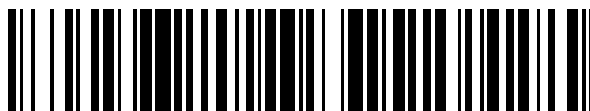


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 690**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A61M 5/142 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2006 PCT/US2006/021542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2006 WO06130851**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2006 E 06772016 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 1887870**

54 Título: **Dispositivos prevascularizados y métodos relacionados**

30 Prioridad:

02.06.2005 US 686706 P

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

12.02.2019

73 Titular/es:

**ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF
THE UNIVERSITY OF ARIZONA (100.0%)
PO Box 210300A
Tucson, AZ 85721-0300, US**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, STUART, K. y
HOYING, JAMES, B.**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 699 690 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

Dispositivos prevascularizados y métodos relacionados

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La presente exposición se refiere generalmente a dispositivos para mejorar la eficacia de terapias basadas en células mediante el uso de constructos prevascularizados, incluidos dispositivos y dispositivos de inmunoaislamiento que prolongan de manera significativa la viabilidad y actividad de las células implantadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** La diabetes es un grupo de enfermedades caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre que se deben a defectos en la producción de insulina, a la acción de la insulina, o a ambos. Actualmente, se estima que aproximadamente 20,8 millones de personas en Estados Unidos, o aproximadamente el 7 % de la población de EE.UU., tiene diabetes, y la incidencia de la enfermedad está creciendo.

- 15 **[0003]** Los principales tipos de diabetes incluyen la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, la diabetes gestacional, y la prediabetes. Otros tipos de diabetes también pueden deberse a un problema genético específico, cirugía, fármacos, malnutrición, infecciones, y otras enfermedades. Estos "otros" tipos de diabetes representan aproximadamente el 1-5 % de todos los casos diagnosticados de la enfermedad.

- 20 **[0004]** La diabetes de tipo 1, a la que también se le llama diabetes mellitus dependiente de la insulina (DMDI) o diabetes juvenil, resulta cuando el sistema inmune del cuerpo destruye las células beta pancreáticas productoras de insulina. La diabetes tipo 1 representa aproximadamente el 5-10% de todos los casos diagnosticados. La diabetes tipo 2, a la que también se le llama diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) o diabetes adulta, resulta de la resistencia a la insulina, combinada con una deficiencia relativa de insulina. La diabetes tipo 2 representa aproximadamente el 90% de todos los casos diagnosticados. Afecta principalmente a gente de 45 años o más y se asocia con la obesidad y un estilo de vida sedentario.

- 25 **[0005]** Los pacientes a los que se les ha diagnosticado diabetes del tipo 1 o 2 presentan un riesgo significativamente aumentado de desarrollar otras complicaciones graves, que incluyen enfermedades cardiovasculares, hipertensión, apoplejías, amputación de miembros, retinopatías, neuropatías, nefropatías, periodontitis, complicaciones durante el embarazo y otras complicaciones incluyendo cetoacidosis diabética y coma hiperosmolar.

- 30 **[0006]** La diabetes gestacional afecta aproximadamente al 4 % de todas las embarazadas y resulta de una forma de intolerancia a la glucosa. Las mujeres que han padecido diabetes gestacional presentan un 20-50 % de posibilidades de desarrollar otra forma de la enfermedad en los siguientes 5-10 años. La prediabetes se caracteriza por un nivel de glucosa en sangre más alto de lo normal, pero aún no es lo suficientemente alto para diagnosticar diabetes tipo 2. La gente con prediabetes presenta una alteración de la glucosa en ayunas o una alteración de la tolerancia de glucosa o ambas. Se estima que 41 millones de estadounidenses padecen prediabetes, y por tanto están en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2, enfermedades cardíacas y apoplejías.

- 35 **[0007]** Los pacientes con diabetes tipo 1 deben administrarse insulina mediante una inyección o una bomba para sobrevivir. En sus primeras etapas, algunas personas con diabetes tipo 2 pueden controlar la enfermedad mediante una combinación de fármacos que aumentan la insulina pancreática, o actúan en el hígado, músculos o intestino, además de cambios en su estilo de vida, en la dieta y la actividad física. No obstante, a pesar de estos esfuerzos, el 40 % de todos los pacientes con diabetes tipo 2 al final necesitan inyecciones de insulina. En consecuencia, el tratamiento más prometedor para la diabetes de tipo 1 y la diabetes de tipo 2 puede ser la sustitución de las células beta pancreáticas dañadas con células betas funcionales intactas mediante un trasplante de islotes beta.

- 45 **[0008]** La terapia de sustitución de células beta mediante un trasplante de islotes ha alcanzado la etapa de ensayos clínicos. No obstante, aún quedan importantes limitaciones asociadas con la terapia; es decir, la pérdida de la viabilidad y actividad de las células beta debido a la falta de riego sanguíneo para sostener la viabilidad celular. Mientras que los aloinjertos pancreáticos del órgano completo tienen una supervivencia prevista de los injertos de más del 80 % en un año, el riesgo de morbilidad posoperatoria grave y los riesgos de inmunosupresión crónica limitan este enfoque. El trasplante de células beta ofrece varias ventajas sobre el trasplante del órgano completo, incluida la habilidad de aislar y mantener islotes de los órganos que no son adecuados para un trasplante del órgano completo, una morbilidad y mortalidad reducidas, y finalmente, la oportunidad de aislar inmunológicamente las células beta y evitar el uso de fármacos inmunosupresores. Un importante obstáculo para la utilización clínica de los trasplantes de células beta ha sido la falta de un riego sanguíneo derivado del huésped para mantener la viabilidad y por tanto la actividad de las células trasplantadas (De Vos P. et al. "Efficacy of a prevascularized expanded polytetrafluoroethylene solid support system as a transplantation site for pancreatic islets". *Transplantation* 63: 824-830, 1997; Risbud M.V. & Bhone R.R. "Islet immunoisolation: experience with biopolymers". *J Biomater Sci Polym* Ed 12: 1243-1252, 2001; Vajkoczy P. et al. "Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts". *Transplantation* 60: 123-127, 1995). En el

área de los implantes de biomateriales y las respuestas cicatrizantes alrededor de los implantes, el desarrollo de una cápsula fibrosa avascular proporciona el ejemplo más pertinente de los elementos de la angiostasis, angiogénesis y angioregresión (Auerbach R. et al. "Angiogenesis assays: a critical overview." *Clin Chem* 49: 32-40, 2003; Djonov V. et al. "Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis". *Cell Tissue Res* 2003; Folkman J. "Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors". *Am Surg* 175: 409-416, 1972; Folkman J. "Tumor angiogenesis". *Adv Cancer Res* 19: 331-358, 1974; Hoying J.B. et al. "Heterogeneity in Angiogenesis". En: *Genetics of Angiogenesis*, editado por Hoying J.B. BIOS Scientific Publishers Ltd., 2003, p. 191-203; Ingber D.E. "Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology". *Circ Res* 91: 877-887; 2002; Kale S. et al. "Microarray analysis of in vitro pericyte differentiation reveals an angiogenic program of gene expression". *FASEB J* 19: 270-271; 2005; Pierce S. y Skalak T.C. "Microvascular remodeling: a complex continuum spanning angiogenesis to arteriogenesis". *Microcirculation* 10: 99-111, 2003; Rifkin D.B. et al. "The involvement of proteases and protease inhibitors in neovascularization". *Acta Biol Med Ger* 40: 1259-1263, 1981; Wahlberg E. "Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia". *J Vasc Surg* 38: 198-203, 2003). En vista de los problemas asociados con las presentes tecnologías de sustitución de células, existe una necesidad de dispositivos y métodos para su uso en la terapia de sustitución de células que mejoran de manera significativa la eficacia de las terapias celulares al prolongar la viabilidad y la actividad celular.

[0009] Los inventores de la presente invención han establecido nuevas tecnologías para abordar estos problemas críticos. En concreto, los inventores han desarrollado una nueva terapia celular para la generación de constructos modificados de tejido prevascularizado (Shepherd B.R. et al. "Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 898-904, 2004). En los documentos de patente estadounidense n.º U.S. 7,029,838 y U.S. 7,052,829, los inventores describieron previamente materiales y métodos para preparar constructos prevascularizados que pueden utilizarse para revascularizar constructos de tejido modificado o para revascularizar tejidos u órganos enfermos o dañados tras la implantación. Los inventores también han desarrollado una nueva generación de biomateriales que soportan una amplia vascularización (Kidd K.R. et al. "Angiogenesis and neovascularization associated with extracellular matrix-modified porous implants". *Journal of Biomedical Materials Research* 2: 366-377, 2002; Kidd K.R. et al. "Angiogenesis and neovascularization associated with extracellular matrix-modified porous implants". *J Biomed Mater Res* 59: 366-377, 2002; Kidd K.R. and Williams S.K. "Laminin-5-enriched extracellular matrix accelerates angiogenesis and neovascularization in association with ePTFE". *J Biomed Mater Res A* 69: 294-304, 2004). La construcción de material y células combinados se denomina un constructo o Dispositivo Prevascularizado, o un Dispositivo de Inmunoaislamiento Prevascularizado (PVID, por sus siglas en inglés), y funciona para prolongar considerablemente la viabilidad de las células y su actividad *in vitro*, y en concreto, asegura un funcionamiento a largo plazo de las células de islotes beta trasplantadas en un sujeto. Estos constructos representan una microcirculación preformada que puede elaborarse a partir de las células endoteliales microvasculares derivadas de la grasa del propio paciente, evitando el uso de fármacos inmunosupresores (Williams S.K. "Endothelial cell transplantation". *Cell Transplant* 4: 401-410, 1995).

[0010] El documento EP1466632 describe una bolsa implantable para sembrarla con células liberadoras de insulina para tratar la diabetes, conteniendo la bolsa implantable una abertura para cargar células liberadoras de insulina cuya abertura puede cerrarse posteriormente y si se desea, sellarse. El dispositivo puede contener espuma porosa reforzada y un lumen, conteniendo el lumen una inserción que puede o no puede eliminarse antes de la implantación.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] La presente invención se basa en el descubrimiento de que un constructo o dispositivo prevascularizado, y/o un dispositivo de inmunoaislamiento prevascularizado, puede utilizarse para mejorar las terapias celulares en un sujeto al prolongar considerablemente la viabilidad y la actividad de las células implantadas. En concreto, los inventores han descubierto que un sistema híbrido que utilice un dispositivo sintético o un dispositivo de inmunoaislamiento sintético en combinación con una microcirculación trasplantada permite que las células implantadas funcionen durante más tiempo, aumentando por tanto su eficacia terapéutica. Asimismo, el uso de este dispositivo mejorado elimina la necesidad de fármacos inmunosupresores y los efectos secundarios relativos relacionados. Este descubrimiento presenta amplias consecuencias en el tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos caracterizados por niveles insuficientes de uno o más agentes biológicamente activos particulares, incluyendo, pero sin carácter limitativo, la diabetes.

[0012] En consecuencia, la presente invención proporciona un dispositivo implantable según la reivindicación 1 para proporcionar un agente biológicamente activo a un sujeto, comprendiendo un constructo de microvasos que está en contacto con una bolsa biocompatible y semipermeable, donde la bolsa encapsula células o tejido capaz de producir el agente biológicamente activo. La invención incluye constructos de microvasos donde los vasos del constructo de microvasos son singénicos al sujeto. Las células o tejidos implantados pueden ser alogénicos o singénicos al sujeto. En un modo de realización, las células o tejidos implantados secretan o producen insulina. En un modo de realización preferido, las células implantadas son célula de islote beta que producen insulina.

[0013] La bolsa de la presente invención puede estar compuesta por cualquier polímero biocompatible degradable, bioabsorbible o no degradable. En un modo de realización preferido, la bolsa comprende

politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). En otro modo de realización preferido, la bolsa comprende polietileno tereftalato (PET). En un modo de realización adicional de la presente invención, el dispositivo es un dispositivo de inmunoaislamiento, en el que la bolsa comprende un material semipermeable o permeable de manera selectiva que permite el paso de al menos un agente biológico, además de los nutrientes incluyendo, pero sin carácter limitativo, oxígeno y glucosa, y evita el paso de células inmunes y moléculas inmunes humorales más grandes.

[0014] Un experto en la materia apreciará que el sujeto de la presente invención puede ser cualquier animal, incluyendo anfibios, aves, peces, mamíferos y marsupiales, pero es preferiblemente un mamífero (por ejemplo, un humano; un animal doméstico, como un gato, perro, mono, ratón y rata; o un animal comercial, como una vaca, caballo o cerdo). De forma adicional, el sujeto de la presente invención puede ser de cualquier edad, incluido un feto, un embrión, un niño, y un adulto. En un modo de realización preferido de la presente invención, el sujeto es humano.

