiento de la macroperlita usó la solución al 4,5 % p/v. La agarosa para el recubrimiento era del mismo tipo que el usado para las perlitas; sin embargo, debería apreciarse que pueden diferir.

[0043] Para llevar a cabo el modo manual de preparación de las perlitas, se hicieron rodar las perlitas preparadas más arriba en una cuchara de plástico que contenía 1,0 ml de la agarosa al 4,5 %, que había sido mantenida a 61-

63 °C, tras lo cual se dejaron caer en un aceite mineral a la temperatura ambiente.

5 [0044] En el método de la invención, el material de recubrimiento se mantuvo a 61 - 63 °C, y se transfirió a una placa de 24 pocillos. Después se usó la "herramienta de trompeta" mostrada en la Figura 2a y analizada más arriba, para extraer las perlitas del aceite mineral a la temperatura ambiente y colocarlas en la segunda solución de recubrimiento de agarosa después de lavar las perlitas para eliminar el aceite mineral. Se usó una herramienta de paja, representada en la Figura 4a, junto con una succión suave, para extraer las perlitas, junto con 0,5 ml de agarosa, a un recipiente que contiene un aceite mineral mantenido a un gradiente de temperatura.

10 [0045] Las macroperlitas se dispensaron desde la herramienta de paja, en la parte superior del gradiente del aceite mineral, que se mantuvo a diversas temperaturas, como se analiza a continuación. Según descendía la macroperlita a través del aceite mineral, el recubrimiento se solidificaba sobre la perlita, formando una esfera. La temperatura del aceite mineral disminuía desde la parte superior hacia el fondo del recipiente, hasta una temperatura baja en el fondo, también según se describe a continuación. Después, las macroperlitas de agarosa/agarosa se extrajeron del
15 recipiente usando la herramienta de trompeta de la Figura 2a y después se lavaron con medio. Las macroperlitas resultantes estaban entonces listas para un cultivo tisular rutinario.

EJEMPLO 2

20 [0046] Se usó una serie de diferentes experimentos usando el gradiente de temperatura descrito más arriba.

Experimento	Temperatura superior	Temperatura inferior
Control	TA (temperatura ambiente)	TA (temperatura ambiente)
1	25 °C	-2 °C
2	30 °C	-2 °C
3	40 °C	-2 °C
4	TA	TA
5	50 °C	-1,8 °C
6	60 °C	-1,6 °C
7	TA	TA
8	70 °C	0 °C
9	25 °C	-2 °C

25 [0047] Después de recuperar y lavar las perlitas, como se ha analizado más arriba, se probó su actividad metabólica. Esta evaluación se llevó a cabo usando un ensayo de MTT estándar, que es bien conocida en la técnica. La actividad metabólica se determinó el día = 0 para las células no encapsuladas, y el día 7 posterior a la producción para los encapsulados. Los resultados se resumen a continuación.

Experimento	Control	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Células libres	0,603	0,682	0,682	0,682	0,669	0,723	0,723	0,517	0,686	0,686
Encapsulados	0,507	0,411	0,299	0,279	0,261	0,182	0,173	0,448	0,167	0,415

30 [0048] Los resultados indican que, mientras que las células encapsuladas sobrevivían independientemente de la temperatura inicial cuando se dejaban caer en el gradiente, la actividad metabólica era inversamente proporcional a la temperatura a la que comenzaba el gradiente, es decir, cuanto mayor sea la temperatura, menor es la actividad metabólica resultante.

EJEMPLO 3

35 [0049] Dado que la temperatura de partida óptima del gradiente del aceite mineral fue establecida como de aproximadamente 25 °C, y la temperatura final de aproximadamente -2 °C, se usó esto en un conjunto de experimentos para determinar la actividad metabólica y la capacidad inhibidora tumoral.

40 [0050] La actividad metabólica se determinó de la misma forma que la establecida más arriba.

45 [0051] La actividad inhibidora tumoral se determinó sembrando las células RENCA en placas de 6 pocillos (15.000 células/pocillo) en 4 ml de medio de cultivo nuevo, o la misma cantidad de medio de cultivo tomada a partir de los cultivos de los encapsulados, después de 5 días de cultivo. Las células RENCA libres se cultivaron en el medio durante 5 días a 37 °C y con una atmósfera de un 5 % de CO₂. Las células RENCA se fijaron después con metanol, se tiñeron con rojo neutro al 0,33 % (p/v), y se determinó la absorbancia a 540 nm, usando 630 nm como la longitud

ES 2 647 613 T3

de onda de referencia. La inhibición se definió como el porcentaje de diferencia en la Abs_{540 nm -630 nm} entre el medio tratado y el nuevo.

- 5 **[0052]** Los resultados que siguen presentan los datos de la actividad metabólica. "Célula libre" se refiere a las células RENCA que no fueron tratadas en modo alguno con agarosa, mientras que "1ª capa" se refiere a las perlitas no recubiertas.

Edad (días)	Tipo	Control	1	Control 2	2	Control 3	3	4	Control 4	5	6	Control 5	7
0	Célula libre	0,768	0,530	0,378	0,462	0,481	0,532	0,532	0,384	0,518	0,518	0,530	0,553
1	1ª capa	0,926	1,209	0,912	1,279	1,056	1,120	1,120	1,129	1,002	1,002	1,157	1,711
7	1 semana	0,247	0,260	0,332	0,143	0,739	0,801	0,710	0,409	0,390	0,227	1,330	0,697
21	3 semana	0,201	0,351	0,328	0,258	0,555	0,560	0,770	0,462	0,531	0,380	0,977	0,555
35	5 semana	0,647	n/a	0,856	n/a	1,156	n/a	1,092	1,141	n/a	n/a	1,447	n/a
49	7 semana	1,080	n/a	1,236	n/a	1,324	n/a	1,066	1,215	n/a	n/a	1,926	n/a
84	12 semana	1,025	n/a	1,548	n/a	1,623	n/a	1,095	1,725	n/a	n/a	1,886	n/a
112	16 semana	1,652	n/a	2,440	n/a	2,247	n/a	1,128	1,872	n/a	n/a	n/a	n/a

