

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 044**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)
C12N 5/071	(2010.01)
A61K 38/28	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
A61K 9/50	(2006.01)
A61K 35/39	(2015.01)
A61K 35/12	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2014 PCT/EP2014/076955**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086550**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 14809630 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3079658**

54 Título: **Una cámara para encapsular células secretoras**

30 Prioridad:

10.12.2013 FR 1362342

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

07.08.2020

73 Titular/es:

**DEFYMED (100.0%)
8 avenue Dante
67200 Strasbourg, FR**

72 Inventor/es:

**BOU AOUN, RICHARD;
SIGRIST, SÉVERINE y
SPROLL, STEFAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 778 044 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

Una cámara para encapsular células secretoras

5 La invención se refiere al campo de órganos bioartificiales que son implantables y, en particular, que tienen la forma de cámaras para encapsular células que secretan una sustancia de interés. Las membranas que permiten fabricar dichas cámaras de encapsulación y dichos órganos bioartificiales también son objeto de la invención.

10 El tratamiento de afecciones patológicas que requieren un suministro continuo, al cuerpo, de sustancias de interés terapéutico ha hecho necesario el desarrollo de dispositivos que puedan implantarse en un paciente y que sean capaces de liberar estas sustancias de forma eficaz y, a veces, durante largos períodos de tiempo.

15 Para satisfacer esta necesidad se han desarrollado órganos bioartificiales que contienen células que producen una o más sustancias de interés terapéutico. Las células contenidas en un órgano bioartificial están confinadas en espacios internos, o cámaras de encapsulación, delimitadas por al menos una membrana semipermeable. Dicha membrana se denomina "semipermeable" cuando permite la difusión de las sustancias de interés terapéutico al exterior de la cámara de encapsulación hasta las células diana del cuerpo del paciente, mientras que al mismo tiempo es impermeable a los anticuerpos y las células del sistema inmunitario del paciente, evitando así que se unan directamente a las células que producen las sustancias de interés terapéutico.

20 Se entiende que un órgano bioartificial es un dispositivo, en particular concebido para ser implantado en un paciente, que comprende al menos una cámara de encapsulación que consiste en al menos una membrana semipermeable; estando concebida dicha cámara de encapsulación para contener células que secretan una o más sustancias de interés terapéutico.

25 Estas sustancias de interés terapéutico son cualquier sustancia cuyo objetivo es proporcionar un efecto beneficioso al paciente. Por lo tanto, estas pueden ser un neurotransmisor, una hormona, un factor de crecimiento, un factor de coagulación o una citocina. En particular, estas sustancias pueden ser, sin ninguna naturaleza limitante, insulina, glucagón, hormona del crecimiento, factor de coagulación IX, cofactor de coagulación VIII o calcitonina.

30 Por la técnica anterior se conocen ejemplos de dispositivos (órganos bioartificiales, membranas semipermeables, cámaras de encapsulación).

35 Por lo tanto, se puede hacer mención al documento WO 02/060409, que describe una membrana que consiste en una película biocompatible de policarbonato poroso que se modifica en su superficie mediante la generación de sitios polares y se cubre con una capa de al menos un polímero hidrófilo, y el uso de la misma para fabricar órganos bioartificiales.

40 El documento WO 2012/017337 y el documento FR 2960783 describen una membrana semipermeable funcionalizada compuesta por un soporte biocompatible poroso pretratado para aumentar la energía de superficie del mismo y que comprende al menos dos capas, que comprenden cada una un polímero hidrófilo y al menos una molécula biológicamente activa, y también el uso de la misma en particular para la fabricación de un órgano bioartificial y una cámara de encapsulación.

45 La membrana divulgada en estos documentos no presenta las dos capas (polímero biocompatible poroso y polímero no tejido) divulgadas en el presente documento. Esto es evidente a la vista de la figura 2 del documento FR 2960783, que muestra que las capas hidrófilas (3) se han depositado sobre una única capa de polímero biocompatible poroso (2). También debe indicarse que dichas capas hidrófilas están previstas en el contexto de la presente solicitud tal como se describe más adelante.

50 El documento WO 2012/010767 describe una bolsa (o un saco o un bolsillo) para formar un órgano artificial implantable, que comprende una envoltura cerrada fabricada de una membrana semipermeable. Esta bolsa también comprende una lámina contenida en la envoltura, comprendiendo la lámina proyecciones (protuberancias) en la superficie de la misma para mantener un espacio para células entre la lámina y la envoltura.

55 El documento US 20060067917 no describe las membranas y la cámara de encapsulación divulgadas en el presente documento. El dispositivo de D2 es diferente de los dispositivos divulgados en el presente documento, en su diseño, y no puede confundirse con la cámara de encapsulación de la presente solicitud, ya que las membranas del dispositivo de D2 son membranas monocapa (104, 106 y 112, de la figura 1).

60 El documento WO 2000/060051 describe una cámara de encapsulación cuyas membranas semipermeables pueden estar fabricadas de diferentes materiales y polímeros (véase página 21, línea 15 a página 22, línea 23 de este documento). También debe indicarse que el documento WO 2000/060051 prevé el uso de diversos materiales dentro del dispositivo de macroencapsulación, para mantener las células (página 21, línea 30 a página 22, línea 11).

65

Sin embargo, existe la necesidad de poner a disposición de los cirujanos órganos bioartificiales novedosos que muestren, en particular, características biomecánicas ventajosas, es decir, buena resistencia después del implante. Esto se debe a que los órganos bioartificiales están concebidos para ser implantados generalmente en la cavidad intraperitoneal o en el espacio extraperitoneal y pueden sufrir fuerzas de tensión o de cizallamiento según los movimientos del paciente receptor.

Además, estos órganos bioartificiales deben poder contener una gran cantidad de células para poder tener un efecto fisiológico prolongado después de su implante en el paciente. Por lo tanto, es necesario diseñar órganos que sean lo suficientemente grandes como para realizar lo anterior, pero entonces tienen el inconveniente de que corren el riesgo de desgarrarse después del implante debido a los movimientos del paciente (este problema es menos significativo para los microórganos que contienen solo un número limitado de células). El aumento del espesor de las membranas para mejorar la resistencia mecánica no puede ser una solución, ya que la difusión de las moléculas de interés se reduce considerablemente cuando aumenta el espesor de la membrana.

Por lo tanto, es aconsejable desarrollar nuevas membranas semipermeables con propiedades mecánicas mejoradas para la fabricación de órganos bioartificiales. Al menos deben conservarse las propiedades de permeabilidad selectiva.

En el presente documento se describe una cámara para encapsular células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico que comprende una envoltura cerrada fabricada de una membrana semipermeable que delimita un espacio capaz de contener las células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico, caracterizada por que dicha membrana comprende al menos una capa de polímero biocompatible poroso y una capa de polímero biocompatible no tejido.

Los documentos citados anteriormente no describen ni sugieren una cámara de encapsulación para células secretoras que comprende una membrana semipermeable en la que dicha membrana comprende al menos una capa de polímero biocompatible poroso y otra capa de polímero biocompatible no tejido. Tampoco describen ni sugieren una cámara de encapsulación para células secretoras que comprende una membrana semipermeable en la que dicha membrana comprende una capa de polímero no tejido biocompatible ubicada entre dos capas de polímeros biocompatibles porosos, que es el objeto de la invención.

Además, como se observará en los ejemplos (en particular, los ejemplos 7 y 8), las cámaras divulgadas muestran una mayor resistencia mecánica cuando se utilizan en un órgano bioartificial, en particular después de su implante *in vivo*.

Debe recordarse que con el término "biocompatible" se especifica un material que es bien tolerado por un organismo vivo y que no provoca una reacción de rechazo, una reacción tóxica, una lesión o un efecto perjudicial sobre las funciones biológicas de este último. Esto no excluye la posibilidad de una reacción inflamatoria debida a la inserción del material en el organismo o de una reacción inmunitaria en el caso de un órgano biocompatible que comprende células exógenas; así pues, esta reacción inmunitaria no se debe al órgano como tal, sino a su contenido (secreción de quimiocinas por las células exógenas).

Como se ha observado anteriormente, la membrana semipermeable tiene un umbral de corte, y las moléculas que tienen un peso superior a este umbral de corte no pueden atravesar la membrana, mientras que las moléculas que tienen un peso inferior a este umbral de corte pueden atravesar la membrana. La determinación del umbral de corte la llevan a cabo los expertos en la técnica según las características de las moléculas que desean impedir o permitir que penetren.

En una forma de realización preferida, y para permitir el paso de pequeñas moléculas tales como la insulina, el glucagón o la glucosa e impedir el paso de las moléculas efectoras del sistema inmunitario (tales como las citocinas), este umbral de corte se encuentra entre 100 kDa y 500 kDa, de forma más preferida entre 100 kDa y 150 kDa.

El diámetro interno de los poros del polímero poroso permite obtener el umbral de corte deseado. Por lo tanto, en un caso particular, el diámetro interno de los poros presentes en la capa de polímero biocompatible poroso se encuentra entre 5 y 100 nm, de forma preferida completamente entre 5 y 50 nm.

Polímero no tejido

Debe recordarse que un polímero no tejido (material no tejido) es tal que las fibras del mismo se mantienen aleatoriamente. Por lo tanto, es una lámina que consiste en fibras orientadas en una dirección particular o aleatoriamente, unidas por fricción y/o cohesión y/o adhesión. Por lo tanto, las fibras están dispuestas estadísticamente, es decir, están depositadas aleatoriamente. En consecuencia y debido a la disposición aleatoria de las fibras, el polímero no tejido es permeable a sustancias, y no existe ningún control sobre el tamaño de las sustancias que pueden difundirse dentro del polímero no tejido.