[0015] La presente invención también proporciona métodos para tratar o evitar una enfermedad o trastorno en un sujeto comprendiendo implantar en el sujeto un dispositivo comprendiendo un constructo de microvasos en contacto con una bolsa biocompatible y semipermeable, encapsulando la bolsa una célula o células capaces de producir una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente biológicamente activo. Los vasos del constructo de microvasos pueden ser singénicos al sujeto, y las células o tejidos implantados pueden ser alogénicos o singénicos al sujeto. En un modo de realización de la invención, el trastorno es la diabetes, y las células o tejidos implantados secretan o producen insulina. En un modo de realización preferido, el trastorno es diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2, y las células implantadas son células secretoras de insulina, tales como células de islote beta.

[0016] La bolsa puede estar compuesta por cualquier polímero biocompatible degradable, bioabsorbible o no degradable. En un modo de realización preferido, la bolsa comprende politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) o polietileno tereftalato (PET). En un modo de realización adicional, el dispositivo es un dispositivo de inmunoaislamiento, en el que la bolsa comprende un material semipermeable o permeable de manera selectiva que permite el paso de al menos un agente biológico, además de los nutrientes incluyendo, pero sin carácter limitativo, oxígeno y glucosa, y evita el paso de células inmunes y moléculas inmunes humorales más grandes.

[0017] En concreto, también se proporcionan métodos para tratar o prevenir la diabetes en un sujeto comprendiendo la implantación en el sujeto de un dispositivo comprendiendo un constructo de microvasos en contacto con una bolsa biocompatible y semipermeable, encapsulando la bolsa una célula o células capaces de producir una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina. En un modo de realización preferido, la diabetes es diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2, y las células que producen insulina son células de islote beta.

[0018] Además, también se describe un método para vascularizar un tejido modificado en un sujeto que comprende la combinación de al menos un constructo prevascularizado con el tejido modificado, donde el constructo contiene células resuspendidas de un pellet celular endotelial autólogo recién aislado; y luego la implantación del tejido modificado, vascularizando por tanto el tejido modificado *in vivo*. La combinación comprende fijar al menos un constructo prevascularizado al tejido modificado. La fijación puede incluir suturar, grapar, pegar o combinaciones de los mismos. El constructo prevascularizado puede contener células de al menos un pellet celular endotelial obtenido a partir de tejido vascular. El tejido vascular puede ser piel, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido del apéndice auricular del corazón, pulmonar, del mesenterio o adiposo. Preferiblemente, el pellet endotelial vascular se obtiene de un humano.

[0019] Los tejidos modificados de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en tejido cardíaco, tejido pulmonar, tejido muscular cardíaco, tejido muscular estriado, tejido hepático, tejido pancreático, cartílago, hueso, pericardio, peritoneo, riñón, músculo liso, piel, tejido mucosal, intestino delgado e intestino grueso. El tejido modificado puede inyectarse en un sujeto utilizando, por ejemplo, una jeringa, aguja, cánula, catéter, tubo o microaguja.

[0020] También se proporcionan métodos para revascularizar un tejido o un órgano de un sujeto que lo necesite, al inyectar en el tejido u órgano al menos un constructo prevascularizado que contenga células resuspendidas de un pellet celular endotelial autólogo recién aislado, y revascularizando por tanto el tejido u órgano *in vivo*. Tal como se ha descrito anteriormente, el tejido vascular puede incluir piel, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido del apéndice auricular del corazón, pulmonar, del mesenterio o adiposo. Asimismo, el tejido adiposo puede incluir grasa omental, grasa peritoneal, grasa perirrenal, grasa pericárdica, grasa subcutánea, grasa mamaria, o grasa epididimal. El tejido adiposo puede obtenerse mediante liposucción, abdominoplastia, o combinaciones de los mismos.

[0021] Además, el órgano que necesite una revascularización puede incluir, sin carácter limitativo, el corazón, pulmón, músculo cardíaco, músculo estriado, hígado, páncreas, riñón, piel, cerebro, ojos, vejiga, tráquea, diafragma, ovarios, trompas de Falopio, útero, intestino delgado o intestino grueso. En otro modo de realización, el constructo prevascularizado comprende al menos una Célula Relevante, que puede ser, sin carácter limitativo, una neurona, miocardiocito, condrocito, célula acinar pancreática, islote de Langerhans, osteocito, hepatocito, célula de Kupffer, fibroblasto, miocito, mioblasto, célula satélite, adipocito, preadipocito, célula epitelial biliar,

célula de Purkinje, o célula marcapasos. Además, en otro modo de realización, el constructo prevascularizado puede incluir una citoquina, una quimioquina, un antibiótico, un fármaco, un agente analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, o cualquier combinación de los mismos.

5 **[0022]** También se proporcionan métodos para revascularizar un tejido u órgano de un sujeto, al tratar la superficie de un biomaterial poroso con células de al menos un pellet celular endotelial obtenido de tejido vascular, en el que las células se depositan sobre la superficie del material y se implantan inmediatamente en el sujeto.

10 **[0023]** Los procesos descritos anteriormente pueden incorporarse en los métodos de creación de tejidos para establecer, antes de la implantación, una vasculatura funcional dentro de un tejido u órgano con tejido modificado. La caracterización del lecho capilar formado en el cultivo y en la vasculatura resultante presente tras la implantación indica que los vasos cultivados tienen el potencial de diferenciarse o convertirse en el tipo de vasculatura requerida para cumplir con las necesidades específicas del tejido. Lo que implica es que puede ser posible producir cambios en esta microvasculatura de "base" fundamental creada en el laboratorio e impartir un nuevo carácter al lecho microvascular para ajustarse al tipo de tejido que se está construyendo. Por ejemplo, el músculo cardíaco modificado tendrá una densidad capilar relativamente alta, mientras que la vasculatura de un organoide de hígado exhibirá un carácter típico similar a un capilar sinusoidal. El proceso de prevascularización expuesto en el presente documento presenta un gran potencial para incorporar una red vascular dentro de un tejido modificado y modificarlo para que se ajuste a un tejido particular de interés, resolviendo por tanto un obstáculo considerable en la modificación de tejidos.

20 **[0024]** En tejidos que sufren las consecuencias de una enfermedad isquémica crónica, como tras un infarto de miocardio o una enfermedad vascular periférica, una expansión de la vasculatura adyacente a las áreas del tejido afectado en las zonas isquémicas ofrece un mecanismo mediante el cual pueden recuperarse estos tejidos. La implantación del constructo prevascularizado podría actuar como un estímulo y núcleo para la revascularización de las zonas afectadas. En este sentido, el implante actuaría como un núcleo de crecimiento vascular, estableciendo rápidamente una nueva red vascular dentro de la zona "hipovascular" o previamente avascular. Los inventores tienen pruebas de que la presencia de vasos modificados conserva la integridad del tejido circundante. La inserción de estos constructos prevascularizados no solo proporcionara una rápida reperfusión de los tejidos dañados, sino que también soporta la reestructuración y reparación de estos tejidos. Al incorporar células madre, células progenitoras o Células Relevantes en el constructo prevascularizado, se proporcionan células útiles para la reestructuración, reparación y/o repoblación de los tejidos u órganos dañados. En determinados modos de realización, se proporcionan métodos para estimular o inducir la revascularización de al menos un tejido o al menos un órgano. En determinados modos de realización, el tejido u órgano puede ser isquémico y/o tener una zona o región que sea avascular o hipovascular, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, una enfermedad isquémica crónica, como tras un infarto de miocardio, una enfermedad vascular periférica, o un accidente cerebrovascular (apoplejía).

35 **[0025]** Las estrategias de terapia génica actuales se ven afectadas por las dificultades en conseguir con éxito que el gen deseado se incorpore en las células del paciente y que la proteína terapéutica (producida por el gen recombinante) se distribuya por todo el cuerpo. El uso de estos constructos prevascularizados en la distribución de genes proporciona 1) un medio mediante el cual las células modificadas genéticamente incluidas en el constructo de tejido presentan un fácil acceso al flujo sanguíneo (el intercambio molecular desde y hacia el flujo sanguíneo se produce mejor en los capilares) y 2) los propios elementos del cultivo de vasos son susceptibles a la modificación genética y pueden actuar como la fuente del producto génico terapéutico. Los constructos prevascularizados proporcionan un medio potencial para resolver este problema.

40 **[0026]** En determinados modos de realización, se dan a conocer constructos prevascularizados que comprenden células modificadas genéticamente. Tales constructos prevascularizados que comprenden células modificadas genéticamente son útiles en los métodos de vascularización y revascularización de la invención.

[0027] El diseño y función de la presente invención, además de sus ventajas, se apreciará con más detalle haciendo referencia a la siguiente descripción detallada con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 **[0028]** Muchos aspectos de la exposición pueden entenderse mejor haciendo referencia a las siguientes figuras que ilustran con más claridad los principios de la presente exposición.

La FIG. 1 representa la revascularización de un constructo de microvasos. La tinta negra muestra la patencia de los vasos trasplantados.

55 La FIG. 2 ilustra un sistema híbrido que utiliza un dispositivo de inmunoaislamiento sintético (PVID) y una microcirculación trasplantada. Las flechas indican el dispositivo de inmunoaislamiento en contacto con el constructo de microvasos.

La FIG. 3 muestra una microcirculación formada alrededor de un biomaterial que se ha tratado con un pellet endotelial vascular.

La FIG. 4 muestra un dispositivo de inmunoaislamiento prevascularizado (PVID). Las flechas indican las células encapsuladas, el biomaterial semiporoso, y las células de un pellet vascular endotelial en contacto con el biomaterial semiporoso.

5 La FIG. 5 representa un constructo vascularizado (implante intercalado) en el que las células de islote (tintadas en verde en la micrografía) se sitúan o se "intercalan" entre las células vasculares del propio paciente (tintadas en rojo en la micrografía).

10 La FIG. 6 representa un constructo vascularizado (implante intercalado) en el que las células de islote (tintadas en verde en la micrografía) están situadas o "intercaladas" entre un biomaterial poroso (ePTFE), y el constructo del islote/ePTFE está situado o "intercalado" además entre las células vasculares del propio paciente.

La FIG. 7 representa una tinción de insulina en un páncreas de control, y en implantes intercalados tras 7, 14 y 28 días. Las imágenes demuestran que había cantidades detectables de insulina en todos los puntos de medición. Asimismo, se vio una producción de insulina en islotes intactos, así como en islotes parcialmente disociados.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN

[0029] Tal como se entiende en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. De forma adicional, los encabezados de las secciones utilizados en el presente documento son solo con fines organizativos y no deben interpretarse como que limitan el asunto descrito.

20 **[0030]** La presente invención se basa en el descubrimiento de que constructos o dispositivos prevascularizados, incluyendo los de inmunoaislamiento prevascularizado, pueden mejorar la eficacia de las terapias basadas en células en un sujeto al prolongar considerablemente la viabilidad y la actividad de las células implantadas. Cabe destacar que el uso de los constructos o dispositivos o de la invención elimina la necesidad de fármacos inmunosupresores y sus efectos secundarios relativos relacionados. Estos descubrimientos presentan amplias
25 consecuencias en el tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos caracterizados por niveles insuficientes de uno o más agentes biológicamente activos particulares, incluyendo, pero sin carácter necesariamente limitativo, la diabetes.

[0031] En un aspecto, la presente invención presenta un dispositivo implantable para proporcionar un agente biológicamente activo a un sujeto, comprendiendo un constructo de microvasos que está en contacto con una
30 bolsa biocompatible y semipermeable, donde la bolsa encapsula células o tejidos capaces de producir el agente biológicamente activo. La invención incluye constructos de microvasos donde los vasos del constructo de microvasos son singénicos al sujeto. Las células o tejidos implantados pueden ser alogénicos o singénicos al sujeto. En un modo de realización, las células o tejidos implantados secretan o producen insulina. En un modo de realización preferido, las células implantadas son célula de islote beta que producen insulina.

35 **[0032]** En el contexto de la presente invención, el término "agente biológicamente activo" se refiere a cualquier sustancia que sea capaz de ejercer un efecto biológicamente útil en el sujeto. Por consiguiente, un agente biológicamente activo incluye cualquier molécula, producto o soluto biológicamente activo que proporcione una función o capacidad metabólica, como la eliminación de solutos específicos del flujo sanguíneo; o una sustancia o molécula biológicamente activa como, a modo de ejemplo no limitativo, una enzima, factor trófico, hormona,
40 neurotransmisor, neuromodulador o modificador de la respuesta biológica.

[0033] La bolsa de la presente invención puede estar comprendida de cualquier polímero biocompatible degradable, bioabsorbible o no degradable. En un modo de realización preferido, la bolsa comprende politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). En otro modo de realización preferido, la bolsa comprende polietileno tereftalato (PET). En un modo de realización adicional de la presente invención, el dispositivo es un
45 dispositivo de inmunoaislamiento, en el que la bolsa comprende un material semipermeable o permeable de manera selectiva que permite el paso de al menos un agente biológico, además de los nutrientes incluyendo, pero sin carácter limitativo, oxígeno y glucosa, y evita el paso de células inmunes y moléculas inmunes humorales más grandes.