10 **[0053]** En la siguiente tabla se determinó la capacidad de inhibición tumoral:

Edad (días)	Tipo	Control	1	Control	2	Control	3	4	Control	5	Control	6
35	%	29,99 %	29,80 %	12,78 %	11,23 %	11,10 %	7,54 %	17,37 %	23,97 %	26,20 %	33,85 %	33,28 %
49	%	23,62 %	33,53 %	26,15 %	33,98 %	32,70 %	29,63 %	29,63 %	34,54 %	40,90 %	n/a	n/a
84	%	33,10 %	45,69 %	23,41 %	33,93 %	43,20 %	56,02 %	56,09 %	n/a	n/a	n/a	n/a
112	%	50,19 %	55,66 %	42,21 %	46,03 %	55,28 %	44,84 %	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

[0054] Los resultados indican que las perlitas de agarosa producidas según la invención son equivalentes en todos los aspectos pertinentes a las perlitas producidas manualmente.

15 **EJEMPLO 4**

- 20 **[0055]** Se produjeron perlitas según la invención como se ha descrito más arriba, y el método manual representado por la citada técnica anterior. A lo largo de un periodo de 7 meses se seleccionaron diez perlitas aleatoriamente para determinar sus diámetros. Los resultados, presentados en la tabla que sigue, muestran que las perlitas producidas según la invención tienen un diámetro coherente, y por lo tanto un recubrimiento más coherente.

Enero	Automatizado: diámetro (p)	Manual: diámetro (p)			
			Parámetro	Auto	Manual
	0,352	0,350			
	0,363	0,347			
	0,364	0,347	Media	0,350386	0,3339714
	0,354	0,353	Error estándar	0,001267	0,0015674
	0,350	0,346	Mediana	0,35	0,3325
	0,347	0,348	Modo	0,347	0,347
	0,355	0,351	Desviación típica	0,010601	0,0131137
	0,348	0,350	Varianza de la muestra	0,000112	0,000172

ES 2 647 613 T3

	Automatizado: diámetro (p)	Manual: diámetro (p)	Parámetro	Auto	Manual
Febrero	0,353	0,352	Curtosis	0,697026	-1,117773
	0,347	0,350	Asimetría	-0,30036	-0,151897
	0,350	0,350	Rango	0,057	0,05
	0,354	0,328	Mínimo	0,318	0,307
	0,351	0,327	Máximo	0,375	0,357
	0,354	0,326	Suma	24,527	23,378
	0,361	0,324	Recuento	70	70
	0,353	0,332			
Marzo	0,355	0,325			
	0,362	0,328			
	0,353	0,321			
	0,348	0,316			
	0,335	0,322			
	0,354	0,317			
	0,357	0,308			
	0,364	0,347			
	0,356	0,331			
	0,349	0,313			
	0,351	0,346			
	0,334	0,333			
	0,358	0,329			
	Abril	0,352	0,307		
0,332		0,344			
0,342		0,331			
0,345		0,324			
0,334		0,334			
0,351		0,344			
0,375		0,346			
0,345		0,339			
0,343		0,319			
0,368		0,339			
Mayo	0,346	0,331			
	0,368	0,335			
	0,344	0,332			
	0,349	0,322			
	0,333	0,317			
	0,346	0,315			
	0,337	0,316			

	Automatizado: diámetro (p)	Manual: diámetro (p)
Junio	0,341	0,318
	0,329	0,347
	0,347	0,317
	0,329	0,332
	0,370	0,330
	0,318	0,357
	0,350	0,346
	0,350	0,343
	0,351	0,347
	0,347	0,345
	0,353	0,336
	0,347	0,344
	0,347	0,318
	0,363	0,332
Julio	0,341	0,347
	0,349	0,343
	0,350	0,345
	0,346	0,326
	0,366	0,324
	0,361	0,342
	0,362	0,357
	0,348	0,321
	0,351	0,314
	0,369	0,335

5 [0056] También, después de un análisis se averiguó que el proceso de la invención dio como resultado una reducida contaminación celular. Para describirlo con detalle, se ha averiguado que cuando las perlitas se preparan según el método manual de la técnica anterior, existe un problema con las células que no quedan completamente encapsuladas. Cuando las células son células cancerosas, forman placas o colonias tumorales, y las perlitas en el cultivo con ellas deben ser desechadas debido a la contaminación.

10 [0057] A lo largo de un periodo de 8 meses se fabricaron manualmente 56 lotes de perlitas, conteniendo cada lote un número de cultivos en placas de Petri. Al menos estaba contaminado un cultivo en cada lote. Por el contrario, se prepararon 62 lotes en el mismo periodo usando el método de la invención. Únicamente 12 de esos 62 lotes mostró algún tipo de contaminación.

EJEMPLO 5

15 [0058] El siguiente ejemplo detalla la producción de tres grupos diferentes de perlitas de agarosa recubiertas con agarosa que contienen islotes.

20 [0059] Los islotes se prepararon a partir de animales mayores de dos años de edad y con un historial de múltiples paridades.

[0060] Se perfundieron los páncreas de los animales con una solución de colagenasa/proteasa neutra (Colagenasa P, a 1,0 g/L, o Liberasa MTF/Termolisina, a 7,5 U/g de páncreas), y una solución de 0,01 g/L de DNasa I, o 2,5 mg/pulmozima de páncreas, preparada bien en una solución salina equilibrada de Hank (GBSS) o bien en solución madre de purificación para almacenamiento en frío.