Los polímeros no tejidos se pueden producir utilizando fibras poliméricas de cualquier tipo. Por lo tanto, se pueden mencionar poliésteres: PET (poli(tereftalato de etileno)), PBT (poli(tereftalato de butileno)), PVC (poli(cloruro de vinilo)), PP (polipropileno), PE (polietileno) o mezclas de estos polímeros.

También se pueden utilizar poliamidas o policarbonatos para producir polímeros no tejidos.

5 Preferentemente, el polímero no tejido se elige de entre policarbonato (PC), poliéster, polietilenimina, polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliamida y polietileno (PE). También se pueden utilizar mezclas de estos polímeros para producir el polímero no tejido. Se prefiere particularmente el poli(tereftalato de etileno) (PET).

10 Generalmente, este polímero no tejido se obtiene mediante el procedimiento de soplado en estado fundido. La composición del mismo es un entrelazamiento de microfibras que se han "soplado en estado fundido".

Este procedimiento de producción es particularmente adecuado para polímeros que pueden hilarse en estado fundido, en particular polipropileno, poli(tereftalato de etileno), poliamidas o polietileno.

15 Este procedimiento genera materiales no tejidos de mayor resistencia mecánica.

En la invención, dicha membrana comprende dos capas de polímeros biocompatibles porosos, una a cada lado de la capa de polímero no tejido biocompatible. Por lo tanto, esta capa de polímero no tejido biocompatible se encuentra ubicada, posicionada o situada entre estas dos capas de polímeros biocompatibles porosos.

20 Dicha forma de realización posibilita optimizar la resistencia del dispositivo. De hecho, se puede considerar que esta capa de material no tejido se comporta como una "esponja", lo que le proporciona la capacidad de absorber impactos y de deformarse, aumentando así la rigidez de la membrana *in situ*, pero que puede resultar problemática en presencia de células, que pueden tener tendencia a formar agregados alrededor de este material no tejido. La ubicación de la
25 capa de material no tejido entre dos capas porosas de polímeros biocompatibles permite evitar la agregación de células al mismo tiempo que proporciona al dispositivo protección/resistencia adicional, y no tiene ningún efecto sobre la difusión molecular de las sustancias biológicas.

30 No es necesario que los biopolímeros porosos y no tejidos sean idénticos.

Asimismo, habiendo presencia de dos capas de biopolímeros porosos, estas últimas puede ser el mismo polímero o polímeros diferentes.

Polímero biocompatible poroso

35 El polímero biocompatible poroso consiste en un polímero conocido en la técnica. Por lo tanto, se puede elegir de entre policarbonato (PC), poliéster, polietilenimina, polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliamida y polietileno (PE).

40 En una forma de realización particular, al menos una capa o las dos capas, según sea apropiado, están fabricadas de poli(tereftalato de etileno) (PET).

45 La formación de poros se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En particular, es posible utilizar el procedimiento de bombardeo de electrones o el procedimiento de bombardeo de iones pesados (esta segunda técnica se describe en particular en la patente US 4 956 219). En el caso del bombardeo de iones pesados, la densidad de los iones pesados bombardeados contra la superficie del soporte biocompatible determina la densidad de los poros, mientras que el tiempo de tratamiento de la erosión química determina el tamaño de los poros.

50 Por lo tanto, las membranas se preparan utilizando el proceso de "grabado de trazas" conocido por la técnica anterior y descrito en particular en las patentes US 4 956 219, DE19536033 o CH701975.

55 Esta tecnología consiste en irradiar una película de polímero con iones pesados energéticos, lo que da como resultado la formación de trazas latentes lineales caracterizada por una degradación local de este polímero; estas trazas se revelan después en forma de poros mediante un ataque químico selectivo.

60 La membrana se irradia con un haz de iones pesados. Los iones pesados atraviesan todo el espesor de la película de polímero. Al atravesar el polímero, los iones pesados destruyen o cortan las cadenas de polímero y, así, forman una abertura recta y limpia a través del material. El alineamiento final de los poros está determinado por el ángulo del haz con respecto a la película de polímero durante el proceso de irradiación. De esta forma, el haz puede ser perpendicular a la película de polímero o encontrarse en cualquier otro ángulo.

65 En la etapa siguiente, la película se hace pasar a través de un baño de un ácido fuerte tal como ácido nítrico y las aberturas se convierten en poros después del contacto con soluciones alcalinas tales como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

Al contrario que el resto de la película, estas aberturas producidas por los iones permiten que la solución alcalina pase a través de ellas, llenándolas y permitiendo el grabado de los poros mediante la eliminación del material (polímero) presente alrededor de estas aberturas.

5 El tamaño de poro se controla mediante la concentración de la solución alcalina, el tiempo de contacto y la temperatura de la solución.

Si se utiliza poliéster o policarbonato, la membrana obtenida es hidrófila y puede utilizarse como tal o tratarse mediante procesos de tratamiento de superficie (plasma, pulverización o recubrimiento).

10 La preparación de membranas según esta tecnología de "grabado de trazas" se describe con mayor precisión en las patentes US 4 956 219 y CH701975.

15 Esta tecnología permite la producción de membranas poliméricas porosas caracterizadas en particular por una superficie plana y un umbral de corte estrecho.

La ventaja de utilizar membranas obtenidas por medio de esta tecnología es la gran precisión del tamaño de poro, del número de poros y de la forma de los poros.

20 Los poros son preferentemente cilíndricos, pero esta tecnología también puede permitir obtener poros con otra forma, tal como con forma cónica.

Preferentemente, los poros están alineados y presentan un ángulo de entre 10° y 45° , con respecto a la vertical, pero también pueden presentar ángulos $> 45^\circ$ o $< 10^\circ$. Estos ángulos se obtienen según el ángulo del haz de iones durante el bombardeo de la membrana.

25 Esta tecnología se puede aplicar a diversos materiales, tales como policarbonato (PC), poliéster (PET) o poliimida (PI). También se pueden utilizar poliamida, poli(fluoruro de vinilideno), poliacrilato o poliolefinas.

30 Este procedimiento permite obtener fácilmente poros con un tamaño controlado de entre $0,02 \mu\text{m}$ y $15 \mu\text{m}$, una densidad de poros de entre 10^3 poros/ cm^2 y 10^{10} poros/ cm^2 y membranas con un espesor de entre $5 \mu\text{m}$ y $80 \mu\text{m}$.

35 Debe indicarse que, sin el tratamiento para formar poros en el polímero biocompatible, dicho polímero permanecería impermeable a cualquier sustancia y no permitiría la difusión de la sustancia de interés desde la parte interior del órgano biocompatible hacia la parte exterior. Los poros solo permiten la difusión de sustancias que se encuentran por debajo del valor de corte (es decir, que son más pequeños que el diámetro de poro).

40 Por lo tanto, es evidente que la capa del polímero biocompatible no tejido y las capas del polímero biocompatible poroso son capas diferentes, fabricadas de materiales diferentes y que presentan diferentes propiedades (en particular con respecto al paso y la difusión de sustancias a través de cada capa).

45 En una forma de realización preferida, al menos una de las capas de polímero biocompatible poroso de la membrana se hace hidrófila. La propiedad de hidrofiliidad se puede lograr generando sitios polares en la superficie de esta capa de polímero biocompatible poroso. Esta modificación de la superficie puede llevarse a cabo por medios físicos (tales como la generación de sitios polares cargados en la superficie, en particular por tratamiento de la superficie con plasma, por descarga de corona o por descarga electromagnética a presión atmosférica o al vacío) o por medios químicos (puede estar previsto un tratamiento alcalino, en particular con hidróxido de sodio).

50 Preferentemente, la capa de polímero biocompatible poroso se trata con un plasma de radiofrecuencia de argón, hidrógeno, oxígeno o aire. Se puede tratar a una potencia de emisión del reactor de plasma de entre 3 y 10 vatios por litro de capacidad del reactor, durante aproximadamente 1 a 20 minutos. El tratamiento también puede llevarse a cabo utilizando un plasma de microondas, a la misma potencia, pero durante 5 segundos a 20 minutos. Preferentemente, el tratamiento con plasma se lleva a cabo al vacío.

55 Las solicitudes de patente WO 02/060409 y WO 2012/017337 describen, en particular, el tratamiento de superficie con plasma para introducir sitios polares en el polímero biocompatible poroso.

60 Después de que al menos una capa de biopolímero biocompatible poroso se haya hecho hidrófila, es posible cubrirla con al menos una capa de polímero hidrófilo, o incluso con dos capas de polímeros hidrófilos diferentes. Opcionalmente, puede estar contenida una molécula activa en al menos una capa de polímero hidrófilo.

Los documentos WO 02/060409 y WO 2012/017337 también describen la adición de al menos un polímero hidrófilo sobre la superficie de un polímero biocompatible poroso, en el que dicha superficie se ha tratado para hacerla hidrófila, en particular mediante la adición de sitios polares.

65 Polímero hidrófilo

5 Para los fines de la invención, lo que constituye un polímero hidrófilo es un polímero o una mezcla de polímeros que, después de su aplicación sobre una película de polímero biocompatible poroso, tiene un valor del ángulo inferior a 40°, preferentemente inferior 30°, después de medición según el ensayo de la "gota sésil" descrito en el ejemplo 2 del documento WO 02/060409.