[0034] Un experto en la materia apreciará que el sujeto de la presente invención puede ser cualquier animal, incluyendo anfibios, aves, peces, mamíferos y marsupiales, pero es preferiblemente un mamífero (por ejemplo, un humano; un animal doméstico, como un gato, perro, mono, ratón y rata; o un animal comercial, como una vaca, caballo o cerdo). De forma adicional, el sujeto de la presente invención puede ser de cualquier edad, incluido un feto, un embrión, un niño, y un adulto. En un modo de realización preferido de la presente invención, el sujeto es humano.

55 **[0035]** También se describen métodos para tratar o evitar una enfermedad o trastorno en un sujeto comprendiendo implantar en el sujeto un dispositivo comprendiendo un constructo de microvasos en contacto con una bolsa biocompatible y semipermeable, encapsulando la bolsa una célula o células capaces de producir una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente biológicamente activo. Los vasos del constructo de

microvasos pueden ser singénicos al sujeto, y las células o tejidos implantados pueden ser alogénicos o singénicos al sujeto. El trastorno puede ser la diabetes, y las células o tejidos implantados secretan o producen insulina. En concreto, el trastorno es diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2, y las células implantadas son células secretoras de insulina, tales como células de islote beta.

- 5 **[0036]** También se proporciona un método para vascularizar un tejido modificado en un sujeto que comprende la combinación de al menos un constructo prevascularizado con el tejido modificado, donde el constructo contiene células resuspendidas de un sedimento celular endotelial autólogo recién aislado; y luego la implantación del tejido modificado, vascularizando por tanto el tejido modificado *in vivo*. La Fig. 3, por ejemplo, muestra una microcirculación creada alrededor de un biomaterial que se ha tratado con un pellet endotelial vascular. La
- 10 combinación en el contexto de la invención puede incluir la unión de al menos un constructo prevascularizado al tejido modificado. La Fig. 5 y la Fig. 6, por ejemplo, representan constructos "intercalados" vascularizados en los que las células de islote se sitúan o "intercalan" entre las células vasculares del propio paciente, o de forma alternativa, se "intercalan" entre un biomaterial poroso, en el que el constructo de biomaterial/islotes puede intercalarse de manera adicional entre las células vasculares del propio paciente.
- 15 **[0037]** El término "unido" puede incluir suturas, grapas, pegamento, u otros métodos conocidos por los expertos de la materia o cualquier combinación de los mismos. El constructo prevascularizado puede contener células de al menos un pellet celular endotelial obtenido a partir de tejido vascular. El tejido vascular puede ser piel, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido del apéndice auricular del corazón, pulmonar, del mesenterio o adiposo. En un modo de realización preferido, el pellet endotelial vascular se obtiene de un humano.
- 20 **[0038]** Los tejidos modificados de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en tejido cardíaco, tejido pulmonar, tejido muscular cardíaco, tejido muscular estriado, tejido hepático, tejido pancreático, cartílago, hueso, pericardio, peritoneo, riñón, músculo liso, piel, tejido mucosal, intestino delgado e intestino grueso. El tejido modificado puede inyectarse en un sujeto utilizando, por ejemplo, una jeringa, aguja, cánula, catéter, tubo o microaguja.
- 25 **[0039]** También se proporcionan métodos para revascularizar un tejido o un órgano de un sujeto que lo necesite, al inyectar en el tejido u órgano al menos un constructo prevascularizado que contenga células resuspendidas de un pellet celular endotelial autólogo recién aislado, y revascularizando por tanto el tejido u órgano *in vivo*. Tal como se ha descrito anteriormente, el tejido vascular puede incluir piel, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido del apéndice auricular del corazón, pulmonar, del mesenterio o adiposo. Asimismo, el tejido adiposo puede
- 30 incluir grasa omental, grasa properitoneal, grasa perirrenal, grasa pericardíaca, grasa subcutánea, grasa mamaria, o grasa epididimal. En un aspecto de la invención, el tejido adiposo se obtiene mediante liposucción, abdominoplastia, o combinaciones de los mismos.
- [0040]** Además, el órgano que necesite una revascularización puede incluir, sin carácter limitativo, el corazón, pulmón, músculo cardíaco, músculo estriado, hígado, páncreas, riñón, piel, cerebro, ojos, vejiga, tráquea,
- 35 diafragma, ovarios, trompas de Falopio, útero, intestino delgado o intestino grueso. En otro modo de realización, el constructo prevascularizado comprende al menos una Célula Relevante, que puede ser, sin carácter limitativo, una neurona, miocardiocito, condrocito, célula acinar pancreática, islote de Langerhans, osteocito, hepatocito, célula de Kupffer, fibroblasto, miocito, mioblasto, célula satélite, adipocito, preadipocito, célula epitelial biliar, célula de Purkinje, o célula marcapasos. Además, en otro modo de realización, el constructo prevascularizado
- 40 puede incluir una citoquina, una quimioquina, un antibiótico, un fármaco, un agente analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, o cualquier combinación de los mismos.
- [0041]** También se proporcionan métodos para revascularizar un tejido u órgano de un sujeto, al tratar la superficie de un biomaterial poroso con células de un pellet celular endotelial obtenido a partir de tejido vascular, en el que las células se depositan sobre la superficie del material y se implantan inmediatamente en el sujeto.
- 45 **[0042]** El término "cultivo tridimensional" se utiliza en el sentido amplio en el presente documento y hace referencia a una composición que comprende una estructura, una matriz biocompatible, o similares. El cultivo tridimensional puede ser líquido, gel, semisólido, o sólido a 25 °C. El cultivo tridimensional puede ser biodegradable o no biodegradable. Algunos materiales de ejemplo del cultivo tridimensional incluyen polímeros e hidrogeles que comprenden colágeno, fibrina, quitosano, MATRIGEL, polietilenglicol, dextranos que incluyen
- 50 dextranos fotorreticulables o reticulables químicamente, y similares. En determinados modos de realización, el cultivo tridimensional comprende componentes alogénicos, componentes autólogos; o componentes alogénicos y componentes autólogos. En determinados modos de realización, el cultivo tridimensional comprende materiales sintéticos o semisintéticos. En determinados modos de realización, el cultivo tridimensional comprende una estructura o armazón, como un soporte derivado de la fibrina. El término "soporte" también se utiliza en el sentido
- 55 amplio en el presente documento. Por consiguiente, los soportes incluyen una amplia variedad de estructuras tridimensionales, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, una malla, una rejilla, una esponja, espuma, o similares.
- [0043]** Los términos "tejido modificado", "constructo de tejido modificado", o "constructo modificado de tejido", tal como se utilizan en el presente documento, hacen referencia a un tejido u órgano que se produce, por completo
- 60 o en parte, utilizando técnicas de modificación de tejidos. Pueden encontrarse descripciones de estas técnicas

en, entre otros sitios, *Principles of Tissue Engineering*, 2ª ed., Lanza, Langer, & Vacanti, eds., Academic Press, 2000 (en lo sucesivo, "Lanza et al."); *Methods of Tissue Engineering*, Atala & Lanza, eds., Academic Press, 2001 (en lo sucesivo, "Atala et al."); *Animal Cell Culture*, Masters, ed., Oxford University Press, 2000, (en lo sucesivo, "Masters"), en concreto el Capítulo 6; y la patente estadounidense N.º 4,963,489 y patentes estadounidenses relacionadas.

[0044] El término "fragmento de microvaso" tal como se entiende en el presente documento hace referencia a un segmento o pieza de tejido vascular, incluyendo al menos una parte o segmento de al menos una arteria, arteriola, capilar, vénula o vena. Normalmente, un microvaso incluye células endoteliales dispuestas en un tubo rodeado por una o más capas de células murales, como células musculares lisas, o pericitos, y puede comprender además componentes de matriz extracelular, como proteínas de membrana basal. En determinados modos de realización, los fragmentos de microvasos se obtienen de tejido vascular, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, piel, músculo esquelético, músculo cardíaco, el apéndice atrial del corazón, pulmón, mesenterio o tejido adiposo. En determinados modos de realización, los fragmentos de microvasos de tejido adiposo se obtienen a partir de, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, grasa subcutánea, grasa perirrenal, grasa pericárdica, grasa omental, grasa mamaria, grasa epididimal, grasa properitoneal, y similares. El experto en la materia apreciará que otros depósitos de grasa o cualquier tejido u órgano con abundante vascularización pueden servir como una fuente de fragmentos de microvasos para su uso en la invención, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, piel, músculo, incluyendo músculo esquelético o músculo cardíaco, pulmón y mesenterio. En determinados modos de realización, los fragmentos de microvasos se obtienen de tejido adiposo recolectado por liposucción o abdominoplastia. El tejido adiposo recogido por un procedimiento de liposucción en el que no se utilice una sonda sónica durante el proceso de recolección es particularmente útil.

[0045] El término "pellet celular endotelial" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a una masa de células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales vasculares, preparadas conforme cualquiera de los métodos de formación de pellets celulares conocidos por los expertos en la materia. En determinados modos de realización, un microvaso incluye células endoteliales dispuestas en un tubo rodeado por una o más capas de células murales, como células musculares lisas, o pericitos, y puede comprender además componentes de matriz extracelular, como proteínas de membrana basal. En determinados modos de realización, los pellets de células endoteliales se obtienen de tejido vascular, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, piel, músculo esquelético, músculo cardíaco, el apéndice atrial del corazón, pulmón, mesenterio o tejido adiposo. En determinados modos de realización, los pellets de células endoteliales de tejido adiposo se obtienen a partir de, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, grasa subcutánea, grasa perirrenal, grasa pericárdica, grasa omental, grasa mamaria, grasa epididimal, grasa properitoneal, y similares. El experto en la materia apreciará que otros depósitos de grasa o cualquier tejido u órgano con abundante vascularización puede servir como una fuente de pellets de células endoteliales para su uso en la invención, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, piel, músculo, incluyendo músculo esquelético o músculo cardíaco, pulmón y mesenterio. En determinados modos de realización, los pellets de células endoteliales se obtienen de tejido adiposo recolectado por liposucción o abdominoplastia. El tejido adiposo recogido por un procedimiento de liposucción en el que no se utilice una sonda sónica durante el proceso de recolección es particularmente útil.

[0046] Los términos "vascularizar", "vascularizante" o "vascularización" tal como se utilizan en el presente documento hacen referencia a proporcionar una red vascular funcional o considerablemente funcional a un órgano o tejido, en particular a un tejido modificado. Una red vascular funcional o sustancialmente funcional es una que irriga o es capaz de irrigar el tejido u órgano para satisfacer algunas o todas las necesidades nutricionales del tejido u órgano, la demanda de oxígeno, y las necesidades de eliminación de los productos de desecho. Un tejido vascular es un tejido natural que es rico en elementos vasculares, como microvasos, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, el tejido adiposo.

[0047] Los términos "revascularizar", "revascularizante", "neovascularización" o "revascularización" tal como se utilizan en el presente documento, hacen referencia a revisar una red vascular existente o a establecer una nueva red vascular funcional o sustancialmente funcional en un tejido u órgano que tenga una zona avascular o hipovascular, normalmente debido a una enfermedad, defecto congénito o lesión. Asimismo, la aplicación tópica de determinados agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, 5-fluorouracilo (5-FU), también puede resultar en una zona isquémica o avascular. Dicho tejido u órgano avascular o hipovascular a menudo es totalmente o parcialmente disfuncional o tiene una función limitada y puede necesitar una revascularización. Revascularizar dicho tejido u órgano puede resultar en una función restaurada o aumentada.

[0048] Tal como se entiende en el presente documento, el término "polímero" se utiliza en sentido amplio y pretende incluir una gran variedad de polímeros biocompatibles, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, homopolímeros, copolímeros, polímeros bloque, polímeros reticulados o reticulables, polímeros fotoiniciados, polímeros iniciados químicamente, polímeros biodegradables, polímeros no biodegradables, y similares. En otros modos de realización, el constructo prevascularizado comprende una matriz de polímeros que no está polimerizada, para permitir que se combine con un tejido, órgano o tejido modificado en un estado líquido o semilíquido, por ejemplo, por inyección. En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado comprendiendo una matriz líquida puede polimerizarse o polimerizarse considerablemente "in vitro". En

determinados modos de realización, el constructo prevascularizado está polimerizado o considerablemente polimerizado antes de la inyección. Tales composiciones inyectables se preparan utilizando materiales convencionales y métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin carácter limitativo, Knapp et al., *Plastic and Reconstr. Surg.* 60:389 405, 1977; Fagien, *Plastic and Reconstr. Surg.* 105:362 73 y 2526 28, 2000; Klein et al., *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 10:519 22, 1984; Klein, *J. Amer. Acad. Dermatol.* 9:224 28, 1983; Watson et al., *Cutis* 31:543 46, 1983; Klein, *Dermatol. Clin.* 19:491 508, 2001; Klein, *Pediat. Dent.* 21:449 50, 1999; Skorman, *J. Foot Surg.* 26:511 5, 1987; Burgess, *Facial Plast. Surg.* 8:176 82, 1992; Laude et al., *J. Biomech. Eng.* 122:231 35, 2000; Frey et al., *J. Urol.* 154:812 15, 1995; Rosenblatt et al., *Biomaterials* 15:985 95, 1994; Griffey et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 58:10 15, 2001; Stenborg et al., *Scand. J. Urol. Nephrol.* 33:355 61, 1999; Sciafani et al., *Facial Plast. Surg.* 16:29 34, 2000; Spira et al., *Clin. Plast. Surg.* 20:181 88, 1993; Ellis et al., *Facial Plast. Surg. Clin. North Amer.* 9:405 11, 2001; Alster et al., *Plastic Reconstr. Surg.* 105:2515 28, 2000; y las patentes estadounidenses n.º 3.949.073 y 5.709.854.