[0061] Después de la cuantificación, los islotes se separaron en 2.000 alícuotas IEQ, antes de ser resuspendidos en 0,5 ml de una solución de uno de Seakem Gold al 1,5 % (en lo sucesivo, "SG", SG al 0,8 % o de Litex al 0,8 % ("Li" en lo sucesivo). Un "IEQ" según se usa en el presente documento significa un islote que tiene un diámetro de 150 µm. Por lo tanto, un islote con un diámetro de 300 µm es 2 IEQs, mientras que uno con un diámetro de 75 µm es 0,5 IEQ. La agarosa Litex posee las siguientes propiedades: una resistencia del gel > 1.000 g/cm² a un 1,5 % de gel de entre 5,8 y 8,7 cP cuando se usa una solución al 1,5 %, una temperatura de gelificación de 40-43 °C para una solución al 1,5 %, un valor de EEO (electro endosmosis) de entre 0,06 y 0,12, y un contenido en sulfato < 0,30 %. Las soluciones se prepararon en medio esencial mínimo con HEPES 25 mM.

[0062] Las suspensiones fueron expelidas por debajo de la superficie del aceite mineral estéril para producir cuatro perlitas esféricas de 0,125 ml, de aproximadamente 5-6 mm de diámetro, conteniendo cada una 500 IEQ.

[0063] Estas perlitas de agarosa no recubiertas se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. Después de 5-7 días, se aplicó una segunda capa de agarosa SG al 5 %, produciendo perlitas de agarosa que contienen islotes recubiertas de agarosa, con un diámetro final de 8-9 mm.

[0064] Estas perlitas se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ hasta que se usaron en los experimentos que siguen. Se colocaron en un medio de cultivo (glucosa 11 mM, complementada con un 2,5 % de suero porcino inactivado por calor, y un 1 % de antibiótico/antimicótico). El medio de cultivo se cambió semanalmente y las muestras del medio se analizaron 24 horas después de cada cambio, cada semana, según los ensayos analizados a continuación.

EJEMPLO 6

[0065] Como se ha indicado en el ejemplo anterior, se tomaron muestras de medio de cultivo a partir de las muestras, y se ensayó el contenido en insulina usando un ELISA de insulina porcina disponible comercialmente. Los resultados están representados en la Figura 6. Se observará que los islotes encapsulados en Li al 0,8 % superaron a los islotes encapsulados tanto en SG al 0,8 % como en SG al 1,5 % con respecto a la producción de insulina.

EJEMPLO 7

[0066] Los experimentos *in vitro* presentados más arriba se extendieron a experimentos *in vivo*, como se analiza en el presente documento.

[0067] En estos experimentos se usaron adultos (ratas de 8 semanas de edad). Los animales se dividieron en grupos de controles de "sólo insulina" o receptores de perlitita. Todos los animales recibieron 65 mg/kg de estreptozotocina a través de una inyección en la vena de la cola para inducir una diabetes.

[0068] La presencia de la diabetes se confirmó mediante un ensayo de la sangre de los animales en cuestión para evaluar los niveles de glucosa sin ayuno. Un nivel de glucosa mayor de 400 mg/dl durante 3 días consecutivos se consideró indicador de que había presente una diabetes. Cualquier animal que no mostró una diabetes a las 2 semanas recibió una segunda dosis de estreptozotocina, tras lo cual todos los animales se volvieron diabéticos.

[0069] Los animales elegidos para recibir los implantes recibieron las perlitas según Gazda, et al., Cell Transplant, 16: 609-620 (2007), que se incorpora como referencia en su totalidad. Para ampliar la información, se anestesiaron animales de 12-13 semanas de edad usando isoflurano. Después de la incisión en la línea media a lo largo de la cavidad peritoneal, se colocaron en la misma las perlitas.

[0070] El número de perlitas colocadas en cada animal variará dependiendo de la mayor dosis de insulina administrada al animal en particular a lo largo del periodo de 3 días previos al implante, dividido por la producción media de insulina por macroperlitita (basada en la insulina producida por las perlitas a lo largo del periodo de 4 semanas previo al implante). Los ratones recibieron la cantidad de perlitas necesaria para proporcionar la dosis de insulina exacta que habían recibido antes del implante (1x), o 1,7x esa dosis. Los animales hembras y machos recibieron perlitas igual a 1x, pero sólo los machos recibieron 1,7x, en parte porque las ratas macho pesan más que las ratas hembra.

[0071] No se observó ninguna diferencia significativa en los requisitos de insulina antes del implante con respecto a los diferentes tipos de implante (SG al 1,5 %, SG al 0,8 %, Li al 0,8 %); sin embargo, se requerían más macroperlititas para las perlitas de SG al 1,5 %, y se requerían menos para las de Li al 0,8 %.

[0072] Después del implante, los animales se mantuvieron durante 90 días, monitorizándose regularmente la glucosa sanguínea y el peso corporal.

[0073] Los ratones hembra (todos los del grupo 1x) mostraron una normalización inmediata y sostenida de los niveles sanguíneos de glucosa en comparación con los ratones que recibieron los controles de insulina. Las ratas macho del grupo 1x mostraron una mejora inmediata pero temporal en la regulación de la glucosa sanguínea, que

volvió a los niveles previos al implante aproximadamente 30 días después del implante.

EJEMPLO 8

5 **[0074]** Se llevaron a cabo estudios con las macroperlitas después de sacrificar y analizar la integridad estructural y la capacidad funcional de los animales receptores.

[0075] Un análisis macroscópico indicó que únicamente dos de las 1.540 macroperlitas recuperadas mostraron algún daño estructural.

10 **[0076]** Los ejemplos anteriores describen varias características de la invención, que se refieren a macroperlitas de agarosa que contienen células secretoras recubiertas con agarosa, en las que la agarosa usada para las macroperlitas tenía las propiedades de la agarosa Litex, establecidas más arriba.