10 Debe indicarse que el valor del ángulo según el ensayo de la "gota sésil" puede variar dependiendo del tratamiento del polímero. Por lo tanto, se pueden observar ángulos de contacto inferiores a 20° (de aproximadamente 16-17°) para el biopolímero biocompatible cuando se llevan a cabo dos tratamientos con plasma, aumentando este ángulo (generalmente a menos de 30°) cuando el polímero hidrófilo (en particular HPMC) se deposita después de los dos tratamientos con plasma. Si se utiliza una mezcla de polímeros hidrófilos, que también contiene una molécula con actividad biológica (en particular una mezcla de HPMC, etilcelulosa + heparina), el ángulo puede ser superior a 30°, pero permanece inferior a 40°.

15 Preferentemente, el polímero hidrófilo es soluble en agua. Esto es debido a que, debido al implante del órgano bioartificial en el cuerpo de un organismo huésped, se excluye el uso de disolventes orgánicos ya que su eliminación completa es difícil y su presencia, incluso en pequeñas cantidades, no es compatible con un agente terapéutico o un uso quirúrgico en seres humanos o animales.

20 Preferentemente, el material polimérico hidrófilo se elige de entre los polímeros hidrófilos siguientes:

- celulosas y derivados de las mismas, tales como etilcelulosa (EC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o carboximetilcelulosa (CMC);
- 25 - poliacrilamidas y sus copolímeros;
- polivinilpirrolidona (PVP) y sus copolímeros;
- 30 - poli(alcoholes vinílicos);
- copolímeros de acetato de vinilo, tales como un copolímero de poli(acetato de vinilo)/poli(alcohol vinílico);
- polietilenglicoles;
- 35 - propilenglicoles;
- poli(met)acrilatos hidrófilos;
- 40 - polisacáridos;
- quitosanos

45 Como polímero hidrófilo se utiliza tanto un material polimérico que consiste en uno de los polímeros hidrófilos tal como se ha definido anteriormente como una mezcla de varios de los polímeros hidrófilos anteriores, generalmente una mezcla de dos o tres de los polímeros hidrófilos anteriores.

50 Preferentemente, el polímero hidrófilo se elige de entre compuestos basados en celulosa, en particular HPMC, EC, TEC o CMC, polivinilpirrolidonas, poli(alcohol vinílico) o poliacrilatos tales como poli(acrilato de hidroxietilo) (HEA) o copolímeros de ácido acrílico.

55 El polímero hidrófilo también puede estar compuesto por una mezcla de dos o más polímeros hidrófilos mencionados anteriormente, en particular una mezcla de HPMC y CMC, o de HPMC y EC.

Se prefieren celulosas y derivados de celulosa, en particular hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Laminación de membrana

60 Para una mayor estabilidad mecánica, las membranas de polímeros biocompatibles porosas se refuerzan utilizando una membrana fabricada de material no tejido.

La combinación de un polímero no tejido y de las membranas porosas de polímero biocompatible se lleva a cabo preferentemente mediante laminación, utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como laminación térmica, con o sin la presencia de adhesivos, preferentemente sin adhesivos.

Por lo tanto, el refuerzo de la membrana se puede mejorar a través de un sistema multicapa que alterna capas de polímeros tejidos o no tejidos y de polímeros porosos biocompatibles. Sin embargo, se debe evitar cualquier degradación de las propiedades de difusión.

- 5 En particular, la estabilidad mecánica puede aumentarse combinando una membrana funcional fina que tiene una alta densidad de poros con una membrana protectora gruesa que tiene una baja densidad de poros.

No hay limitación en el número de capas de polímeros que se pueden utilizar para fabricar la membrana.

10 Molécula activa

Tal como se ha indicado anteriormente, el polímero hidrófilo depositado sobre la capa de polímero biocompatible poroso puede contener opcionalmente una molécula activa.

- 15 Esta "molécula activa" se mezcla con el polímero hidrófilo con el objetivo de que sea liberada en el medio que rodea la membrana semipermeable, en particular para reducir la inflamación debida al implante del órgano bioartificial y/o para inducir una respuesta positiva (en particular, una mayor vascularización) por el o los tejidos del paciente receptor del órgano bioartificial.

- 20 Por lo tanto, la molécula activa se elige entre agentes antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos, anestésicos, factores de crecimiento, agentes que estimulan la angiogénesis y/o que inducen la vascularización, agentes que inducen la curación, agentes inmunosupresores, anti-trombóticos, incluidos antiagregantes y anticoagulantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), o cualquier molécula que estimule la secreción de insulina (IGF, péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) o sus derivados, miméticos incretinos).

- 25 Entre los agentes antiinflamatorios, se pueden mencionar antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como paracetamol, ácido aminosalicílico, aspirina, celecoxib, trisalicilato de colina y magnesio, declofenaco, diflunisal, etodolaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, interleucina IL-10, muteína de IL-6, anti-IL-6, inhibidores de NO sintasa (por ejemplo, L-NAME o L-NMDA), interferón, ketoprofeno, ketorolaco, leflunomida, ácido mefenámico, ácido micofenólico, mizoribina, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salsalato, sulindac y tolmetina, y corticoides tales como cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, betametasona, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, dipropionato de beclometasona, budesonida, fosfato sódico de dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona, paclitaxel, tacrolimus, tranilast, triamcinolona acetona, fluocinolona acetona, fluocinonida, desonida, desoximetasona, fluocinolona, triamcinolona, propionato de clobetasol y dexametasona. El ibuprofeno es particularmente adecuado y preferido.

- 30 Se utilizan preferentemente anti-trombóticos tales como antiagregantes (ácido acetilsalicílico, clopidogrel, ticlopidina, dipiridamol, abciximab, eptifibatida y tirofiban), anticoagulantes (heparina, bivalirudina, dabigatran, lepirudina, fondaparinux, rivaroxaban, epoprostenol, warfarina, fenprocumón, proteína C, drotrecogina alfa, antitrombina, pentosán) y trombolíticos (alteplasa, uroquinasa, tenecteplasa y reteplasa).

- 35 Se prefiere particularmente el uso de una heparina.

- 40 En otra forma de realización, se utiliza ibuprofeno.

- 45 Además, es posible utilizar una molécula que permita inducir la vascularización de los tejidos que rodean el órgano bioartificial, en particular PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), BMP (proteína morfogenética ósea), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), VPF (factor de permeabilidad vascular), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF (factor de crecimiento transformante) y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos).

- 50 También es posible utilizar IGF-1 e IGF-2, un factor neurotrófico (NGF).

- 55 En una forma de realización particular, se elige un factor de crecimiento celular que promueve la vascularización induciendo angiogénesis, tal como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PDGF A o B), la proteína morfogenética ósea (BMP 2 o 4) o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

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

- 65 La adición del polímero hidrófilo que contiene opcionalmente una molécula activa a la capa de polímero biocompatible poroso se lleva a cabo según procedimientos descritos en los documentos WO 02/060409 y WO 2012/017337.

- En otra forma de realización es posible añadir, en la superficie del polímero biocompatible poroso, dos capas que comprenden cada una un polímero hidrófilo y al menos una molécula biológicamente activa, tal como se describe en el documento WO 2012/017337.

Características físicas de la membrana biocompatible

5 La membrana según la invención comprende dos capas de polímero biocompatible poroso, cada una cubierta con al menos un polímero hidrófilo, que rodea la capa de material no tejido.

Diámetro de poro y densidad

10 Tal como se ha indicado anteriormente, los poros se introducen en cada una de las capas de polímero biocompatible poroso utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Se prefiere que al menos la capa (si es la única) o una de las dos capas de polímeros biocompatibles porosos tenga una densidad de poros superior a 10^6 poros/cm², preferentemente superior a 10^7 poros/cm². Esta densidad de poros es generalmente inferior a 10^{11} poros/cm², preferentemente inferior a 10^{10} poros/cm². Por lo tanto, se utilizan membranas que pueden tener una densidad de poros preferentemente superior a 10^6 poros/cm², de forma más preferida superior a 10^7 poros/cm². Esta densidad es preferentemente inferior a 10^{11} poros/cm² o incluso inferior a 10^{10} poros/cm². Esta densidad es por lo tanto de entre 10^6 poros/cm² y 10^{11} poros/cm². Una densidad superior a 10^9 e inferior a 10^{10} poros/cm² es perfectamente adecuada.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, el diámetro interno de los poros de las capas de polímero biocompatible poroso debe ser de tal forma que permita la semipermeabilidad de la membrana.

25 Por lo tanto, al menos una de las dos capas de polímero biocompatible poroso posee poros que tienen un diámetro interno superior a 5 y preferentemente superior a 10 nm, e inferior a 100 nm, y preferentemente superior a 10 nm e inferior a 50 nm, de forma más preferida inferior a 40 nm. Un diámetro de poro inferior a 90 nm también es muy favorable para esta capa de polímero biocompatible poroso, ya que dicho diámetro de poro mantiene la propiedad de semipermeabilidad que se busca para la membrana. La densidad de poros es entonces ventajosamente superior a $2 \cdot 10^9$ e inferior a $4 \cdot 10^{10}$ poros/cm².

30 Como la membrana tiene dos capas de polímeros biocompatibles porosos, el diámetro interno de los poros de una de las capas es preferentemente como se ha indicado anteriormente.

35 El diámetro interno de los poros de la segunda capa puede ser mayor, estando proporcionado el efecto de corte con respecto al tamaño deseado por el diámetro de los poros de la primera capa. Por lo tanto, el diámetro interno de los poros de la segunda capa puede ser superior a 100 e inferior a 2000 nm, preferentemente superior a 200 nm. Estos poros tienen preferentemente un diámetro interno inferior a 1000 nm. Un diámetro de poro interno superior a 400 e inferior a 600 nm, o de aproximadamente 500 nm, es perfectamente adecuado. La densidad de poros es entonces ventajosamente superior a $5 \cdot 10^6$ e inferior a $5 \cdot 10^7$ poros/cm².