[0049] En determinados modos de realización, la matriz polimerizada o no polimerizada comprende colágeno, incluyendo geles de colágeno contraído y no contraído, hidrogeles comprendiendo, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, fibrina, alginato, agarosa, gelatina, hialuronato, polietilenglicol (PEG), dextranos, incluyendo dextranos que son adecuados para una reticulación química, fotorreticulación, o ambos, albúmina, poliacrilamida, ácido poliglicólico, policloruro de vinilo, alcohol polivinílico, poli(n-vinil-2-pirrolidona), poli(2-hidroxietil metacrilato), poliuretanos hidrófilos, derivados acrílicos, plurónicos, como óxido de polipropileno y copolímero de óxido de polietileno, o similares. En determinados modos de realización, la fibrina o colágeno es autógeno o alogénico con respecto al receptor previsto. El experto en la materia apreciará que la matriz puede comprender materiales no degradables, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), politetrafluoroetileno (PTFE), polietilenotereftalato (PET), poliuretano, polietileno, policarbonato, poliestireno, silicona y similares, o materiales degradables de forma selectiva, como ácido poli(láctico-co-glicólico); PLGA), PLA o PGA. (Véase también, Middleton et al., *Biomaterials* 21:2335 2346, 2000; Middleton et al., *Medical Plastics and Biomaterials*, Marzo/Abril 1998, pp. 30 37; *Handbook of Biodegradable Polymers*, Domb, Kost, & Domb, eds., 1997, Harwood Academic Publishers, Australia; Rogalla, *Minim. Invasive Surg. Nurs.* 1:67 69, 1997; Klein, *Facial Plast. Surg. Clin. North Amer.* 9:205 18, 2001; Klein et al., *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 11:337 39, 1985; Frey et al., *J. Urol.* 154:812 15, 1995; Peters et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 43:422 27, 1998; y Kuijpers et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 51:13645, 2000).

I. Constructos prevascularizados

[0050] Los términos "constructo prevascularizado" o "red microvascular artificial" hacen referencia a una composición comprendiendo al menos un fragmento de microvasos, o células de un pellet celular endotelial, normalmente aisladas de un tejido con abundante vascularización, en un cultivo tridimensional, incluyendo, pero sin carácter limitativo, una matriz, soporte, gel o líquido. En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados comprenden una matriz tridimensional y fragmentos de microvasos. En determinados modos de realización, la matriz comprende una estructura preformada, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, un soporte de fibrina. En determinados modos de realización, el cultivo tridimensional comprende una matriz polimerizada, considerablemente polimerizada o no polimerizada.

[0051] En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados se preparan combinando fragmentos de microvasos o células de un pellet celular endotelial, y un cultivo líquido tridimensional, como colágeno no polimerizado, agarosa, gelatina, otras matrices poliméricas sin polimerizar, o similares. En otros modos de realización, los fragmentos de microvasos o células de un pellet celular endotelial se siembran, se esparcen o se perfunden en o a través de un entorno de cultivo tridimensional semisólido o sólido, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, un marco, soporte, filtro de fibra hueca, o similar.

[0052] Los constructos prevascularizados pueden categorizarse como "constructos de microvasos cultivados" o "constructos de microvasos recién aislados". Un constructo de microvasos cultivados normalmente se incuba antes de la implantación. Por ejemplo, pero sin carácter limitativo, en una incubadora humidificada a 37 °C y con un 5 % de CO₂. Normalmente, dichos constructos de microvasos cultivados se incuban durante un periodo de una hora hasta treinta días, pero puede incubarse durante periodos más largos o más cortos, según se desee. El experto en la materia apreciará que el término "cultivado" puede o referirse o no al uso de métodos de incubación convencionales, como una incubadora con temperatura controlada. De forma alternativa, un constructo prevascularizado puede comprender un constructo de microvasos recién aislado que se haya sometido a poca o a ninguna incubación antes de utilizarlo. El experto en la materia apreciará que los constructos de microvasos recién aislados pueden, pero no necesitan, incubarse. En determinados modos de realización, un constructo de microvasos recién aislado comprende fragmentos de microvasos, o células de un pellet endotelial vascular, en un cultivo tridimensional que se ha "incubado" tras la introducción de microvasos, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, para permitir que el constructo se polimerice. En otros modos de realización, un constructo de microvasos recién aislado comprende un cultivo tridimensional líquido, según sea apropiado para la implantación por inyección (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses con n.º 5,709,854 y 6,224,893). Tales constructos líquidos pueden, pero no necesitan, polimerizarse *in vitro* en condiciones apropiadas.

[0053] El experto en la materia entenderá que los constructos prevascularizados que comprenden un cultivo tridimensional líquido no polimerizado que posteriormente se deja polimerizar o un gel son capaces de adoptar multitud de formas. Por consiguiente, en determinados modos de realización, la forma y el tamaño definitivo del constructo polimerizado depende, en parte, del tamaño y la forma del recipiente en el que se polimeriza el constructo. Por ejemplo, pero sin carácter limitativo, pueden prepararse constructos cilíndricos o tubulares utilizando tubos cónicos; pueden prepararse constructos en forma de discos utilizando placas con múltiples pocillos, pueden prepararse constructos planos utilizando superficies planas, por ejemplo, una placa Petri, la tapa invertida de una placa con múltiples pocillos, o una placa de fondo plano. Asimismo, en determinados modos de realización, los constructos prevascularizados polimerizados pueden cortarse o recortarse en una forma o tamaño deseado. Por consiguiente, pueden prepararse constructos prevascularizados prácticamente de cualquier tamaño y forma, antes de o durante el uso.

[0054] En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado comprende fragmentos de microvasos autólogos o células de un pellet celular endotelial, en un cultivo tridimensional autólogo o sustancialmente autólogo. En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados comprenden fragmentos de microvasos en un cultivo tridimensional comprendiendo un soporte, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, soportes derivados de la fibrina (véase, p. ej., Nicosia et al., *Lab. Invest.* 63:115 22, 1990) y soportes que comprenden polímeros biocompatibles sintéticos artificiales aprobados por la FDA, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, polietileno, polimetacrilato, poliuretano, vinilo, como policloruro de vinilo, siliconas, PLGA, PTFE, ePTFE, polipropileno, polietileno tereftalato (PET), nailon, poliacetida, y poliglicólico. Pueden encontrarse exposiciones de polímeros biocompatibles de ejemplo, soportes y otros materiales de matriz, incluyendo protocolos de su preparación y uso, entre otros sitios, en Atala et al., en concreto en los Capítulos 42 76; Lanza et al., en concreto en los Capítulos 21 y 22; y en *Handbook of Biodegradable Polymers*, Domb, Kost, & Domb, eds., 1997, Harwood Academic Publishers, Australia.

[0055] En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados comprenden fragmentos de microvasos que son autólogos o alogénicos en relación con el receptor humano o animal previsto. En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado comprende además al menos una citoquina, al menos una quimioquina, al menos un antibiótico, como un agente antimicrobiano, al menos un fármaco, al menos un agente analgésico, al menos un agente antiinflamatorio, al menos un agente inmunosupresor, o varias combinaciones de los mismos. En determinados modos de realización, la al menos una citoquina, al menos un antibiótico, al menos un fármaco, al menos un agente analgésico, al menos un agente antiinflamatorio, al menos un agente inmunosupresor o las varias combinaciones de los mismos comprenden un formato de liberación controlada, como los que se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, Richardson et al., *Nat. Biotechnol.* 19:102934, 2001.

[0056] Las citoquinas de ejemplo incluyen angiogenina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, incluyendo, pero sin carácter limitativo, VEGF-165), interleucinas, factores de crecimiento de fibroblastos, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, FGF-1 y FGF-2, factor de crecimiento de hepatocitos, (HGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), endotelinas, (como ET-1, ET-2 y ET-3), factor de crecimiento insulínico (IGF-1), angiopoyetinas, (como Ang-1, Ang-2, Ang-3/4), proteínas similares a la angiopoyetina (como ANGPTL1, ANGPTL-2, ANGPTL-3, y ANGPTL-4), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), incluyendo, pero sin carácter limitativo, PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento celular endotelial (ECGF), incluyendo ECGS, factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (PLGF), y similares. Las citoquinas, incluyendo citoquinas recombinantes, y las quimioquinas normalmente están disponibles comercialmente de varias fuentes, por ejemplo, R & D Systems (Minneapolis, Minn.); Endogen (Woburn, Wash.); y Sigma (St. Louis, Mo.). El experto en la materia entenderá que la elección de quimioquinas y citoquinas para la incorporación en constructos prevascularizados particulares dependerá, en parte, del órgano o tejido seleccionado a vascularizar o revascularizar.

[0057] En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados comprenden además al menos una célula modificada genéticamente. En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados que comprenden al menos una célula modificada genéticamente expresarán de forma constitutiva o expresarán de forma inducible al menos un producto génico codificado por la al menos una célula modificada genéticamente debido a alteraciones genéticas en al menos una célula modificada genéticamente inducidas por las técnicas conocidas en el ámbito de especialización. Pueden encontrarse descripciones de técnicas de manipulación genética, entre otros sitios, en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (incluyendo los suplementos de Marzo de 2002), John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a.sup. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a.sup. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; Beaucage et al., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2000 (incluyendo los suplementos de Marzo de 2002); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4^a.sup. Ed., Ausubel, Brent, & Moore, eds., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1999; Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, McGraw Hill Professional Publishing, 1995; *Molecular Biology Protocols* (véase la web highveld.com), y *Protocol Online* (protocol-online.net). Los productos génicos de ejemplo para modificar genéticamente las células

modificadas genéticamente de la invención incluyen activador del plasminógeno, CD4 soluble, Factor VIII, Factor IX, Factor de von Willebrand, uroquinasa, hirudina, interferones, incluyendo interferón alfa, beta y gamma, factor de necrosis tumoral, interleucinas, factor de crecimiento hematopoyético, anticuerpos, glucocerebrosidasa, adenosina deaminasa, fenilalanina hidroxilasa, hormona del crecimiento humana, insulina, eritropoyetina, VEGF, angiopoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, PLGF, y similares.

[0058] En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado comprende además células estromales apropiadas, células madre, Células Relevantes, o combinaciones de las mismas. Tal como se entiende en el presente documento, el término "células madre" se utiliza en el sentido amplio e incluye células madre tradicionales, células progenitoras, células preprogenitoras, células de reserva, y similares. Por ejemplo, las células madre incluyen células madre embrionarias, células madre adultas, células madre pluripotentes, células madre neurales, células madre hepáticas, células madre musculares, células madre precursoras del músculo, células progenitoras endoteliales, células madre de la médula ósea, células madre condrogénicas, células madre linfáticas, células madre del mesénquima, células madre hematopoyéticas, células madre del sistema nervioso central, células madre del sistema nervioso periférico, y similares. Pueden encontrarse descripciones de las células madre, incluyendo un método para aislarlas y cultivarlas, entre otros sitios, en *Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols*, Turksen, ed., Humana Press, 2002; Weisman et al., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:387 403; Pittinger et al., *Science*, 284:143 47, 1999; *Animal Cell Culture*, Masters, ed., Oxford University Press, 2000; Jackson et al., *PNAS* 96 (Shepherd BR et al. "Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 898-904, 2004):14482 86, 1999; Zuk et al., *Tissue Engineering*, 7:211 228, 2001 ("Zuk et al."); Atala et al., en concreto los Capítulos 33 41; y las patentes estadounidenses con n.º 5,559,022, 5,672,346 y 5,827,735. Pueden encontrarse descripciones de las células estromales, incluidos métodos para aislarlas, entre otros sitios, en Prockop, *Science*, 276:71 74, 1997; Theise et al., *Hepatology*, 31:235 40, 2000; *Current Protocols in Cell Biology*, Bonifacino et al., eds., John Wiley & Sons, 2000 (incluyendo las actualizaciones de Marzo de, 2002); y la patente estadounidense con n.º 4,963,489. El experto en la materia entenderá que las células madre y/o células estromales seleccionadas para su inclusión en un constructo prevascularizado normalmente son apropiadas para el uso previsto de este constructo.