15 **[0077]** Según se establece en el presente documento, el término "macroperlita" se refiere a una estructura que es esencialmente esférica con un diámetro de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10-12 mm de diámetro, lo más preferentemente de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8 mm de diámetro. La segunda capa de agarosa es preferentemente de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 mm de espesor, lo más preferentemente de entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 5 mm de espesor, incluso más
20 preferentemente, de entre aproximadamente 1,0 mm y aproximadamente 3 mm, y lo más preferentemente, de entre aproximadamente 1,0 mm y aproximadamente 2,0 mm de espesor. La segunda capa de agarosa puede ser, aunque no necesariamente, de la misma agarosa que la usada para la elaboración de la perlita.

25 **[0078]** "Macroperlitas" se usa como estructura preferida; sin embargo, cualquier estructura sólida de agarosa que encapsule células secretoras, y esté preferentemente envuelta con una segunda capa de agarosa, son características de la invención.

[0079] Las células secretoras pueden variar. Puede encapsularse cualquier célula u orgánulo que produzca un producto de secreción deseable. Los islotes, las células cancerosas y las células madre son ejemplos de los tipos de
30 materiales que pueden usarse. Cada perlita puede contener un número variable de orgánulos celulares, para los islotes, por ejemplo, de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 5.000 equivalentes de islotes (en lo sucesivo, "IEQ"), más preferentemente, de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 2.500 IEQ, incluso más preferentemente, de entre aproximadamente 250 y aproximadamente 1.000, y lo más preferentemente, de entre aproximadamente 475 y aproximadamente 550 IEQ. Lo más especialmente preferido es aproximadamente 500 IEQ.

35 **[0080]** También es una característica de la invención un método mejorado para la elaboración de macroperlitas, independientemente de la agarosa usada. Las células se mezclan con agarosa, y después se forman en una suspensión, que a su vez se usa para formar una perlita. La perlita, por ejemplo, una macroperlita, se recubre después con agarosa, tras lo cual la perlita recubierta resultante es dispensada en una muestra de aceite mineral a un gradiente de temperatura, de forma que la perlita entre en contacto con el aceite mineral a una temperatura mayor y gotee hacia un aceite a una temperatura menor. Las perlitas pueden contener cualquier tipo de célula deseada, tal como, pero no se limitan a, células secretoras, células cancerosas, islotes, células madre, tales como células madre pluripotentes, y similares

45 **[0081]** En algunas realizaciones particularmente preferidas, las herramientas de "trompeta" y de "paja", según se describen en el presente documento, se usan para extraer las perlitas no recubiertas y las recubiertas, respectivamente.

50 **[0082]** El gradiente de temperatura del aceite mineral puede variar. Preferiblemente, el gradiente es de entre 20 °C y 50 °C, es decir, la diferencia entre la temperatura superior y la inferior entra en este intervalo. Más preferentemente, la diferencia es de entre 20 °C y 35 °C.

[0083] La temperatura más alta del aceite puede variar, pero preferentemente es de entre 20 °C y 30 °C, más preferentemente de entre 20 °C y 35 °C. De forma análoga, la menor temperatura puede variar, y va desde 0 °C hasta -8 °C, y más preferentemente, desde 0 °C hasta -2 °C.

55 **[0084]** Otros aspectos de la invención serán evidentes para el experto en la técnica, y no necesitan ninguna aclaración adicional.

60

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para la producción de una composición química que comprende una muestra de células vivas en una perlita que contiene agarosa, en el que dichas perlitas se recubren con agarosa, que comprende:
- (a) mezclar una primera muestra de agarosa con dicha muestra de células vivas para formar una suspensión;
(b) trasladar dicha suspensión a una primera muestra de un aceite mineral, para formar una perlita a partir de dicha suspensión;
(c) extraer dicha perlita de dicha primera muestra de aceite mineral;
10 (d) aclarar el aceite mineral de la perlita;
(e) trasladar dicha perlita con una herramienta automatizada de recogida y desplazamiento de una perlita hacia una segunda solución de agarosa;
(f) recubrir dicha perlita con dicha segunda solución de agarosa,
15 (g) extraer dicha perlita de dicha segunda solución de agarosa con una herramienta de extracción automatizada de una perlita, y
(h) dispensar dicha perlita cubierta en una segunda muestra de un aceite mineral, en el que dicha muestra de aceite mineral se mantiene a un gradiente de temperatura de forma que dicha perlita se mueva a lo largo de un camino desde una ubicación en el aceite mineral que está a una temperatura mayor de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C, hasta una ubicación del aceite mineral a una temperatura menor de entre
20 aproximadamente 0 °C y aproximadamente -8 °C, para formar una perlita que tiene un diámetro de entre 4-12 mm y/o un recubrimiento de agarosa de entre 0,5 y 5 mm de grosor.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en el que dichas células son células secretoras.
- 25 **3.** El método de la reivindicación 1, en el que dichas células son células cancerosas.
- 4.** El método de la reivindicación 1, en el que dichas células son células madre cancerosas.
- 5.** El método de la reivindicación 1, en el que dichas células son células de islotes.
- 30 **6.** El método de la reivindicación 1, en el que dichas células son células madre.
- 7.** El método de la reivindicación 6, en el que dichas células son células madre embrionarias.
- 35 **8.** El método de la reivindicación 1, en el que dichas células son células pluripotentes.
- 9.** El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente extraer dicha perlita de dicha primera o segunda muestra de un aceite mineral con una herramienta automatizada de captación y desplazamiento de una perlita.
- 40 **10.** El método de la reivindicación 1, en el que dicha temperatura mayor es de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C, y dicha temperatura menor es de entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente -2 °C.