40 Como la membrana comprende dos capas de polímero biocompatible poroso, que rodean la capa de material no tejido, se prefiere que la cámara de encapsulación sea de tal forma que la capa en la que el diámetro de poro es más pequeño esté ubicada en el interior de la cámara (en contacto con las células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico) y que la capa en la que el diámetro del poro es más ancho esté ubicada en el exterior (en contacto con el cuerpo del paciente).

Espesor de la membrana

45 En una forma de realización preferida, el espesor total de la membrana (que comprende la capa de polímero no tejido y las capas de polímeros porosos) es superior a 45 µm. Generalmente, y preferentemente, es inferior a 200 µm, pero también puede ser superior a este tamaño; En particular, pueden estar previstos espesores de hasta 300 µm, o incluso superiores. Preferentemente, es superior a 50 µm. También es preferentemente inferior a 150 µm. Por lo tanto, esta membrana generalmente tiene un espesor de entre 45 y 200 µm.

50 Al tener la membrana dos capas de polímeros biocompatibles porosos, dichas capas pueden tener el mismo espesor o tener espesores diferentes.

55 La capa de polímero no tejido generalmente tiene un espesor superior a 40 µm, preferentemente superior a 60 µm, de forma más preferida superior a 80 µm. Esta capa tiene un espesor generalmente inferior a 250 µm y preferentemente inferior a 150 µm. Por lo tanto, el espesor de la capa de polímero no tejido se encuentra a menudo entre 40 µm y 150 µm.

60 Se divulga que cuando la membrana tiene solo una capa de polímero biocompatible, dicha capa tiene un espesor superior a 5 µm. Esta capa es inferior a 200 µm, preferentemente inferior a 100 µm, siendo, no obstante, preferentemente inferior a 50 µm.

65 Al tener la membrana dos capas de polímero biocompatible poroso, y si dichas capas tienen espesores diferentes, el espesor de la primera capa es entonces superior a 5 µm. También es preferentemente inferior a 200 µm, pero preferentemente inferior a 40 µm; un espesor inferior a 15 µm (y preferentemente superior a 5 µm) es perfectamente

adecuado. Este espesor es preferentemente el espesor de la capa que tiene poros con el diámetro interno más pequeño, si el diámetro de poro interno es diferente para las dos capas.

5 El espesor de la segunda capa es generalmente superior a 25 μm . Es preferentemente inferior a 200 μm , preferentemente inferior a 100 μm , de forma más preferida inferior a 50 μm ; un espesor de entre 30 y 50 μm es perfectamente adecuado.

10 El espesor de cada capa de polímero hidrófilo opcionalmente presente en una o las dos capas de polímeros biocompatibles porosos es insignificante, en comparación con el espesor total de la membrana. De hecho, es preferentemente inferior a 500 nm y generalmente de entre 25 y 250 nm.

En la invención, la membrana tiene dos capas de polímeros biocompatibles porosos a cada lado de una capa de polímero no tejido.

15 En esta forma de realización, una capa de polímero biocompatible poroso tiene poros con un diámetro interno superior a 100 nm, preferentemente superior a 200 nm, de forma más preferida superior a 400 e inferior a 1000 nm, de forma más preferida inferior a 600 nm, preferentemente a una densidad de aproximadamente $5 \cdot 10^7$ poros/ cm^2 . Entonces es ventajoso que esta capa sea la que tiene un espesor de entre 25 y 200 μm (véase anteriormente).

20 La otra capa de polímero biocompatible poroso tiene poros con un diámetro interno superior a 5 nm, preferentemente superior a 10 nm (y generalmente inferior a 100 nm, preferentemente inferior a 50 nm, preferentemente inferior a 40 nm), preferentemente a una densidad de aproximadamente superior a $2 \cdot 10^9$ poros/ cm^2 . Esta densidad también es preferentemente inferior a $7 \cdot 10^9$ poros/ cm^2 .

25 Es ventajoso que esta sea la capa con un espesor de entre 5 y 200 μm (preferentemente de 5 a 15 μm).

Cámara de encapsulación

30 La invención también se refiere a una cámara para encapsular células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico que comprende una envoltura cerrada fabricada de una membrana según la invención que delimita un espacio capaz de contener las células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico. Esta cámara de encapsulación también puede denominarse "bolsa" y posibilita la formación de un órgano bioartificial implantable en el paciente.

35 En una forma de realización particular, esta cámara de encapsulación también comprende una lámina biocompatible contenida en dicha envoltura, comprendiendo dicha lámina preferentemente proyecciones (también denominadas protuberancias) en su superficie. Estas proyecciones son ventajosas para mantener un espacio para las celdas entre la lámina y la envoltura, pero también para distribuir las células de forma homogénea y plana, lo que posibilita maximizar la superficie de intercambio. Esta lámina está fabricada preferentemente de silicona.

40 Dicha forma de realización se describe en la solicitud WO 2012/010767. Así, en una forma de realización preferida, la envoltura está formada por dos membranas que están soldadas entre sí térmicamente. Se puede utilizar el procedimiento descrito en el documento WO 2012/010767 o un procedimiento de soldadura térmica que utiliza ultrasonidos, conocido en la técnica. El procedimiento para formar la envoltura es sencillo y permite encerrar la lámina en la envoltura.

Forma de la cámara

50 En una forma de realización preferida, la cámara de encapsulación es circular. Dicha forma tiene varias ventajas:

- ausencia de "esquinas" o partes sobresalientes que sean capaces de crear agregados celulares o inflamatorios durante el implante,

55 - facilidad de fabricación de la cámara de encapsulación (no es necesario orientar las dos membranas y la lámina antes de la soldadura térmica).

En una forma de realización particular, el diámetro de la cámara de encapsulación es superior a 3 cm, preferentemente superior a 5 cm o a 8 cm. Generalmente es inferior a 20 cm, y preferentemente es inferior a 15 cm o a 14 cm. Un diámetro de entre 8 y 14 cm es perfectamente aceptable.

60 Cuando la cámara no es redonda, la dimensión más grande de la misma es generalmente superior a 3 cm, preferentemente superior a 5 cm o a 8 cm. Generalmente es inferior a 20 cm, y preferentemente es inferior a 15 cm o a 14 cm.

65 *Volumen de la cámara*

Tal como se ha indicado anteriormente, la cámara de encapsulación preferentemente permite fabricar un órgano "macroscópico" cuando las células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico se introducen en la misma, es decir, permite que dichas células secreten esta sustancia durante un período de tiempo considerable (superior a 3 meses, preferentemente superior a 6 meses) a niveles de interés fisiológico (es decir, que permiten satisfacer las necesidades del paciente). Por lo tanto, la cámara de encapsulación debería poder albergar una gran cantidad de células.

En general, se estima que el volumen interno preferido de la cámara de encapsulación debería ser superior a 15 ml, preferentemente superior a 20 ml, de forma más preferida superior a 25 ml, y puede elevarse a 50 ml, para su uso en seres humanos. Para su uso en otros animales, el volumen será diferente (aproximadamente 1 ml en ratas, por ejemplo).

Dichas cámaras de encapsulación deben poder contener una gran cantidad de células. En el contexto del tratamiento de la diabetes, debe ser posible encapsular el equivalente de al menos 500.000 islotes de Langerhans, preferentemente el equivalente de más de 700.000 islotes, y opcionalmente hasta el equivalente de un millón de islotes de Langerhans. Sabiendo que un islote contiene, en promedio, aproximadamente 1000 células, esto proporciona una estimación del número de células que puede contener la cámara de encapsulación según la invención.

El número de células obviamente variará según el tipo de células que se desea encapsular e implantar en el paciente.

En la invención, la membrana que forma la cámara de encapsulación comprende dos capas de polímeros biocompatibles porosos, una a cada lado del polímero no tejido. En esta forma de realización, se prefiere que al menos la capa interior (ubicada en el interior de la cámara después de la formación de la cámara) sea la capa en la que los poros proporcionan la naturaleza semipermeable de la membrana (umbral límite), es decir, posee poros que presentan un diámetro interno superior a 5 nm (y generalmente inferior a 100 nm) o que tienen las otras dimensiones mencionadas anteriormente.

La capa exterior con respecto a la envoltura (en contacto con los tejidos y las células del paciente) puede poseer poros con un diámetro interno mayor, en particular superior a 100 nm, pero preferentemente inferior a 2000 nm, o que tenga las otras dimensiones mencionadas anteriormente.

En una forma de realización, y tal como se describe en el documento WO 2012/010767, la cámara de encapsulación puede comprender al menos un conector (en particular unido a la envoltura y/o la lámina), que permite establecer una comunicación entre el exterior y el interior de la envoltura. La conexión de estos conectores a tubos flexibles permite llenar y vaciar la cámara.

Órgano bioartificial

Por lo tanto, la invención se refiere a un órgano bioartificial que comprende al menos una cámara de encapsulación según la invención. Dicho órgano bioartificial también presenta ventajosamente los tubos conectados a los conectores y permite llenar y vaciar el órgano bioartificial, lo que posibilita renovar el contenido del órgano bioartificial cuando se implanta en un paciente sin realizar un explante.

Este órgano bioartificial puede contener varios tipos de células.

Células encapsuladas en el órgano bioartificial

Las células presentes en el órgano bioartificial producen al menos una sustancia biológicamente activa de interés. En particular, pueden ser células secretoras de insulina o islotes de Langerhans, que producen insulina, cuando la cámara de encapsulación está concebida para la fabricación de un páncreas bioartificial.