[0059] El término "Células Relevantes", tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a células que son apropiadas para su incorporación en un constructo prevascularizado, basándose en el uso previsto de ese constructo. Por ejemplo, las Células Relevantes que son apropiadas para la reparación, reestructuración o repoblación de un hígado dañado puede incluir, sin carácter limitativo, hepatocitos, células epiteliales biliares, células de Kupffer, fibroblastos, y similares. Por ejemplo, las Células Relevantes para la incorporación en constructos prevascularizados incluyen neuronas, miocardiocitos, miocitos, condrocitos, células acinares pancreáticas, islotes de Langerhans, osteocitos, hepatocitos, células de Kupffer, fibroblastos, miocitos, mioblastos, células satélite, células endoteliales, adipocitos, preadipocitos, células epiteliales biliares, y similares. Estos tipos de células pueden aislarse y cultivarse mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. Pueden encontrarse técnicas de ejemplo, entre otros sitios, en Atala et al., en concreto en los Capítulos 9 32; Freshney, *Culture of Animal Cells A Manual of Basic Techniques*, 4ª ed., Wiley Liss, John Wiley & Sons, 2000; *Basic Cell Culture: A Practical Approach*, Davis, ed., Oxford University Press, 2002; *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, Masters, ed., 2000; y en la patente estadounidense con n.º 5.516.681 y 5.559.022.

[0060] El experto en la materia apreciará que dichas células estromales, células madre y/o Células Relevantes pueden incorporarse en los constructos prevascularizados durante o después de la preparación. Por ejemplo, pero sin carácter limitativo, puede conseguirse combinando fragmentos de microvasos, células madre, Células Relevantes y/o células estromales en un cultivo tridimensional líquido, como colágeno, fibrina o similar, o sembrando o esparciendo células madre, Células Relevantes, y/o células estromales en o sobre un constructo prevascularizado. Algunos ejemplos de combinaciones de células madre apropiadas, células estromales y Células Relevantes para su incorporación en constructos prevascularizados incluyen: islotes de Langerhans y/o células acinares pancreáticas en un constructo prevascularizado para revascularizar un páncreas dañado; hepatocitos, células progenitoras hepáticas, células de Kupffer, células endoteliales, células madre endodérmicas, fibroblastos hepáticos, y/o células hepáticas de reserva en un constructo prevascularizado para revascularizar un hígado dañado. Por ejemplo, pero sin carácter limitativo, las células estromales o células madre apropiadas para un constructo prevascularizado para vascularizar, reparar y reconstruir un hígado dañado o enfermo pueden comprender células hepáticas de reserva, células progenitoras hepáticas, como, pero sin carácter limitativo, fibroblastos hepáticos, células madre embrionarias, células madre hepáticas, cardiomiocitos, células de Purkinje, células marcapaso, mioblastos, células madre del mesénquima, células satélite, y/o células madre de la médula ósea para revascularizar un corazón isquémico o dañado (véase, p. ej., Atkins et al., *J. of Heart and Lung Transplantation*, Diciembre 1999, páginas 1173 80; Tomita et al., *Cardiovascular Research Institute, American Heart Association*, 1999, páginas 92 101; Sakai et al., *Cardiovascular Research Institute, American Heart Association*, 1999, páginas 108 14), y similares.

II. Métodos para vascularizar tejidos y órganos modificados

[0061] Se proporcionan métodos para vascularizar tejidos modificados que comprenden combinar al menos un constructo prevascularizado con un tejido modificado para producir un tejido modificado vascularizado. En

determinados modos de realización, los constructos prevascularizados para vascularizar tejidos modificados comprenden además al menos una célula madre, estromal, Célula Relevante, o célula modificada genéticamente. En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados para vascularizar tejidos modificados comprenden al menos una citoquina, quimioquina, antibiótico, fármaco, analgésico, antiinflamatorio o similar. Los métodos para preparar tejidos modificados se conocen bien en la técnica. Pueden encontrarse descripciones de dichas técnicas, entre otras partes, en Atala et al.; Lanza et al.; Masters; y en los documentos de patente estadounidense con n.º 4,963,489; 5,266,480; 5,510,254; 5,512,475; 5,516,680; 5,516,681; 5,518,915; 5,541,107; 5,578,485; 5,624,840; 5,763,267; 5,785,964; 5,792,603; 5,842,477; 5,858,721; 5,863,531; 5,902,741; 5,962,325; 6,022,743; 6,060,306; 6,121,042; y 6,218,182.

- 10 **[0062]** Según determinados métodos para vascularizar tejidos modificados, el término "combinar" comprende situar o implantar al menos un constructo prevascularizado en cualquier superficie de, dentro de, entre capas de, o adyacente al tejido modificado. La Fig. 6 y la Fig. 7, por ejemplo, representan constructos "intercalados" vascularizados en los que las células de islote se sitúan o "intercalan" entre las células vasculares del propio paciente, o de forma alternativa, se "intercalan" entre un biomaterial poroso, cuyo constructo de biomaterial/islotes puede intercalarse de manera adicional entre las células vasculares del propio paciente. Combinar puede comprender revestir el tejido modificado con un constructo prevascularizado. Por ejemplo, pero sin carácter limitativo, un tejido modificado se sumerge en un constructo prevascularizado líquido o un constructo prevascularizado líquido se vierte o pulveriza sobre un tejido modificado. Dicho constructo prevascularizado líquido que recubre el tejido modificado puede estar polimerizado. Dichos tejidos modificados revestidos pueden incubarse antes de la implantación en un receptor humano o animal. En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado se combina con el tejido modificado por inyección.

- 25 **[0063]** Los términos "inyectar", "inyección", o variantes de los mismos tal como se entienden en el presente documento se referirán a cualquier medio de expulsar o extrudir una sustancia, normalmente a través de un tubo o estructura que comprende una abertura externa o perforación. Dicho tubo o estructura puede ser flexible, rígida, o puede comprender al menos una parte flexible y al menos una parte rígida. Por ejemplo, entre los medios de inyección se incluye una jeringa con o sin una aguja, una cánula, un catéter, tubos flexibles, y similares. La distribución de un constructo prevascularizado también puede conseguirse mediante el uso de dispositivos que permeabilizan el tejido, como microagujas. En contraste con las inyecciones tradicionales con agujas hipodérmicas de un calibre estándar, las microagujas (normalmente definidas por un radio de curvatura de aproximadamente 0,1 μm) o las matrices de microagujas permeabilizan la piel o la capa de células endotelial al producir agujeros microscópicos. Estos agujeros, en efecto, actúan como conductos para la distribución de materiales y pueden aumentar la fijación o distribución de un constructo prevascularizado a un recipiente, tejido u órgano. Por consiguiente, el experto en la materia entenderá que cualquier estructura que comprenda una perforación o abertura externa a través de la cual al menos un constructo prevascularizado puede extruirse en o hacia dentro de un tejido u órgano, o cualquier estructura que pueda permeabilizar la superficie de un tejido y/o un órgano, incluido un tejido modificado, está dentro del alcance de la invención. En determinados modos de realización, dicho constructo inyectado se polimeriza *in vitro*, tras la inyección. En determinados modos de realización, dicho constructo prevascularizado inyectado comprende al menos un constructo de microvasos cultivado, al menos un constructo de microvasos recién aislado, o ambos.

- 40 **[0064]** En determinados modos de realización, combinar al menos un constructo prevascularizado con un tejido modificado comprende fijar al menos un constructo prevascularizado a al menos un tejido modificado, utilizando técnicas conocidas en el ámbito de especialización. Por ejemplo, algunos medios de fijación incluyen suturar, grapar, por ejemplo con grapas quirúrgicas, pegamento o adhesivo, como adhesivo quirúrgico, interacciones bioquímicas, como con la matriz extracelular, pegamento fotoactivado, pegamento de fibrina, pegamentos basados en acrilato, y similares.

- 50 **[0065]** En determinados modos de realización, combinar comprende situar el al menos un constructo prevascularizado entre las capas de un tejido modificado, como que al menos una superficie de al menos un constructo prevascularizado sea adyacente a, o esté en contacto con, al menos una superficie de al menos un tejido modificado. En determinados modos de realización, combinar comprende insertar o implantar al menos un constructo prevascularizado dentro de un tejido modificado, por ejemplo, pero sin carácter limitativo, dentro de un bolsillo diseñado, perforación, grietas, o similares. En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado se inserta con una incisión en el tejido modificado. En determinados modos de realización, combinar comprende envolver al menos un constructo prevascularizado en torno a o dentro de al menos un tejido modificado, de manera que el constructo prevascularizado envuelva o envuelva considerablemente el tejido modificado, o esté envuelto o considerablemente envuelto por el tejido modificado. En determinados modos de realización, combinar comprende formar o incorporar al menos un constructo prevascularizado en el tejido modificado durante el proceso de modificación del tejido. En determinados modos de realización, combinar comprende cultivar al menos un constructo prevascularizado en o dentro de un tejido modificado creciente durante el proceso de modificación de tejidos, como en un biorreactor. En determinados modos de realización, al menos un constructo prevascularizado se envuelve o se envuelve considerablemente con el tejido u órgano adyacente durante el proceso de modificación del tejido.

[0066] En determinados modos de realización, el tejido modificado combinado y al menos un constructo prevascularizado se incuban, por ejemplo, dentro de un biorreactor o incubadora humidificada, antes de la implantación *in vivo* en un receptor animal o humano. En determinados modos de realización, combinar comprende implantar al menos un tejido modificado que comprende al menos un constructo prevascularizado directamente dentro de un receptor animal o humano con poca o nada de incubación adicional.

[0067] En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado implantado sirve de sitio de nucleación para vascularizar el tejido modificado. En determinados modos de realización, las células estromales, células madre y/o Células Relevantes apropiadas del constructo prevascularizado soportarán la integración del tejido modificado dentro del receptor animal o humano. Los constructos que comprenden células modificadas genéticamente pueden producir productos recombinantes que se distribuyen sistemáticamente a través del flujo sanguíneo o que se reparten al microambiente local para propiciar la reparación, la curación de heridas, o similar.

III. Métodos para revascularizar tejidos u órganos heridos o dañados

[0068] Se proporcionan métodos para revascularizar tejidos u órganos dañados o lesionados, es decir, se proporcionan tejidos u órganos que necesiten revascularse y repararse o reconstruirse. En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados para revascularizar tejidos u órganos comprenden además al menos una célula estromal apropiada, célula madre, Célula Relevante, o célula modificada genéticamente. En determinados modos de realización, los constructos prevascularizados para revascularizar tejidos u órganos comprenden al menos una citoquina, quimioquina, antibiótico, fármaco, analgésico, antiinflamatorio o similar. En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado, una vez que se implanta *in vivo*, desarrollará un lecho vascular funcional y se unirá por anastomosis con el sistema vascular funcional adyacente e irrigará, o será capaz de irrigar, el tejido u órgano dañado.

[0069] Según determinados métodos para revascularizar tejidos u órganos, al menos un constructo prevascularizado se combina con el tejido u órgano y se genera un tejido u órgano revascularizado. Según determinados métodos para revascularizar tejidos u órganos, el término "combinar" comprende situar o implantar al menos un constructo prevascularizado en cualquier superficie de, dentro de, entre las capas de, o adyacente al tejido u órgano. En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado se implanta en el tejido u órgano por inyección. En determinados modos de realización, dicho constructo inyectado se polimerizará *in vitro*, tras la implantación. En determinados modos de realización, dicho constructo prevascularizado inyectado comprende al menos un constructo de microvasos cultivado, al menos un constructo de microvasos recién aislado, o ambos. En determinados modos de realización, combinar comprende unir al menos un constructo prevascularizado a al menos un tejido u órgano que necesite revascularizarse, utilizando técnicas conocidas en el ámbito de especialización, como las descritas anteriormente.

[0070] El experto en la materia entenderá que determinados tejidos y órganos están cubiertos por o contienen una capa de tejido fibroso, tejido conjuntivo, tejido adiposo, o similares, y que el tejido u órgano subyacente puede revascularizarse sin retirar esta capa. Dicha capa puede ser de origen natural (como una capa de serosa, una membrana de mucosa, una cápsula fibrosa, o similar), puede deberse a una fibrosis, necrosis o isquemia, debido a una enfermedad, defecto, lesión, o deficiencia bioquímica. Normalmente, los fragmentos de microvasos del constructo prevascularizado pueden penetrar en dicha capa y unirse por anastomosis con la vasculatura del tejido u órgano subyacente, revascularizando el tejido u órgano. Por consiguiente, combinar el constructo prevascularizado con el tejido u órgano que necesite revascularizarse, comprende situar el constructo prevascularizado sobre o en dicha capa. Por ejemplo, pero sin carácter limitativo, situar el constructo prevascularizado en las meninges para revascularizar el tejido cerebral; el epicardio para revascularizar el miocardio; el peritoneo y/o la serosa, para revascularizar partes del intestino grueso; la conjuntiva y/o subconjuntiva para revascularizar el ojo; la superficie traqueal para revascularizar la tráquea; la mucosa bucal para revascularizar la boca; la superficie de la pleura o la serosa para revascularizar el pulmón; la superficie de la pleura y/o peritoneo para revascularizar el diafragma; la piel para revascularizar úlceras cutáneas que no cicatrizan, como úlceras diabéticas; la superficie pericárdica para revascularizar el pericardio; y similares.