Figura 1

1ª Producción de recubrimiento

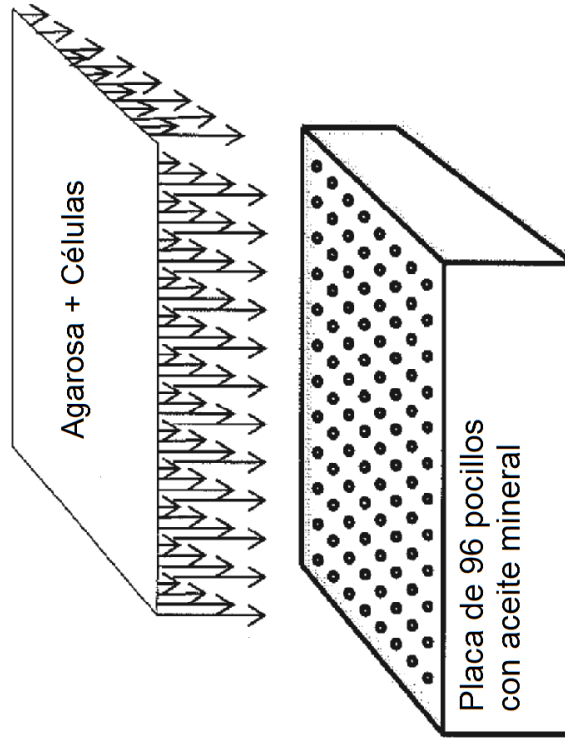


Figura 2b

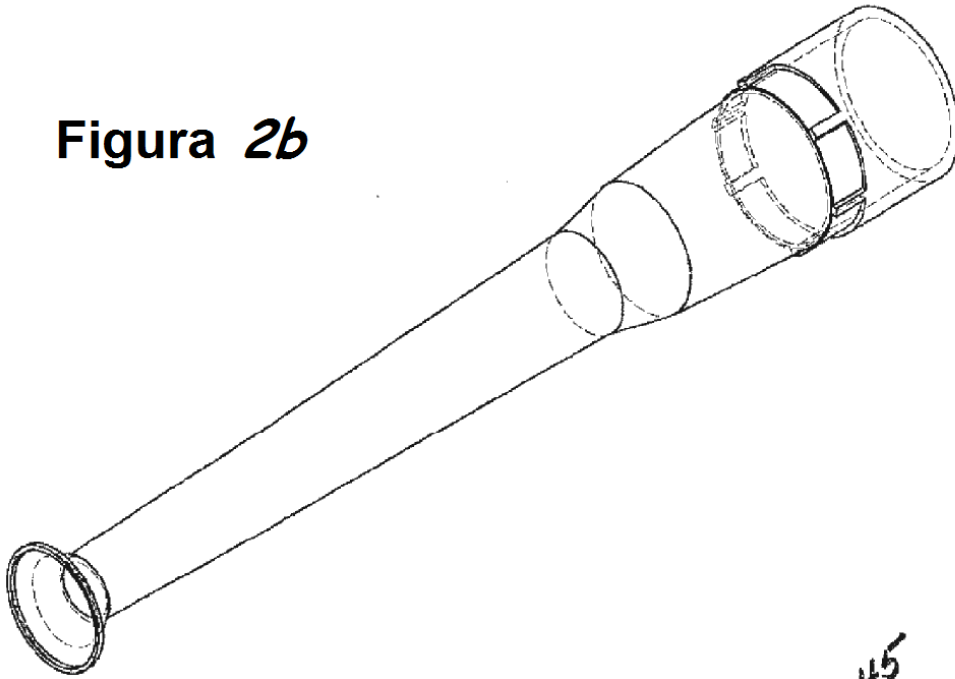