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

En una forma de realización particular, las células se transfectan o se transforman con al menos un ácido nucleico que permite la expresión de una sustancia biológicamente activa de interés. Entre las sustancias biológicamente activas de interés, se pueden mencionar, a modo de ilustración, insulina, citocinas, hormonas peptídicas, hormona del crecimiento, factores de coagulación VIII y IX y calcitonina.

Generalmente, el término "sustancia biológicamente activa" significa una sustancia que es liberada o secretada por la célula que la produce y que ejerce su efecto sobre una célula diana o una molécula diana en el organismo huésped, por ejemplo un neurotransmisor, un hormona, un factor de crecimiento, un factor de coagulación o una citocina.

Se puede utilizar una gran diversidad de células, incluidas líneas celulares inmortalizadas, por ejemplo, cultivos primarios de células en división, o también células madre pluripotentes.

Las células pueden, por ejemplo, ser mioblastos, que son células precursoras de células musculares derivadas de las poblaciones de células madre del mesodermo, y que pueden transformarse fácilmente con un ácido nucleico que permite la expresión de la sustancia biológicamente activa de interés. Los expertos en la técnica pueden remitirse ventajosamente, por ejemplo, a los documentos WO 94/02129, WO 93/03768 o WO 90/15863.

5 Preferentemente, las células contenidas en una cámara de encapsulación según la invención están embebidas en una matriz, tal como una matriz de colágeno tipo IV o de fibrina, cuando sea apropiado en combinación con laminina, entactina y sulfato de heparán.

10 Las células contenidas en una cámara de encapsulación según la invención generalmente se pueden embeber en una matriz compuesta de cualquier producto o combinación de productos que permita la inmovilización de estas células de una forma viable.

15 Las células que producen al menos una sustancia biológicamente activa de interés también se pueden encapsular en una matriz de alginato.

Fabricación de una cámara de encapsulación

20 La cámara de encapsulación se fabrica por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica.

Se utilizan preferentemente las enseñanzas del documento WO 2012/010767, que debe considerarse parte integrante de la presente solicitud.

25 La invención se refiere así a un procedimiento para fabricar una cámara de encapsulación según la invención, que comprende una etapa de soldadura térmica de dos membranas según la invención (o incluso una membrana plegada), de tal manera que forme una bolsa concebida para albergar células que producen al menos una sustancia biológicamente activa de interés.

30 En una forma de realización particular, como se ha indicado anteriormente, la cámara de encapsulación contiene una lámina, y también uno o más conectores. El procedimiento para fabricar dicha bolsa se describe en el documento WO 2012/010767. Se invita al lector a remitirse al documento WO 2012/010767 para explicaciones más detalladas con respecto al proceso de fabricación de la cámara de encapsulación.

Descripción de las figuras

35 Figura 1: Permeabilidad de membranas de poli(tereftalato de etileno) (PET) o policarbonato (PC) según la invención, tratadas o no con heparina, etilcelulosa (EC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), a glucosa (A), insulina (B) y IgG (C) en condiciones estáticas.

40 Figura 2: Secreción de insulina por islotes pancreáticos de rata estimulados con glucosa a través de una membrana de PET según la invención, tratada o no tratada con heparina, EC y HPMC. Se observa un comienzo de difusión de la insulina a partir de 4 horas y una permeabilidad que parece mejorar a las 24 horas por el tratamiento de superficie.

45 Figura 3: Imágenes de las secciones preparadas 30 días después del implante de membranas de poli(tereftalato de etileno) (PET) o policarbonato (PC) según la invención, tratadas o no tratadas con heparina, EC y HPMC. El tratamiento de superficie disminuye la fibrosis y la infiltración celular (flechas negras) y aumenta la vascularización (*) para los dos tipos de membrana.

50 Figura 4: Aspecto de los órganos bioartificiales después de 15 días del implante en cerdos. Uno de los dispositivos está compuesto por membranas de PC monocapa y el otro por membranas de PET multicapa. El dispositivo con membranas de PC muestra amplios desgarros. El dispositivo con membranas de PET multicapa, por su parte, no muestra ningún daño macroscópico. Dichas membranas de PET multicapa se analizaron, así, mediante microscopía electrónica de barrido, que no mostró microfisuras.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: Fabricación de membranas semipermeables

60 Las membranas se fabrican de la forma siguiente: se prepararon dos capas porosas de PET (poli(tereftalato de etileno)) a partir de películas de PET biocompatibles mediante el proceso de "grabado de trazas", seguido de laminación con la capa de PET no tejido que tiene una densidad de entre 30 y 60 g/m² (ubicada entre las dos capas de PET biocompatibles porosas). Se lleva a cabo una laminación térmica sin utilizar adhesivos. Una de las capas porosas de PET tiene una densidad de poros de entre 2 10⁹ y 7 10⁹ poros/cm² con un diámetro interno de poro de entre 10 y 30 nm. El espesor de esta membrana es de entre 8 y 12 μm. La otra capa de PET poroso tiene una densidad

de poros de entre 10^7 y $5 \cdot 10^7$ poros/cm² con un diámetro interno de poro de entre 400 y 600 nm. El espesor de esta membrana es de entre 30 y 50 µm. El espesor total de la membrana es inferior a 200 µm.

5

Ejemplo 2: Tratamiento de superficie de las membranas

Las membranas preparadas según el ejemplo 1 se sometieron a un tratamiento de superficie según el protocolo del ejemplo 1 del documento WO 2012/017337.

10

Las membranas se funcionalizan con una primera capa de heparina mezclada con una solución de etilcelulosa (EC), después se cubren con una capa de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Ejemplo 3: Caracterización de la permeabilidad de la membrana

15

Los ensayos de permeabilidad a glucosa, permeabilidad a insulina y permeabilidad a inmunoglobulina (IgG) de las membranas preparadas previamente se llevaron a cabo según el siguiente protocolo:

Material

20

Cámara de difusión que consiste en un compartimento superior y un compartimento inferior separados por la membrana cuya permeabilidad se desea someter a ensayo (la estanqueidad entre los dos compartimentos viene proporcionada por un sello), glucosa (Fischer Scientific, Illkirch, Francia, ref: G/0500/53), NaCl, IgG (Sigma, Lyon, Francia, ref: I9640), insulina (Sigma, ref: I9278), agua destilada.

25

Preparación de soluciones

- Solución salina fisiológica

30

Para 1 l: se disuelven 9 g de NaCl en 1 l de agua destilada.

- Glucosa (4 g/l)

35

Para 1 l: se disuelven 4 g de glucosa en 1 l de solución salina fisiológica.

- IgG (5,75 µg/ml)

Para 60 ml: se diluyen 34,5 µl de solución madre de IgG (10 mg/ml) en 59,966 ml de solución salina fisiológica.

40

- Insulina (100 µg/ml)

Para 60 ml: se diluyen 60 µl de solución madre de insulina (10 mg/ml) en 59,960 ml de solución salina fisiológica.

Protocolo

45

Se introducen 3 ml de solución salina fisiológica en el compartimento inferior de la cámara de difusión, y la membrana cuya permeabilidad se desea someter a ensayo se dispone sobre la solución salina fisiológica evitando la presencia de burbujas de aire. Se introducen 3 ml de solución de glucosa en el compartimento superior, después se cierra la cámara de difusión con parafilm y se incuba a 37 °C.

50

Al finalizar el tiempo de incubación se extrae 1 ml de la solución contenida en el compartimento superior de la cámara de difusión después de una homogeneización suave. Después se retira la membrana y se retira 1 ml de la solución del compartimento inferior después de la homogeneización.

55

El análisis enzimático de la glucosa se lleva a cabo utilizando el kit Glucose RTU® (BioMerieux, Craaponne, Francia ref: 61 269). La insulina y las IgG se analizan utilizando el procedimiento del ácido bicínico (BCA) mediante el kit de ensayo Quantipro BCA (Sigma, ref: QPBCA-1KT). Los resultados se expresan como porcentaje de permeabilidad, calculado de la forma siguiente:

60

$$\text{Permeabilidad (como \%)} = \left(\frac{C_{\text{compartimento inferior}}}{C_{\text{compartimento superior}} + C_{\text{compartimento inferior}}} \right) \times 100$$

C: concentración de glucosa, IgG o insulina.

65

En equilibrio, las concentraciones en el compartimento superior y en el compartimento inferior son idénticas, lo que corresponde a una permeabilidad máxima del 50%.

Resultados

5 Los resultados se muestran en la figura 1. Se sometieron a ensayo membranas de poli(tereftalato de etileno) (PET) multicapa según la invención (Ejemplo 1), y también membranas de la técnica anterior tal como se describen en el documento WO 02/060409 o el documento WO 2012/017337, fabricadas de policarbonato y que tienen una capa de heparina mezclada con EC y una capa de HPMC.

10 Se observó una difusión más lenta de insulina y glucosa con las membranas de PET. Sin desear vincularse a esta teoría, es posible que esto se deba a la presencia de las múltiples capas de las que están compuestas.

Las membranas de PET son totalmente impermeables a las IgG.

Ejemplo 4: Ensayos de implante de membrana semipermeable

15 Las membranas se implantan en la cavidad peritoneal de ratas Wistar sanas, según el protocolo descrito en el ejemplo 3 del documento WO 2012/017337.

20 No obstante, el protocolo relacionado con la toma de las muestras se modificó y las muestras se toman de la forma siguiente:

Toma de muestras de tejido

Soluciones utilizadas

25 - Glutaraldehído al 2,5% preparado, bajo una campana, a partir de glutaraldehído al 25% (Sigma, ref: G5882 - 10x10 ml) diluido hasta diez veces en agua ultrapura.