[0071] En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado, cuando se combina con el tejido u órgano dentro del animal o humano, desarrollará un lecho vascular funcional y se unirá por anastomosis con el sistema vascular funcional adyacente e irrigará el tejido u órgano dañado. En determinados modos de realización, el constructo prevascularizado implantado sirve de sitio de nucleación para revascularizar el tejido u órgano dañado. En determinados modos de realización, las células madre, células estromales, y/o Células Relevantes apropiadas del constructo prevascularizado soportarán la reestructuración y reparación del tejido u órgano dañado. Los constructos que comprenden células modificadas genéticamente pueden producir productos recombinantes que se distribuyan sistemáticamente a través del flujo sanguíneo o que se reparten al microambiente local para propiciar la reparación, la curación de las heridas, o similar.

[0072] La invención, tras haberse descrito anteriormente, puede entenderse mejor haciendo referencia a los ejemplos. Los siguientes ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos, y no deben interpretarse de manera que limiten el alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Sumario

[0073] Una tecnología médica para el trasplante de células de islote que evite el uso de fármacos inmunosupresores sigue siendo un objetivo principal para corregir la hiperglucemia en la diabetes. Estos experimentos evalúan un dispositivo de inmunoaislamiento novedoso que se fabrica utilizando una microcirculación prefabricada. Se estudia la habilidad de mantener la viabilidad de las células de islote *in vivo* utilizando este constructo prevascularizado. Los métodos de trasplante celular explorados presentan compatibilidad con el quirófano humano y se evalúa la viabilidad de traducir estos estudios preclínicos al entorno clínico humano para el tratamiento de la diabetes.

10 Evaluación del PVID

[0074] La implantación de cualquier dispositivo o tejido corre el riesgo de un fallo precoz debido al tiempo necesario para captar y establecer una vasculatura estable. Los inventores han desarrollado métodos para preformar un sistema microvascular adaptativo capaz de evolucionar rápidamente hacia un circuito de irrigación maduro eficiente tras la implantación. Al utilizar este sistema, un dispositivo para su uso con el trasplante de islotes se vasculariza previamente a fin de demostrar que al vascularizar previamente un constructo de inmunoaislamiento se acelera la formación de una microcirculación estable alrededor del constructo tras la implantación.

[0075] El constructo prevascularizado también se evalúa por su habilidad de soportar la función de los islotes a largo plazo tras el trasplante. En concreto, la habilidad de los PVID para proporcionar nutrientes a los islotes situados dentro de los dispositivos de inmunoaislamiento se evalúa a fin de demostrar que la formación acelerada de una microcirculación alrededor del dispositivo de inmunoaislamiento prolongará la función de las células de islote.

Dispositivos de inmunoaislamiento y la microcirculación

[0076] Una necesidad crítica en el trasplante de un aloinjerto de células de islote es el aislamiento de este material de aloinjerto del reconocimiento del sistema inmune y su posterior destrucción. Se están desarrollando una variedad de dispositivos de inmunoaislamiento que proporcionan posibles soluciones al problema de la respuesta inmunitaria (Berney T. and Ricordi C. "Immunoisolation of cells and tissues for transplantation". *Cell Transplantation* 8: 577-579, 1999). Se ha observado el uso de implantes sintéticos con una permeabilidad selectiva en relación con el desarrollo de dispositivos de inmunoaislamiento. Brauker ha observado que pueden fabricarse polímeros de un diseño específico que estimulen una respuesta angiogénica, dando como resultado un polímero con un valor comercial como un dispositivo de inmunoaislamiento (Brauker J.H. et al. "Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture", *Journal of Biomedical Materials Research* 29: 1517-1524, 1995). La capacidad de formar y mantener una microcirculación funcional en la superficie externa de estos dispositivos es fundamental para su futuro éxito biológico, dado que deben proporcionar nutrientes al tejido interno, retirar los productos celulares sintéticos, y mantener una barrera para la respuesta inmunitaria celular. Los inventores abordarán directamente una deficiencia significativa en los enfoques actuales que utilizan islotes implantados para superar la hiperglucemia. La estrategia de los inventores implica la integración de tecnologías novedosas existentes para alojar de forma única los trasplantes de islotes y crear un trasplante de islotes con viabilidad y actividad a largo plazo. El problema más crítico a abordar es la formación de una microcirculación estable en conjunto con estos dispositivos de inmunoaislamiento implantados.

Homeostasis microvascular

[0077] Dentro de la mayoría de tejidos maduros, la microcirculación ha alcanzado un equilibrio u homeostasis donde los nuevos vasos sanguíneos ni aumentan ni disminuyen su densidad. El endotelio capilar exhibe características morfológicas específicas para la función del tejido irrigado. Por ejemplo, los capilares que irrigan los islotes pancreáticos exhiben orificios en sus membranas, el endotelio del hígado exhibe huecos entre células para permitir un rápido intercambio celular y el endotelio del cerebro exhibe uniones apretadas entre células que establecen la barrera sangre-cerebro. La homeostasis en el crecimiento de vasos se regula por numerosos tipos de células y de factores metabólicos. Este equilibrio puede alterarse, dando como resultado en una estimulación del desarrollo de nuevos vasos; un proceso al que en general se le llama angiogénesis, y una estimulación de la regresión o degeneración de vasos. La curación de heridas es un ejemplo en el que la homeostasis microvascular o "angiostasis" se altera, resultando a menudo en un periodo de angiogénesis. Los eventos temporales de curación de heridas a menudo incluyen un periodo de "angiorregresión", resultando en, por ejemplo, un tejido de granulación que contiene de forma predominante capilares en un número limitado.

[0078] En el área de los implantes biomateriales y las respuestas cicatrizantes alrededor del implante, el desarrollo de una cápsula fibrosa vascular proporciona el ejemplo más pertinente de los elementos de la angiostasis, angiogénesis y angiorregresión (Auerbach R. et al. "Angiogenesis assays: a critical overview." *Clin Chem* 49: 32-40, 2003; Djonov V. et al. "Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis". *Cell Tissue Res* 2003; Folkman J. "Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors". *Am Surg* 175: 409-416, 1972;

Folkman J. "Tumor angiogenesis". *Adv Cancer Res* 19: 331-358, 1974; Hoving J.B. et al. "Heterogeneity in Angiogenesis". En: *Genetics of Angiogenesis*, editado por Hoving J.B. BIOS Scientific Publishers Ltd., 2003, p. 191-203; Ingber D.E. "Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology". *Circ Res* 91: 877-887, 2002; Kale S. et al. "Microarray analysis of in vitro pericyte differentiation reveals an angiogenic program of gene expression". *FASEB J* 19: 270-271, 2005; Pierce S. y Skalak T.C. "Microvascular remodeling: a complex continuum spanning angiogenesis to arteriogenesis". *Microcirculation* 10: 99-111, 2003; Hoving J.B. et al. "The involvement of proteases and protease inhibitors in neovascularization". *Acta Biol Med Ger* 40: 1259-1263, 1981; Wahlberg E. "Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia". *J Vasc Surg* 38: 198-203, 2003). Esta homeostasis se alterará hacia el desarrollo de una microcirculación madura completamente funcional en conjunto con los dispositivos y materiales implantados.

[0079] Los mecanismos que subyacen a la formación de una microcirculación durante el desarrollo (vasculogénesis) y de una vasculatura existente (angiogénesis) están evaluándose intensamente por parte de numerosos investigadores (Ashley RA et al. "Erythropoietin stimulates vasculogenesis in neonatal rat mesenteric microvascular endothelial cells". *Pediatr Res* 51: 472-478, 2002; Flamme I et al. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo". *Dev Biol* 169: 699-712, 1995; Risau W & Flamme I. "Vasculogenesis". [Análisis] [122 refs]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 11: 73-91, 1995; Shalaby F. et al. "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice". *Nature* 376: 62-66, 1995). Además de los estudios que evalúan el proceso de desarrollo vascular, condiciones patológicas como el cáncer y la cardiopatía isquémica están evaluándose intensamente para determinar si el control de los procesos angiogénicos puede utilizarse para alterar la progresión de la patología. Durante estos estudios, se han dilucidado numerosos caminos comunes para controlar la angiogénesis y en general, pueden clasificarse en relación con los factores de crecimiento y sus receptores (p. ej., VEGF, FGF), metaloproteasas, y proteínas de la matriz extracelular. La formación de una microvasculatura en conjunto con un dispositivo de inmunoaislamiento basado en ePTFE se acelera para proporcionar una restauración rápida del flujo normal de nutrientes a los islotes trasplantados.

Constructos prevascularizados para la irrigación de tejidos

[0080] El constructo microvascular está basado en un sistema de angiogénesis en 3-D comprendido por elementos de microvasos intactos aislados (p.ej., arteriolas, capilares y vénulas) suspendidos y cultivados en un gel de colágeno tridimensional. Estos elementos de vasos crecen de manera similar a *in vivo*, formando finalmente una colección elaborada de microvasos que llenan el espacio del gel de colágeno. Los nuevos microvasos (neovasos) que se forman conservan una estructura tubular evidente, mantienen células murales asociadas y remodelan la matriz de colágeno circundante. Los fragmentos de los vasos de este sistema de cultivo son sensibles a la presencia de células cocultivadas y factores de crecimiento exógenos. Cabe destacar que los fragmentos de microvasos integrados en este sistema llevan a cabo las mismas etapas de angiogénesis *in vivo* al elaborar primero numerosos "brotes" de vasos. La angiogénesis en el sistema *in vitro* de la invención comienza en el 4º día de la creación de los cultivos y es dinámico, con nuevos brotes formándose y retrocediendo en un día. Al 11º día en el cultivo, han crecido varios fragmentos para formar una colección de neovasos simples alargados con un diámetro medio de $24,8 \pm 6,8$ micras ($n=39$). Estos neovasos tienen un lumen evidente y una baja densidad de células perivasculares positivas en alfa-actina. A diferencia de lo que ocurre con las células endoteliales cultivadas, los fragmentos de vasos de la construcción microvascular forman nuevos vasos a partir de vasos existentes, la definición distintiva de la angiogénesis.

[0081] Los inventores evaluaron la habilidad de este constructo microvascular de interactuar con una vasculatura existente y formar un lecho microvascular funcional al implantar los constructos en ratones inmunodeprimidos (SCID). Los constructos se situaron bajo la piel y en contacto directo con la musculatura dorsal. Tras un análisis general de los implantes, los inventores observaron vasos superficiales llenos de sangre asociados con constructos microvasculares pero no con los controles del gel de colágeno avascular. La histología de los constructos microvasculares explantados revela la presencia de sangre en los vasos y vasos heterogéneos en la red vascular del constructo. Los inventores observaron toda la variedad de tipos de vasos que normalmente se ven en un lecho vascular maduro funcional, incluyendo pequeñas arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas. El análisis de la unión por anastomosis mediante una perfusión de tinta (Figura 1), reveló que los vasos de dentro del constructo eran continuos con la vasculatura huésped, (y por tanto capaces de transportar sangre), desde el primer día después de la implantación. El número de vasos competentes para la perfusión (evidentes y continuos con la vasculatura huésped) aumentó rápidamente durante los 2 días siguientes, muy similar a lo que se observa en injertos de piel con todo el espesor en los que la microcirculación del injerto está intacta.

Fabricación y evaluación del PVID

[0082] Los inventores han establecido la viabilidad de construir el PVID utilizando un dispositivo de inmunoaislamiento de ePTFE y el sistema celular endotelial de microvasos derivados de la grasa de aislamiento descrito anteriormente. La Fig. 2 y la Fig. 4 ilustran el sistema híbrido utilizando una membrana de ePTFE sintética no degradable y un constructo de microvasos para proporcionar una formación acelerada de una microcirculación madura.

Métodos y diseño de la investigación

[0083] Los inventores han evaluado un constructo prevascularizado compuesto por un diseño híbrido de dos componentes que utiliza un dispositivo de inmunoaislamiento no degradable y un constructo microvascular compuesto de microvasos autólogos. La implantación de cualquier dispositivo o tejido corre el riesgo de un fallo precoz debido al tiempo necesario para captar y establecer una vasculatura estable. Se han desarrollado métodos para preformar un sistema microvascular adaptativo capaz de evolucionar rápidamente hacia un circuito de irrigación maduro eficiente tras la implantación. Los constructos de islotes β se prevascularizan utilizando este sistema antes de la implantación para acelerar el establecimiento de un riego sanguíneo y preservar la función de los islotes β .