Figura 2a

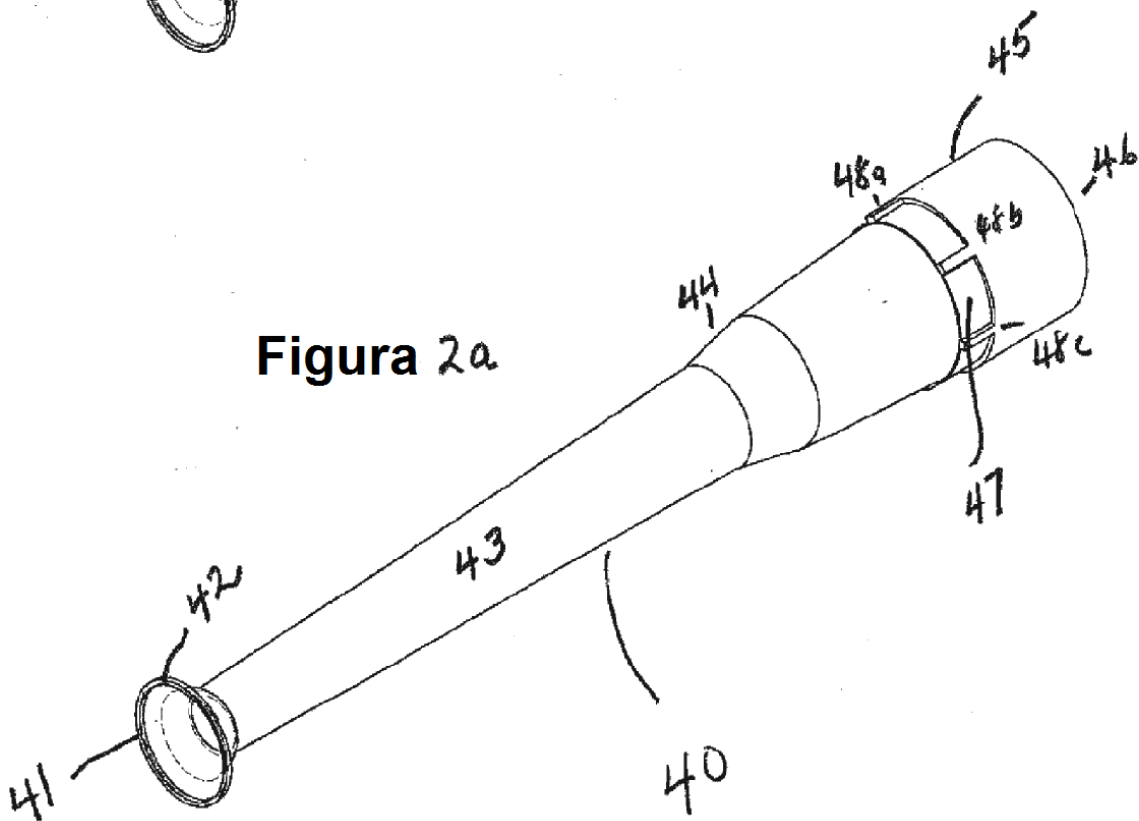


Figura 2c

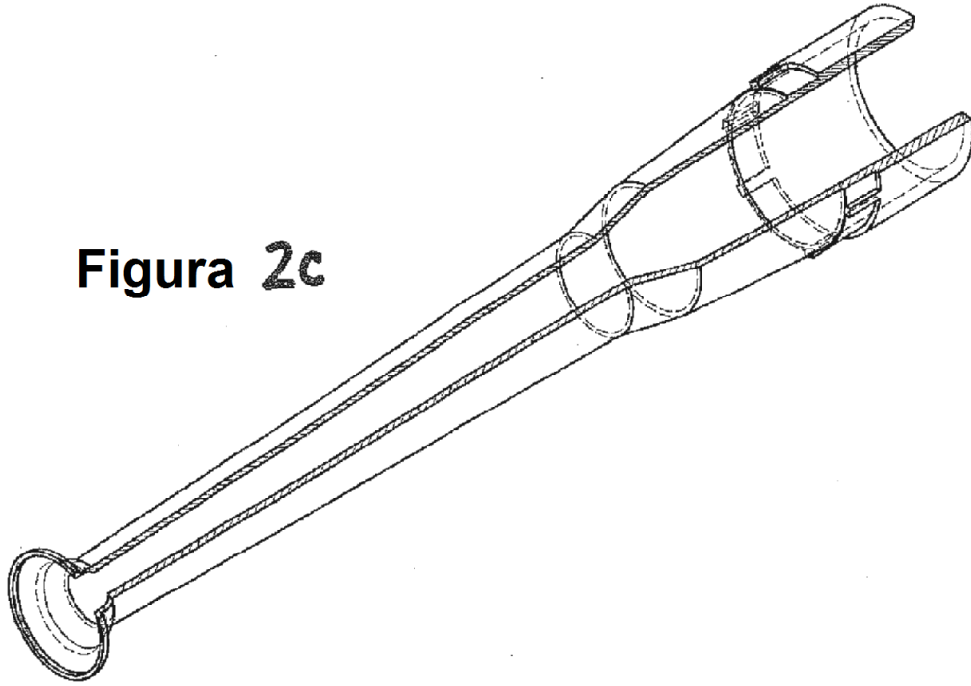
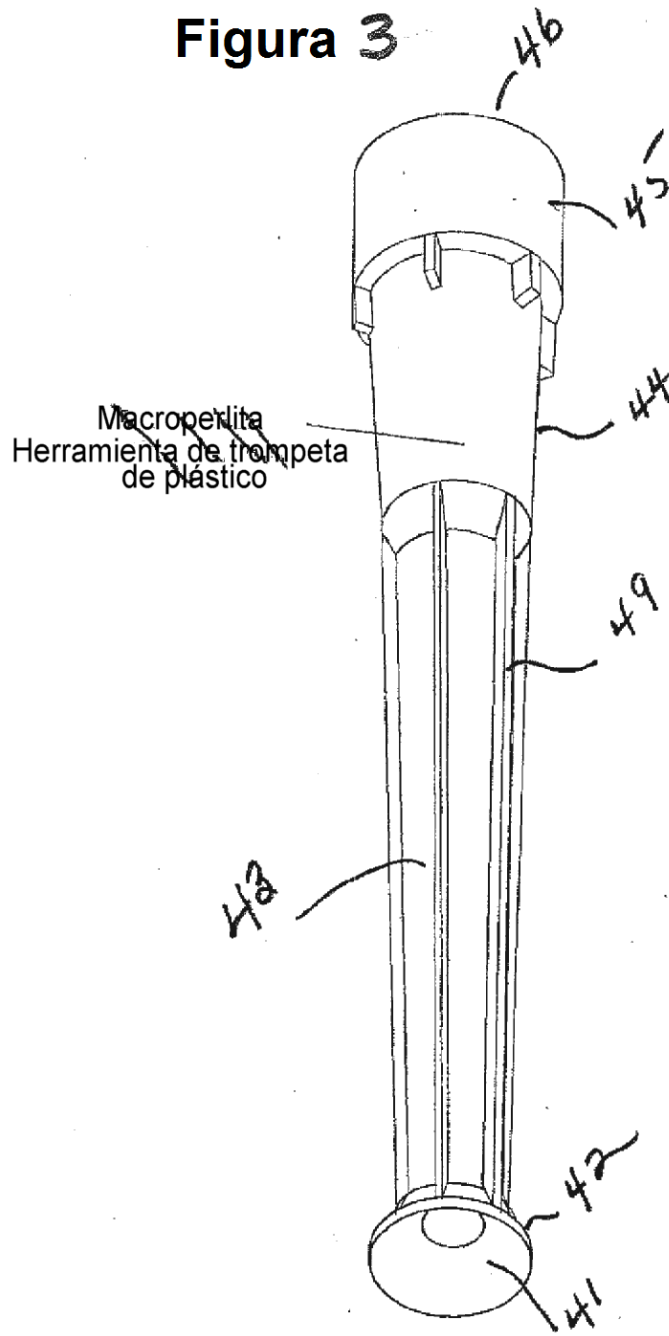