30 - PBS (referencia: Gibco - 14190-094).

- Recipiente precargado con paraformaldehído al 4% (Labonord, ref: PFFOR0060AF59001).

35 Las membranas sometidas a ensayo son las membranas de PET según la invención (multicapa) y las membranas de PC de la técnica anterior, que opcionalmente se han sometido a un tratamiento de superficie para depositar heparina, EC y HPMC.

Los resultados se muestran en la figura 3: se observa que el tratamiento de superficie con heparina reduce la fibrosis y la infiltración celular (flechas negras) y aumenta la vascularización (*) para los dos tipos de membrana.

Ejemplo 5: Ensayo de estimulación con glucosa de islotes a través de la membrana

a) Aislamiento de islotes pancreáticos de rata

Animales utilizados

45 Los animales utilizados son ratas Wistar machos que pesan 250-300 g (Laboratorio Janvier, Le Genes St. Île, Francia). Las ratas se alojan en jaulas colectivas estándar a una temperatura de 23 ± 1 °C, y una higrimetría del $55 \pm 3\%$ y con un ciclo de 12 h de luz y 12 h en la oscuridad. El alimento SAFE-A04 (Villemoisson-sur-Orge, Francia) y el agua están disponibles *ad libitum*. Los experimentos con animales se llevan a cabo de conformidad con la directiva europea 2010/63/UE.

Extirpación del páncreas

55 El animal se anestesia con una mezcla de Imalgene 1000® (ingrediente activo: ketamina, Centravet ref: IMA004) suplementado con 2,7 ml de Rompun® (ingrediente activo: xilazina al 2%, Centravet ref: ROM001) inyectada por vía intraperitoneal a una dosis de 100 µl/100 g de peso corporal.

60 Después de haber verificado la ausencia de reflejos del animal, este último se tiende boca arriba. A continuación se realiza una laparotomía y el conducto biliar se liga en su abertura duodenal. Después se cateteriza en su abertura hepática y el animal se sacrifica por desangrado. Después se inyectan en el páncreas 10 ml de colagenasa tipo XI (Sigma, ref: C7657) a 1 mg/ml a 4 °C por medio del catéter.

65 A continuación se extrae el páncreas y se dispone en un tubo Falcon de 50 ml que contiene 3,75 ml de "solución de perfusión" estéril. Esta solución se compone de 500 ml de HBSS (solución salina equilibrada de Hanks, Lonza, ref: BE10-527F), 2,1 ml de bicarbonato de sodio al 8,4%, 1,175 ml de cloruro de calcio 1 M y 12,5 ml de HEPES 1 M. Para limitar la acción de la enzima durante la extracción, los tubos que contienen el páncreas se mantienen en hielo.

Digestión

5 Inmediatamente después de que se hayan retirado los páncreas, el tubo se dispone en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos. Después se agita vigorosamente durante unos pocos segundos para que el tejido se disocie bien. A continuación se constituye con una solución de lavado fría. La solución de lavado está compuesta de M199 (Sigma, ref: M0393-50L) suplementado con 0,35 g/l de bicarbonato de sodio (Sigma, ref: S-5761), con el 10% de suero de ternera fetal (FCS, Lonza, ref: DE14 -801F) y con el 1% de antibiótico antimicótico (AMAB, Fisher, ref: W3473M).

10 El contenido del tubo se filtra en insertos (insertos Corning Netwell, Sigma, ref: CLS3480) y el filtrado se transfiere a un tubo Corning de 200 ml que se centrifuga durante 1 minuto a 1200 rpm a 4 °C. A continuación se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende con solución de lavado fría y después se transfiere a un tubo Falcon de 50 ml. Después de centrifugación durante 1 minuto a 1200 rpm a 4 °C, se elimina una cantidad máxima de sobrenadante antes de pasar a la etapa de purificación.

15 *Purificación*

La purificación de los islotes se lleva a cabo utilizando un gradiente discontinuo de Ficoll (Fisher, ref: BP525-500) que se compone de 3 soluciones de diferentes densidades preparadas en el laboratorio: 1,108 (Ficoll 1): 1,108, 1,096 (Ficoll 2): 1,096 y 1,069 (Ficoll 3): 1,069.

25 El sedimento celular se resuspende en 12 ml de Ficoll 1, y se añaden cuidadosamente 10 ml de Ficoll 2 y después de Ficoll 3 sobre la parte superior. Finalmente, se depositan 5 ml de PBS (Fisher, ref: 20012-019) sobre el Ficoll 3. Todo el conjunto se centrifuga durante 4 minutos a 400 rpm a 4 °C y después durante 12 minutos a 2000 rpm a 4 °C. Las velocidades de frenado y aceleración de la centrifugadora se ajustan al mínimo para no alterar los gradientes.

Los islotes se recuperan en la interfaz entre Ficoll 2 y Ficoll 3, y después se lavan tres veces en una solución de lavado fría para eliminar cualquier rastro de Ficoll.

30 *Cultivo*

Los islotes se cultivan en medio M199 (Gibco, ref: 23340-020) que contiene el 10% de FCS (Lonza, ref: DE14-801F) y el 1% de AMAB (Fisher, ref: W3473M) en matraces de 25 cm² no tratados (Dutscher, ref: 690195), durante 24 horas a 37 °C y en una atmósfera húmeda con el 5% de CO₂.

35 *b) Ensayo de estimulación*

40 Se disponen diez islotes de rata en insertos (tipo de cilindros) a un extremo de los cuales está unida la membrana de PET. Esta membrana está orientada de tal forma que la membrana nanoporosa (que tiene poros con un diámetro interno entre 10 y 50 nm y que es selectiva para moléculas de hasta 150 kDa) se encuentra en el interior del inserto, en contacto con los islotes de las ratas, estando la capa que tiene los poros con un diámetro de entre 400 y 600 nm orientada hacia el exterior del inserto.

45 El inserto contiene 400 µl de solución de Krebs que contiene el 10% de FCS y 2,5 mM de glucosa. Los insertos rellenos de esta forma se disponen en pocillos de una placa de 24 pocillos que contiene 1 ml de solución de Krebs que contiene el 10% de FCS y 25 mM de glucosa. Después se incuba la placa de 24 pocillos a 37 °C y se toman muestras del medio contenido en los pocillos a las 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h. Después se analiza la insulina presente en las muestras utilizando el procedimiento ELISA (Mercodia, ref: 1250-01).

50 También se toman muestras de los islotes y se disponen en 50 µl de tampón de lisis (ThermoScientific, ref: 78501), suplementado con un inhibidor de proteasa (ThermoScientific, ref: 78441), para extraer las proteínas totales. La extracción se lleva a cabo disponiendo los tubos en hielo durante 30 minutos, mientras se agitan con vórtice regularmente las muestras. El contenido de proteína total de los islotes se determina mediante un ensayo de Bradford y se utiliza para normalizar la secreción de insulina entre los diversos cultivos de islotes.

55 **Ejemplo 7: Implante y explante de MAILPAN® en cerdos**

60 Se prepara una cámara de encapsulación (MAILPAN®, para MACro-encapsulation d'ILots PANcréatiques [macroencapsulación de islotes pancreáticos]) según el procedimiento descrito en el documento WO 2012/010767. Se suelda entre sí dos membranas semipermeables. Esta cámara de encapsulación tiene una lámina interna y también conectores.

Anestesia

65 La premedicación es sistemática antes de cualquier anestesia y consiste en la administración intramuscular de una combinación de butirofenona: 2 mg/kg de azaperona (Stresnil*) y 10 mg/kg de ketamina (Imalgene*).

La anestesia general se lleva a cabo según el protocolo descrito a continuación:

- 5 - Los animales se llevan, premedicados, al bloque de operaciones y se disponen en la mesa de operaciones acostados de lado.
- Se cateteriza una vena periférica (G 22) en una oreja y se asegura su permeabilidad enjuagando con una solución de NaCl al 0,9%.
- 10 - La inducción se lleva a cabo mediante inyección intravenosa de un hipnótico (5 mg/kg de tiopental o 4 mg/kg de propofol) y de un agente curarizante (0,1 mg/kg de pancuronio). Inmediatamente después se realiza una intubación orotraqueal (Portex Blue Line, globo de baja presión, calibre 6 para un sujeto que pesa de 25 a 35 kg) y ventilación pulmonar utilizando un sistema circular semicerrado conectado a un respirador que opera en modo de presión controlada. La ventilación ($FiO_2 = 0,5$ $FiN_2O = 0,5$) se ajusta para mantener E_rCO_2 entre 35 y 45 mmHg. El respirador es un aparato para seres humanos de última generación (GE Avance*, Aisys* o Aespire*) equipado con controles de caudal de corriente, presión y volumen.
- 15 - La anestesia se mantiene en modo de inhalación con isoflurano (fracción inspirada = 2% en volumen) con un caudal de gas nuevo de 2 l/min de una mezcla 50%/50% de O_2/N_2O que sirve como gas vector.
- 20 - Si se demuestra que es necesario, la administración de dosis posteriores de pancuronio proporciona una relajación muscular óptima bajo la cobertura de anestesia por inhalación profunda (MAC de isoflurano en O_2 puro = 1,15% en volumen y MAC de N_2O = 110% en volumen).