10 Aislamiento y cultivo de microvasos

[0084] Los fragmentos de microvasos (MF) de ratas se aíslan utilizando una modificación de los métodos descritos anteriormente (Hoying J.B. et al. "Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels". En: *Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 409-419, 1996; Williams SK and Jarrell BE. "Cells derived from omental fat tissue and used for seeding vascular prostheses are not endothelial in origin". *J Vasc Surg* 15: 457-459, 1992; Williams SK et al. "Origin of endothelial cells that line expanded polytetrafluorethylene vascular grafts seeded with cells from microvascularized fat". *J Vasc Surg* 19: 594-604, 1994; Williams SK. et al. "Liposuction-derived human fat used for vascular graft seeding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type". *Journal of Vascular Surgery* 19: 916-923, 1994). En condiciones asépticas, el tejido adiposo recolectado se lava en BSA-PBS al 0,1 %, se pica finamente con tijeras y se digiere en 2 mg/ml de collagenasa + 2 mg/ml de BSA (principalmente libre de ácidos grasos) en PBS durante 8 minutos a 37 °C agitándolo vigorosamente. Los residuos del tejido y los trozos grandes de los vasos se retiraron al filtrar la suspensión a través de una criba de nailon estéril con un tamaño de poro de 500 μ m. Los fragmentos de microvasos se capturan mediante la filtración de la suspensión restante en una criba de nailon con un tamaño de poro de 30 μ m y se recuperaron al limpiar por chorro la superficie de la criba con BSA-PBS al 0,1 %. El tipo y el número de lote de la collagenasa a utilizar se cribará previamente para optimizar la producción de fragmentos mientras mantiene la estructura de los vasos. Los fragmentos de microvasos están suspendidos (12 000 - 15 000) MF/ml) en 3 mg/ml de colágeno de tipo I de cola de ratón helado (BD BioSciences, Bedford, MA) preparado con DMEM (1x final) y se neutraliza el pH con NaOH 1M. Las suspensiones de MF/colágeno se colocarán en pocillos individuales (0,25 ml/pocillo) de una placa con 48 pocillos y se situarán en una incubadora a 37 °C durante 20 minutos, para polimerizar el colágeno.

Preparación del pellet endotelial

[0085] Se aisló grasa epididimal de ratas macho y se digirió utilizando collagenasa a 37 grados F. La suspensión si se centrifugara la grasa digerida resultaría en una "torta" flotante de células adiposas y un pellet que contendría células endoteliales. El pellet se volvió a suspender en una mezcla de tampón y colágeno solubilizado. Después, las células suspendidas se colocaron en una cámara que contenía una lámina de ePTFE poroso en un extremo. Esta cámara se produce utilizando un dispositivo plástico conocido como cápsula BEEM. Una jeringa que contenía tampón se situó en el extremo opuesto de la cámara y el volumen interior de la cámara se presurizó presionando el émbolo de la jeringa. Esto resultó en la deposición de las células del pellet vascular en la superficie del ePTFE. Tras 3 días, se llevó a cabo un ensayo metabólico del MTT en la muestra de ePTFE. La superficie del ePTFE cambió rápidamente de color a un color morado oscuro, indicando la presencia de células viables.

Sistemas de encapsulación de células e implantación

[0086] Durante estudios preliminares se fabricaron dispositivos de encapsulación de células utilizando material de ePTFE. Algunos ejemplos de estos dispositivos se ilustran en las Figs. 2 y 4. La función del dispositivo se evalúa utilizando un modelo de ratón. Los ratones se anestesian y se preparan para la implantación del dispositivo en el tejido subcutáneo. El dispositivo se implanta en el sitio tisular apropiado. La piel se cierra con un clip metálico. La función del dispositivo se basa en la viabilidad de las células después de 1 y 4 semanas de implantación. Un beneficio potencial de este enfoque es la distribución de aloinjertos y xenoinjertos para sustituir la función celular perdida, tal como se ha observado. Por ejemplo, en la diabetes, enfermedades de inmunodeficiencia y enfermedades hepáticas.

Densidad y heterogeneidad de los vasos

[0087] Se utiliza la histología y la obtención de imágenes por fluorescencia intravital para evaluar la organización de los vasos y la heterogeneidad alrededor de los implantes de microvasos/materiales. Un análisis de las secciones de tejido tintado (H&E o inmunotinción) proporciona una medición cuantitativa de los elementos de vaso dentro del tejido. Con este análisis, se determina el número y la presencia relacionada de capilares, arteriolas y vénulas para un área determinada. El origen de las células en esta microcirculación recién formada se analiza utilizando marcadores específicos de ratas y ratones para separar las células del huésped de las células del donante.

Competencia de la perfusión

- 5 **[0088]** Se utilizan tres técnicas separadas para evaluar la función de la microcirculación formada alrededor de los dispositivos de inmunoaislamiento: perfusión de tinta, microangiografía y mediciones del flujo por microsferas. La perfusión de tinta y la microangiografía permiten la identificación de segmentos de vasos continuos, en continuidad con la vasculatura del huésped, que sean evidentes y competentes para transportar sangre. El índice de perfusión, que utiliza microsferas, evalúa de manera cuantitativa el flujo sanguíneo en la microcirculación recién formada.

Evaluación de la función de un constructo prevascularizado para sostener la función crónica de los islotes tras el trasplante

- 10 **[0089]** Aislamiento de islotes e inoculación en dispositivos. Se han desarrollado procedimientos estándar para el aislamiento de islotes viables de ratas (Calafiore R. et al. "Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in non-immunosuppressed animals". *Biotechnol Appl Biochem* 39: 156-164, 2004; Chaikof EL. "Engineering and material considerations in islet cell transplantation". *Annu Rev Biomed Eng* 1: 103-127, 1999; De Vos P. et al. "Efficacy of a prevascularized expanded polytetrafluoroethylene solid support system as a transplantation site for pancreatic islets". *Transplantation* 63: 824-830, 1997). Estos islotes se evalúan en el PVID desarrollado en el objetivo 1. Los PVID se preparan e implantan en la posición subcutánea en ratones SCID. Un tubo de silicona que proporcione acceso al compartimento interno se exterioriza a través de una incisión dérmica. El extremo del tubo se sella por calor y se cubre con un apósito para reducir la contaminación.
- 15
- 20 La inoculación de los islotes en el dispositivo se lleva a cabo después de 1, 3, 7 y 14 días tras la implantación del dispositivo. En este momento, el extremo exteriorizado del tubo de silicona se aísla y se corta para permitir la inoculación de los islotes. Los islotes recién aislados se inyectan lentamente en el espacio interior del dispositivo, el tubo de silicona se sella por calor y el tubo se sitúa bajo la piel.

Evaluación de la actividad de los islotes

- 25 **[0090]** Los PVID que contienen islotes se explantan después de 3, 7, 21 y 60 días de la implantación en ratones SCID (Fig. 7). En el momento de la explantación, se separan los PVID y el tejido adyacente en dos segmentos. Se procesa un segmento mediante histología para evaluar la viabilidad celular dentro del PVID, y la evaluación inmunocitoquímica de la producción de insulina por parte de los islotes. La segunda muestra se somete a un análisis de la insulina por inmunoelectrotransferencia.
- 30 **[0091]** Estos experimentos establecen la habilidad de crear un dispositivo de inmunoaislamiento prevascularizado, y posteriormente la función de este dispositivo se prueban en un modelo *in vivo*. Se utiliza un modelo de ratón SCID para evaluar el trasplante de células ya que los inventores están utilizando un modelo de trasplante de xenoinjertos (es decir, células de rata en un ratón). En un uso humano de esta tecnología, el tejido adiposo del propio paciente puede utilizarse como una fuente de fragmentos de microvasos para la construcción del PVID, y por consiguiente, no sería necesaria la inmunosupresión.
- 35 **[0092]** Aunque se han mostrado modos de realización de ejemplo y se han descrito en detalle para mayor claridad, queda claro para los expertos en la materia tras la lectura de la exposición que pueden hacerse varios cambios en la forma o los detalles, modificaciones u otras alteraciones en la invención tal como se ha descrito sin apartarse del alcance real de la invención en las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, mientras que se han descrito las dimensiones específicas y los materiales para los constructos, dispositivos y métodos, debería
- 40 apreciarse que los cambios en las dimensiones o en los materiales específicos que comprenden el dispositivo no limitarán el concepto inventivo. En consecuencia, debería considerarse que todos estos cambios, modificaciones y alteraciones están dentro del alcance de la exposición.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo implantable para proporcionar un agente biológicamente activo a un sujeto que lo necesite, comprendiendo el dispositivo un constructo de microvasos en contacto con una bolsa biocompatible y semipermeable, encapsulando la bolsa una célula o células capaces de producir el agente biológicamente activo, donde el constructo de microvasos comprende fragmentos de microvasos aislados antes de la implantación.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el dispositivo es un dispositivo de inmunoaislamiento.
3. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que los vasos del constructo de microvasos son singénicos al sujeto.
4. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que la célula o células son alogénicas al sujeto.
5. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que la célula o células son singénicas al sujeto.
6. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que la bolsa comprende un polímero.
7. Dispositivo según la reivindicación 6, en el que el polímero es politetrafluoroetileno expandido (ePTFE).
8. Dispositivo según la reivindicación 6, en el que el polímero es polietileno tereftalato (PET).
9. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que la célula o células es una célula secretora de insulina.
10. Dispositivo según la reivindicación 9, en el que la célula secretora de insulina es una célula de islote beta.