Figura 3



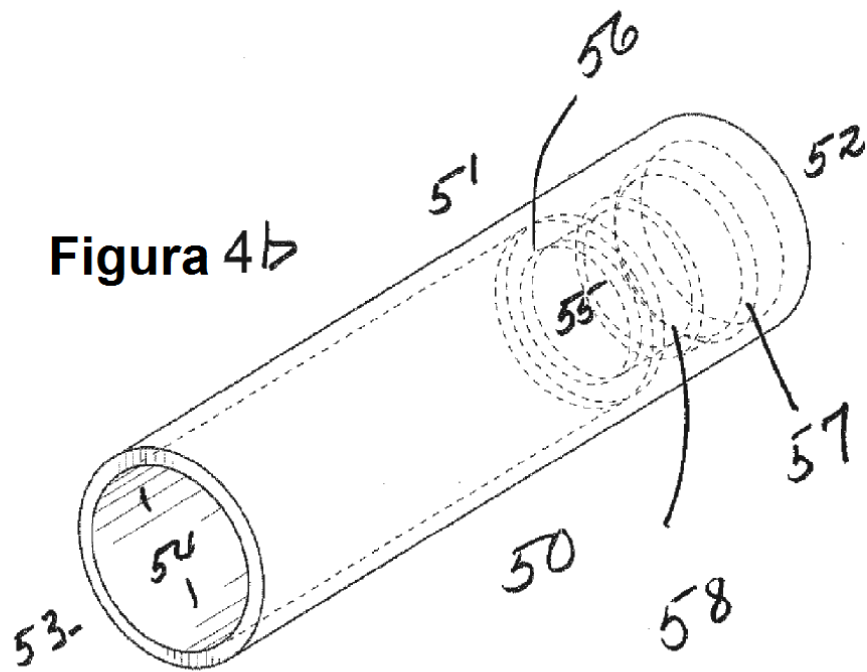
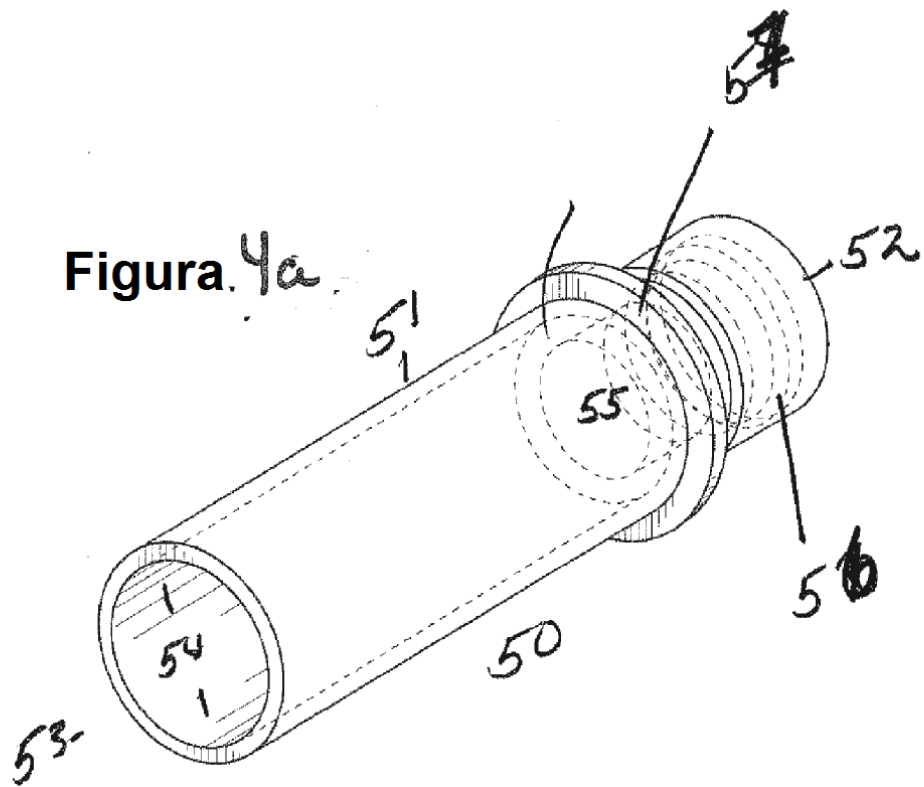
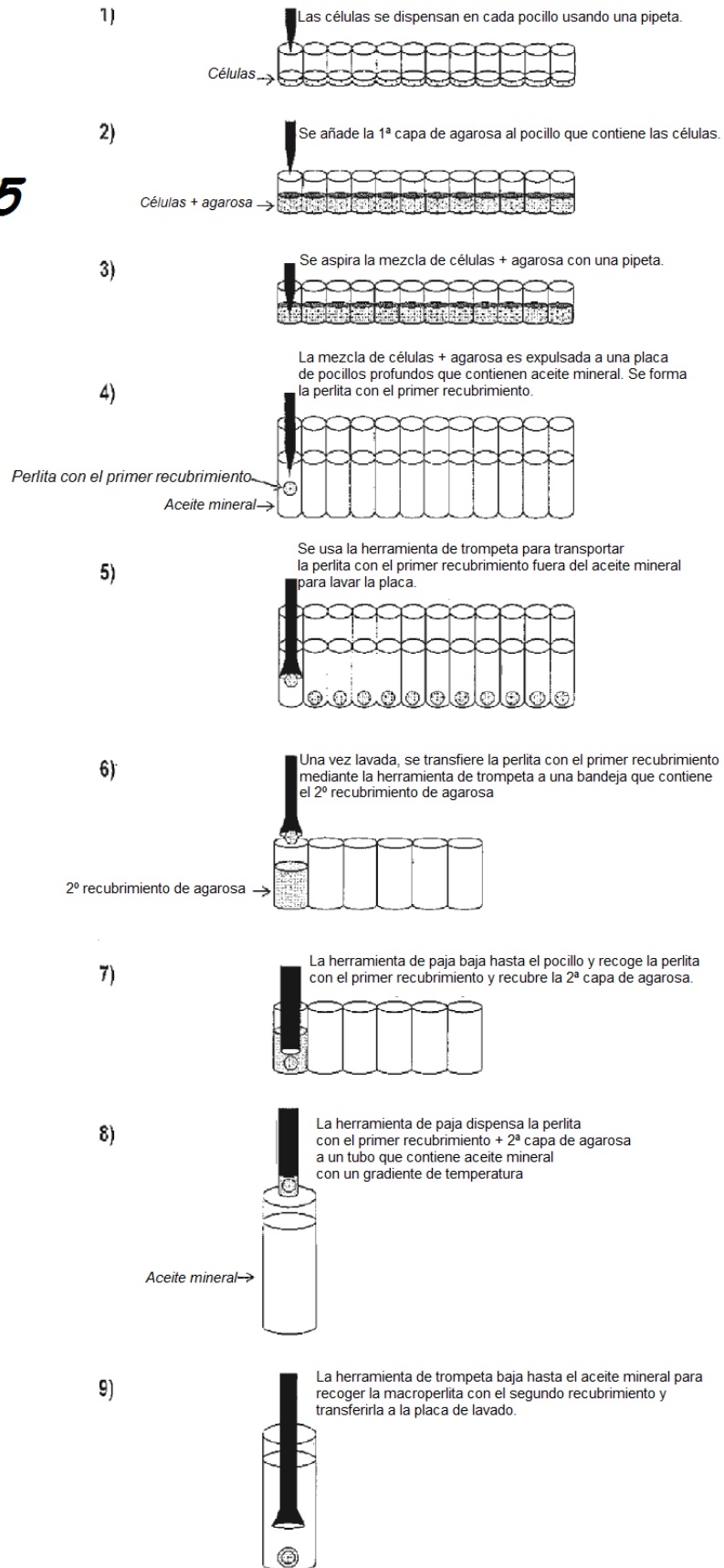