25 *Implante de MAILPAN®*

Después de la anestesia de los animales, el abdomen de los animales anestesiados se hace aséptico con etanol al 70% y luego betadina (teniendo cuidado de no provocar hipotermia) y se afeita utilizando una cuchilla de bisturí. Se realiza una incisión longitudinal de aproximadamente 10 a 15 centímetros de los planos de la piel y los músculos hasta el peritoneo en el centro de la zona despejada. Después de una laparotomía media, el prototipo se implanta extraperitonealmente, después de rellenarlo con solución salina fisiológica, y se une a la pared con hilo (Vicryl 2/0). Los dos catéteres del MAILPAN (uno utilizado para el llenado y el otro para el vaciado de los islotes presentes en el MAILPAN, en un período posterior al implante) están conectados a dos cámaras de inyección colocadas por vía subcutánea, antes de la ligadura del peritoneo por movimiento sinusoidal, utilizando hilo de sutura 4-0.

Al final de la cirugía, las heridas se infiltran con naropeína y se administrará IV fentanilo antes de que el animal se despierte. Los gránulos de fentanilo se administran durante la operación con el suministro de alimento, en una proporción de 2 mg/kg.

40 *Explant de MAILPAN®*

Los dispositivos MAILPAN se explantan 15 días y 60 días después del trasplante con anestesia general para evaluar la resistencia mecánica del MAILPAN, su esterilidad y la biocompatibilidad del mismo (vascularización en la superficie, ausencia de inflamación, ausencia de fibrosis y de inflamación en los tejidos circundantes). Por lo tanto, se toman muestras de tejidos que rodean el MAILPAN en cada explante del dispositivo para posteriores ensayos histológicos. Los cerdos se sacrifican después de cada explante mediante inyección intravenosa de KCl.

Las muestras de tejido se toman en las mismas condiciones que para la rata (véase el ejemplo 5: mismas soluciones para tejidos y membranas, se llevan a cabo los mismos análisis).

50 **Ejemplo 8: Análisis de las membranas mediante microscopía electrónica de barrido**

Después de la toma de muestras, las membranas se enjuagan en agua ultrapura y se fijan durante 24 a 48 h a 4 °C en glutaraldehído (Sigma, ref: G5882) diluido al 2,5%. Las membranas fijas se enjuagan después durante 10 minutos en agua ultrapura.

Después, las muestras se deshidratan utilizando baños sucesivos de etanol: dos baños de 10 minutos en etanol al 50%, un baño de 25 minutos en etanol al 70%, después un baño de 10 minutos en etanol al 95% y, finalmente, dos baños de 10 minutos en etanol al 100%. Para eliminar por completo las trazas de agua que aún pueden estar presentes en las muestras, se realiza una incubación durante 2 minutos en hexametildisilazano (HMDS) (Sigma, ref: 440191).

Después de secarlas al aire libre, las muestras se unen adhesivamente en bloques (Delta Microscopies, ref: 75220), utilizando adhesivo conductor de carbono (Delta Microscopies, ref: 76510).

65 Una vez que el adhesivo se ha solidificado, las muestras se metalizan depositando una capa fina de oro-paladio y posteriormente de carbono.

La observación se lleva a cabo en un microscopio electrónico de barrido de efecto de campo (SEM) (Hitachi S800) (plataforma de imagen *in vitro* del Centro de Neuroquímica de Estrasburgo) a un voltaje de 5 kV, lo que permite obtener una buena resolución sin dañar las muestras.

5

Resultados

Se observa que el dispositivo producido con membranas de PC muestra grandes desgarros (figura 4).

10 Por otra parte, el dispositivo producido con las membranas de PET multicapa no muestra, por su parte, ningún daño macroscópico. Dichas membranas se analizaron de esta forma mediante microscopía electrónica de barrido, que no mostró microfisuras (figura 4).

15 Por lo tanto, parece que las membranas según la invención permiten una difusión similar a la observada para las membranas de la técnica anterior y claramente tienen la propiedad de semipermeabilidad (bloqueo de IgG y otras proteínas del sistema inmunitario). Estas membranas muestran una resistencia mucho mejor cuando se utilizan en un órgano bioartificial implantado *in vivo*.

20 Se han obtenido más datos para la resistencia a la tracción *in vitro* para membranas de PET. La resistencia es ligeramente mayor para una membrana de tres capas (dos membranas de PET porosas que rodean una membrana de PET no tejida), que para una membrana de dos capas (una membrana de PET porosa laminada sobre una membrana de PET no tejida). La resistencia a la tracción de la membrana de dos capas es mayor que la de una membrana de PET porosa monocapa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cámara para encapsular células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico que comprende una envoltura cerrada fabricada de una membrana semipermeable, que delimita un espacio capaz de contener dichas células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico, caracterizada por que dicha membrana comprende una capa de polímero no tejido biocompatible ubicada entre dos capas de polímeros biocompatibles porosos.
- 10 2. La cámara de encapsulación según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha membrana consiste en una capa de polímero no tejido biocompatible ubicada entre dos capas de polímeros biocompatibles porosos.
- 15 3. La cámara de encapsulación según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que dicho polímero no tejido se elige de entre policarbonato (PC), poliéster, polietilenimina, polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliamida y polietileno (PE).
- 20 4. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que dicho polímero biocompatible poroso de al menos una capa se elige de entre policarbonato (PC), poliéster, polietilenimina, polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliamida y polietileno (PE).
- 25 5. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que al menos una o las dos capas de polímero biocompatible poroso se hace(n) hidrófila(s) mediante modificación física o química de la superficie, y se cubre(n) con al menos un polímero hidrófilo.
- 30 6. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que una de las dos capas de polímeros biocompatibles porosos tiene una densidad de poros de entre 10^6 poros/cm² y 10^{11} poros/cm².
- 35 7. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que el espesor total de la membrana se encuentra entre 45 μ m y 200 μ m.
- 40 8. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que el espesor de una de las capas de polímero biocompatible poroso se encuentra entre 5 y 40 μ m y el espesor de la otra capa de polímero biocompatible poroso se encuentra entre 25 y 100 μ m.
- 45 9. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que el diámetro interno de los poros presentes en una de las capas de polímero biocompatible poroso se encuentra entre 5 y 100 nm, y el diámetro interno de los poros presentes en la otra capa de polímero biocompatible poroso se encuentra entre 100 y 2000 nm, preferentemente entre 200 y 1000 nm.
- 50 10. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, caracterizada por que al menos una capa está cubierta con un polímero hidrófilo que contiene al menos una molécula biológicamente activa.
- 55 11. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que también comprende una lámina biocompatible contenida en dicha envoltura, comprendiendo dicha lámina opcionalmente proyecciones en su superficie.
- 60 12. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que dicha membrana comprende dos capas de polímeros biocompatibles, en la que la capa externa con respecto a la envoltura tiene poros con un diámetro interno de entre 100 y 2000 nm, y la capa interna con respecto a la envoltura tiene poros con un diámetro interno de entre 5 y 100 nm.
- 65 13. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada por que comprende al menos un conector que posibilita establecer una comunicación entre el exterior y el interior de la envoltura.
14. La cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada por que es circular y tiene un diámetro de entre 3 cm y 20 cm.
15. Órgano bioartificial, caracterizado por que comprende al menos una cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que están presentes células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico.
16. El órgano bioartificial según la reivindicación 15, caracterizado por que es un páncreas bioartificial que contiene células secretoras de insulina o islotes de Langerhans.
17. Un proceso para obtener una cámara de encapsulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende una etapa de soldadura térmica de una o dos membranas que comprenden al menos una capa de polímero

biocompatible poroso y una capa de polímero biocompatible no tejido, para formar una bolsa cerrada concebida para albergar las células secretoras que producen al menos una sustancia de interés terapéutico.