FIG. 1

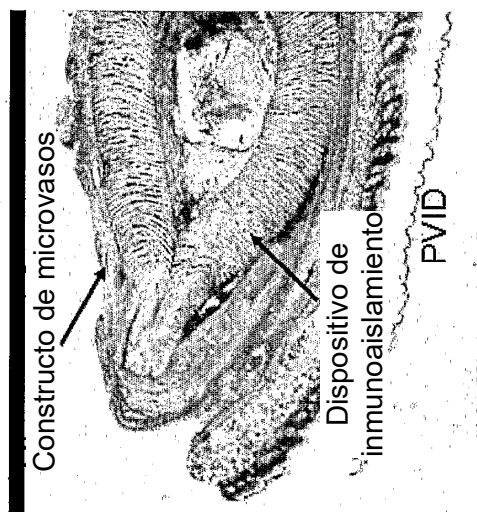


FIG. 2

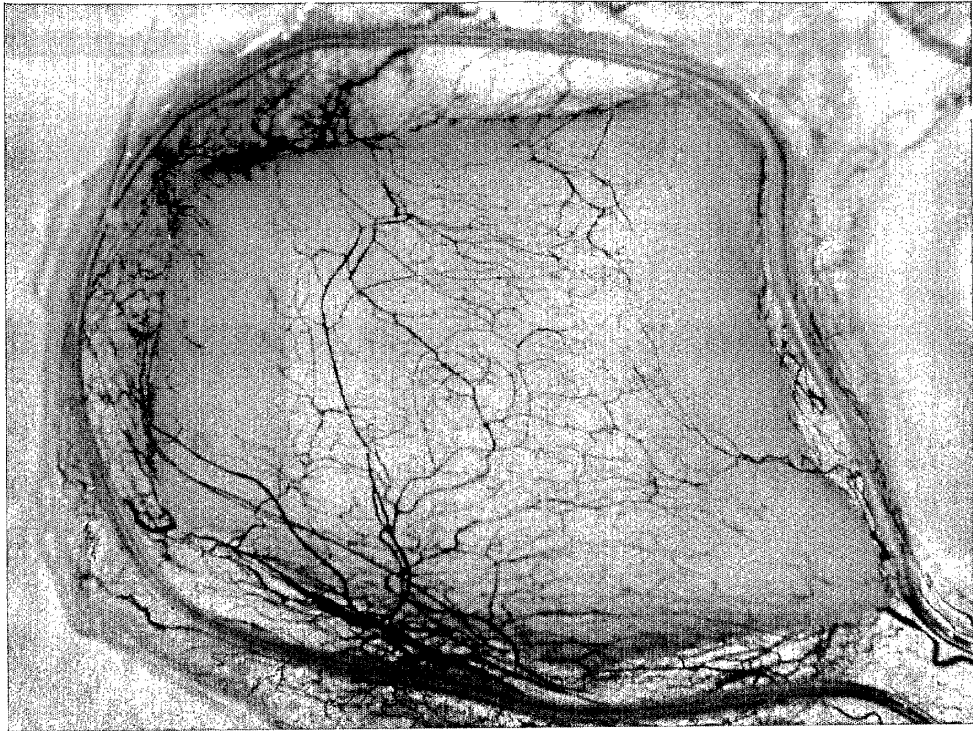


FIG. 3

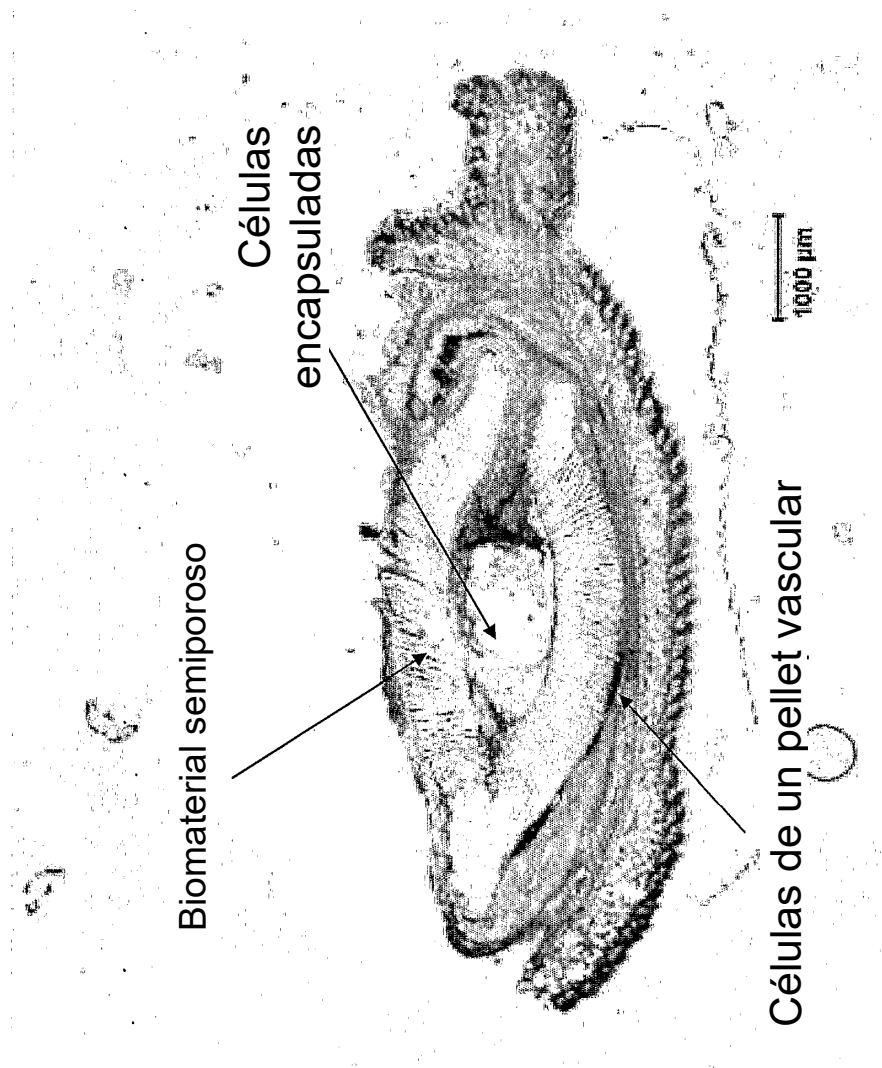
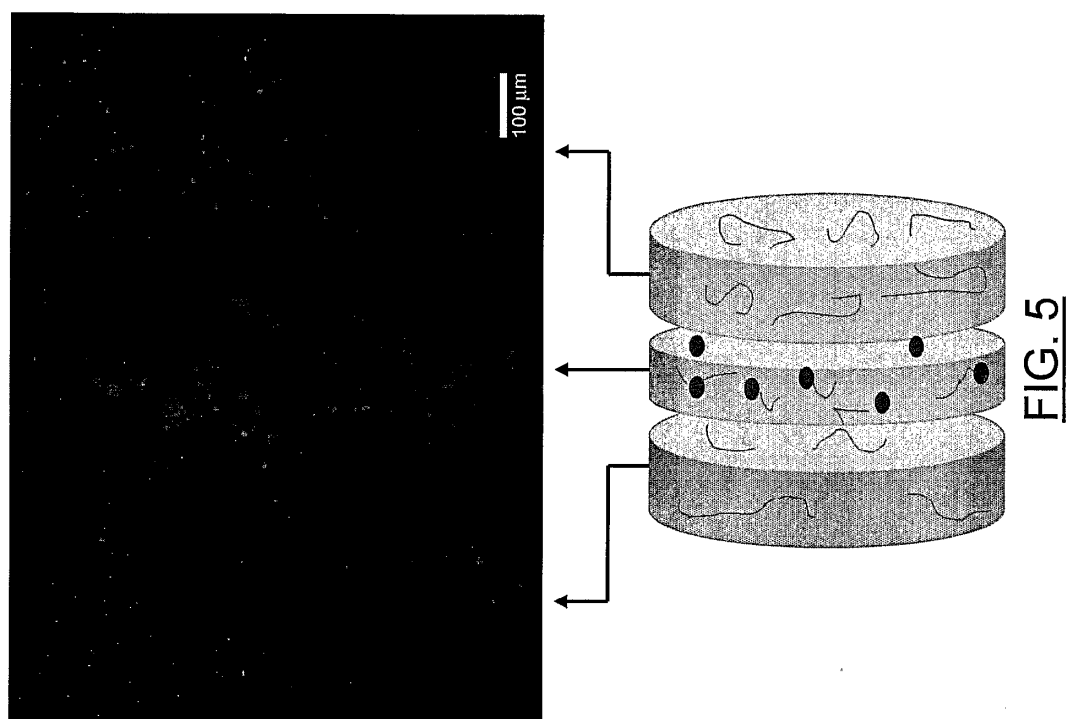
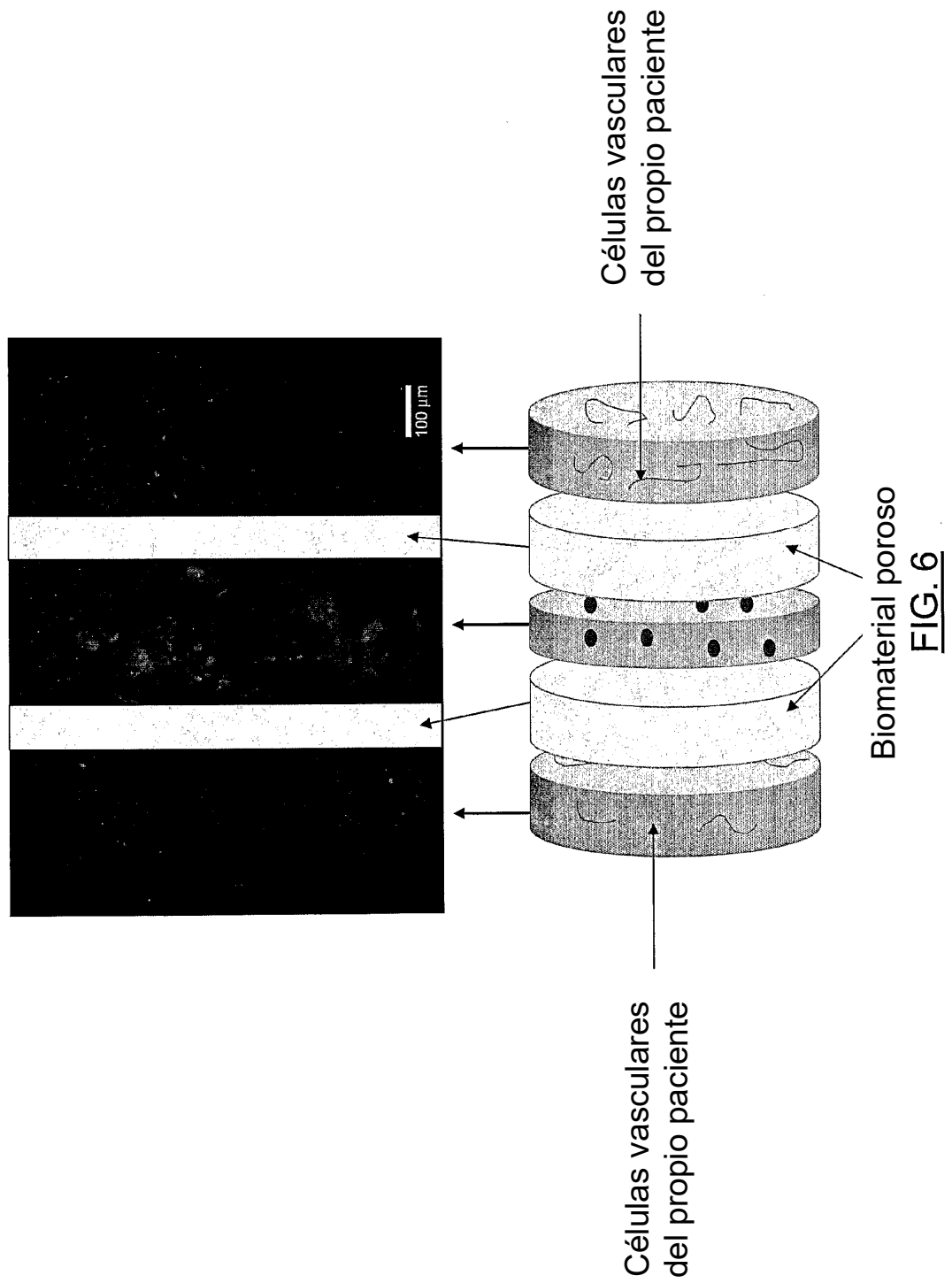


FIG. 4





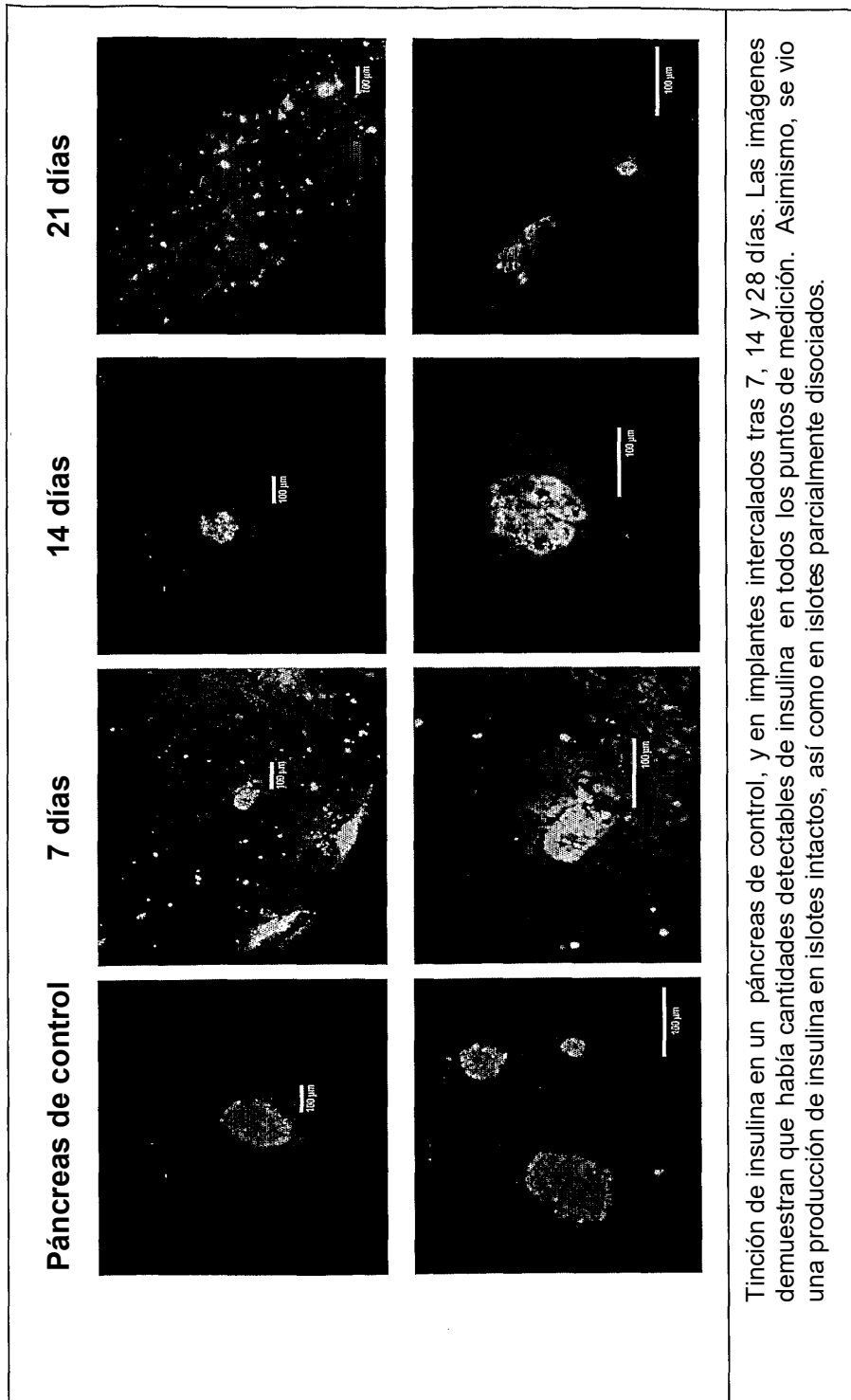


FIG. 7