Figura 5



Portador de calentamiento y enfriamiento:

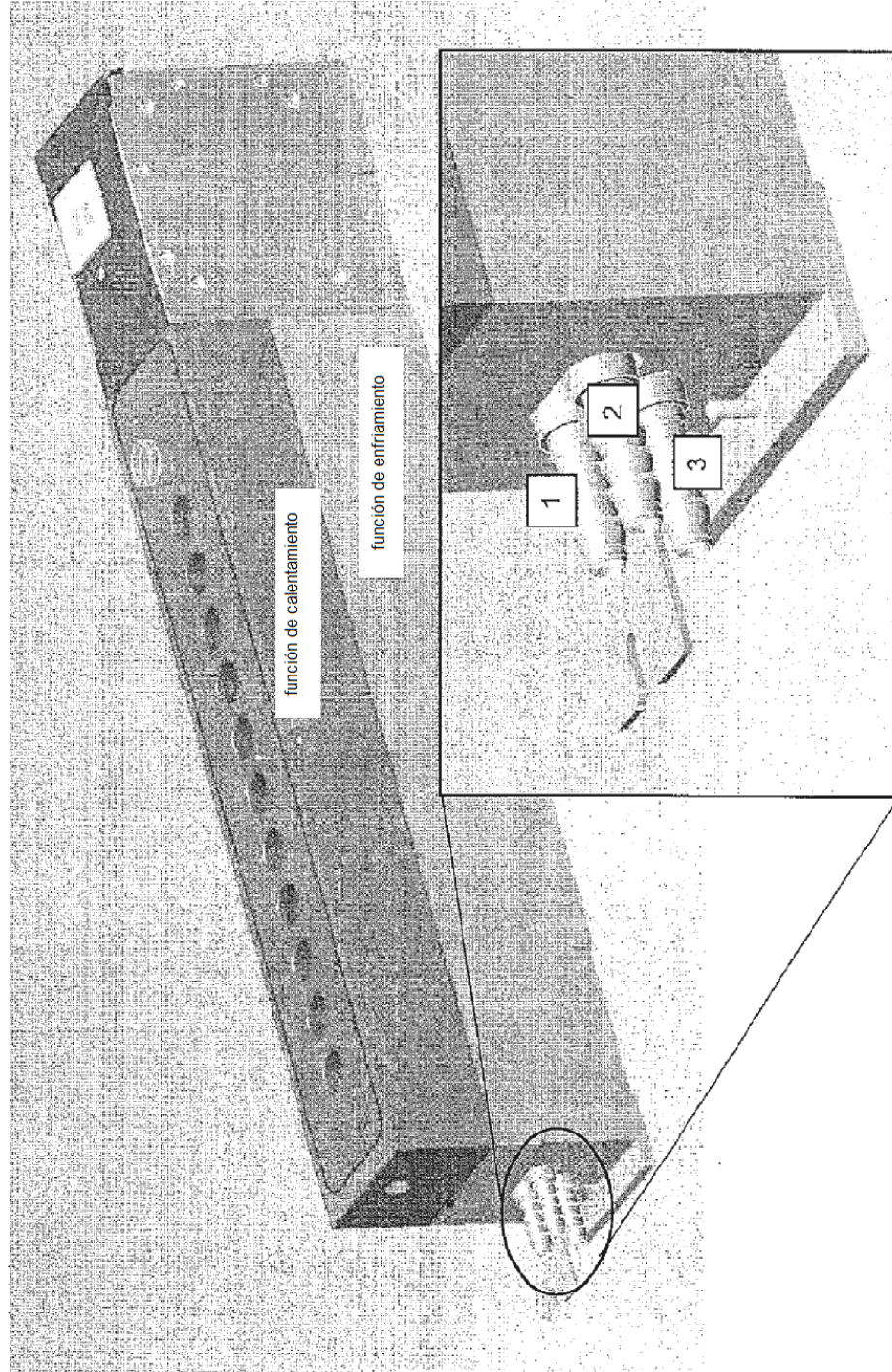


Figura 6

Figura 7