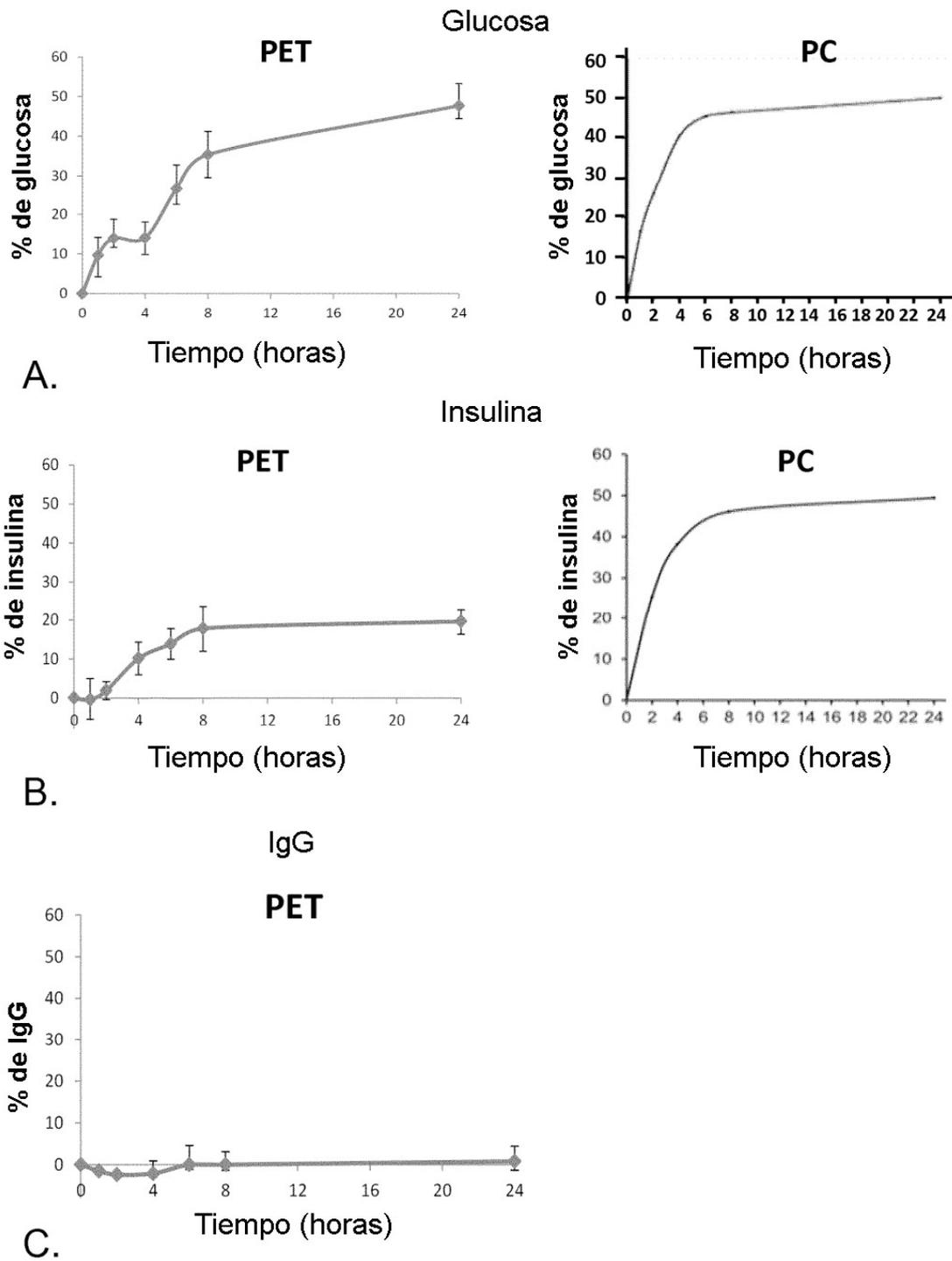


Figura 1

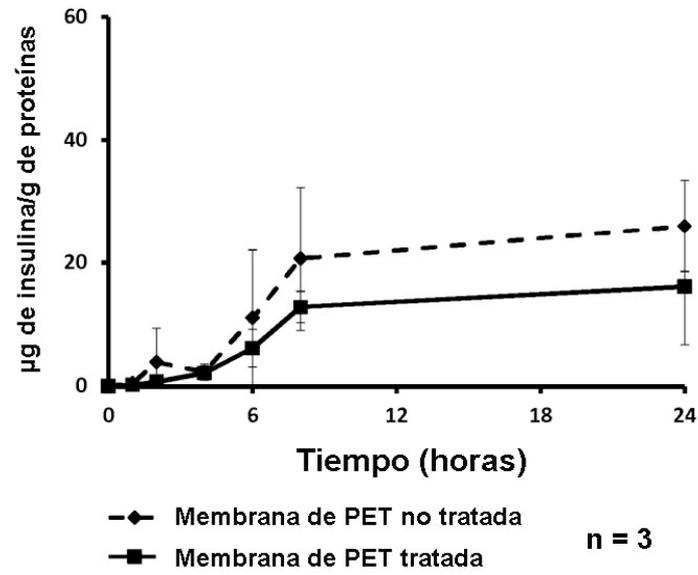


Figura 2

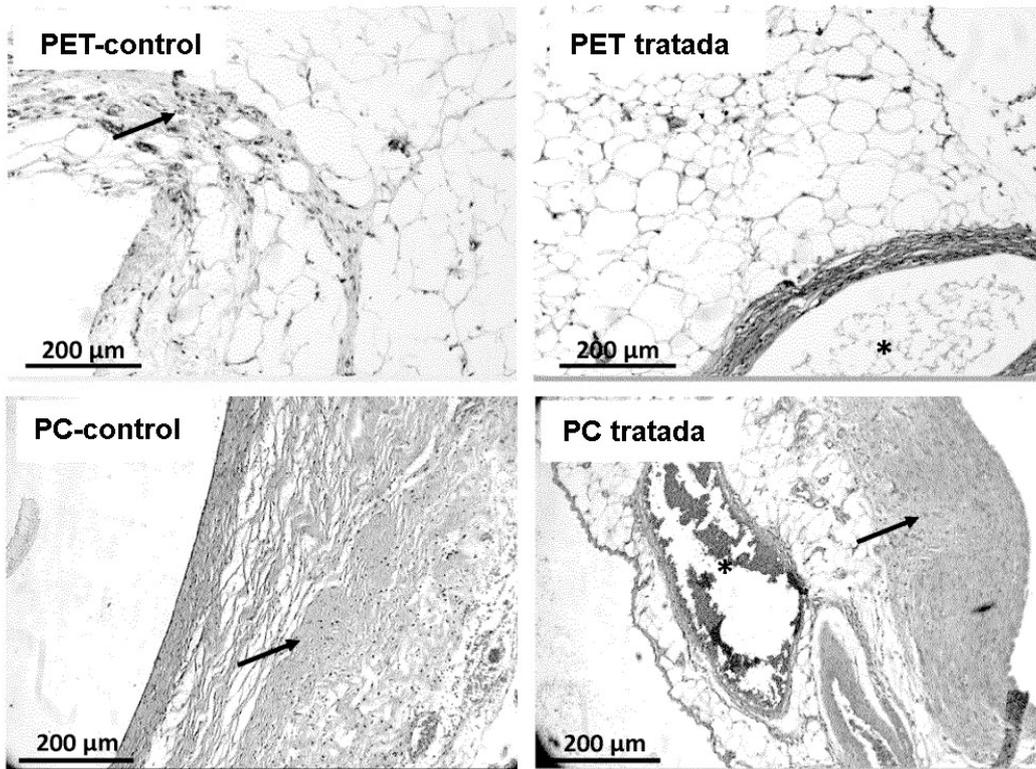


Figura 3

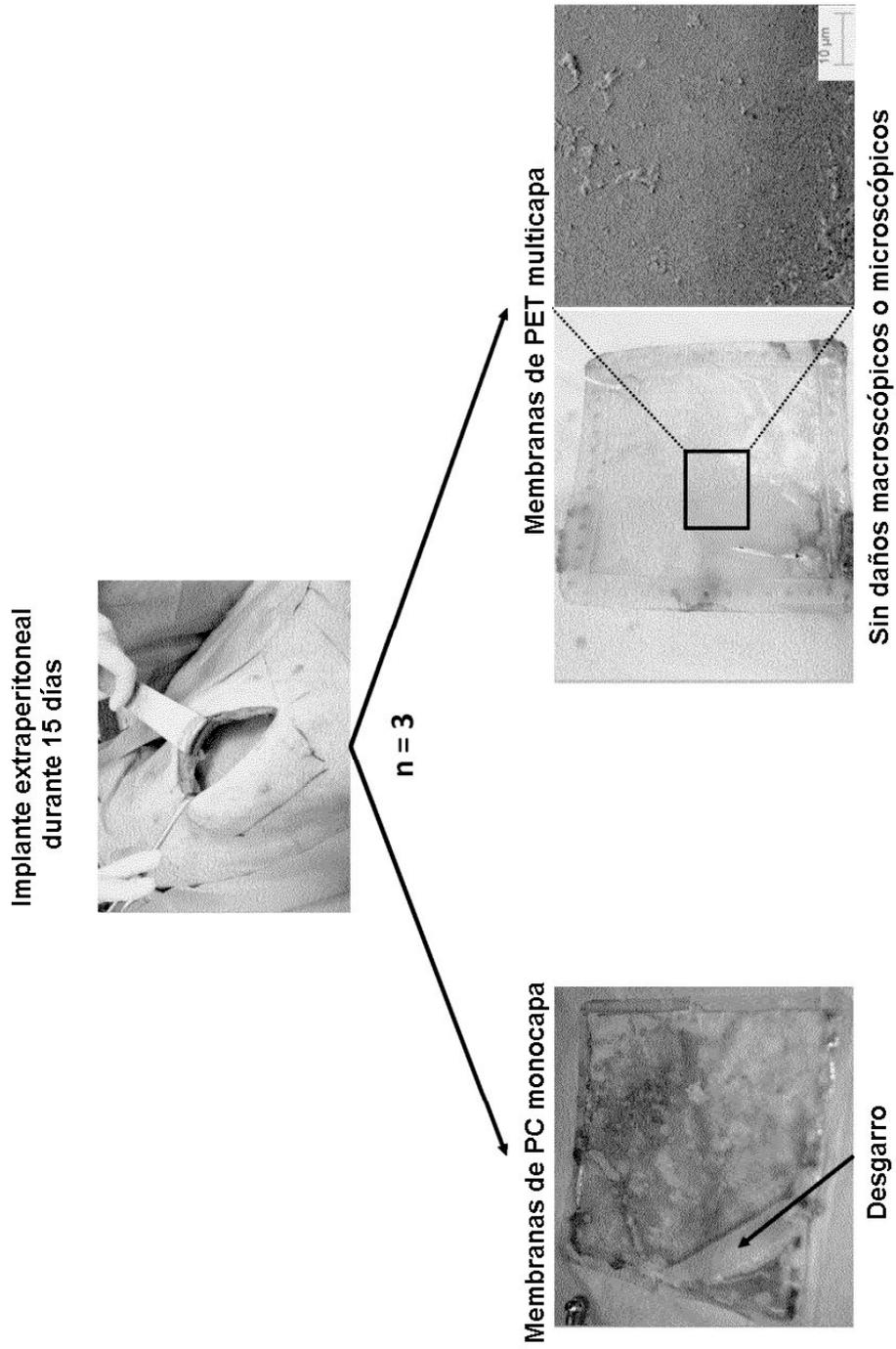


Figura 4