



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 390**

51 Int. Cl.:
A61K 35/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
C12N 11/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03018701 .7**
86 Fecha de presentación : **21.03.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **1382346**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54 Título: **Medio acondicionado y producto biológico difundible producido incubando células atrapadas.**

30 Prioridad: **03.04.1996 US 625595**
07.11.1996 US 745063

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

73 Titular/es: **THE ROGOSIN INSTITUTE**
505 East 70th Street
New York, New York 10021, US

72 Inventor/es: **Jain, Kanti;**
Rubin, Albert;
Asina, Shirin;
Smith, Barry y
Stenzal, Kurt

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 290 390 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

Medio acondicionado y producto biológico difundible producido incubando células atrapadas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al encapsulado de células en agarosa y colágeno, seguido de recubrimiento con agarosa, métodos terapéuticos que emplean los materiales celulares, y su fabricación.

10 **Antecedentes de la técnica anterior**

El encapsulado de diversos materiales biológicos en materiales compatibles biológicamente es una técnica que se ha usado durante algún tiempo, aunque con éxito limitado. Ejemplos de la técnica son las patentes de los EE.UU. n^{os} 5.227.298 (Weber, *et al.*); 5.053.332 (Cook, *et al.*); 4.997.443 (Walthall, *et al.*); 4.971.833 (Larsson, *et al.*); 4.902.295 (Walthall, *et al.*); 4.798.786 (Tice, *et al.*); 4.673.566 (Gooser, *et al.*); 4.647.536 (Mosbach, *et al.*); 4.409.331 (Lim); 4.392.909 (Lim); 4.352.883 (Lim); y 4.663.286 (Tsang, *et al.*). También es de interés la solicitud en trámite junto a la presente con n^o de serie 08/483.738 presentada el 7 de junio de 1995 de Jain, *et al.* Jain, *et al.* trata, en algún detalle, el encapsulado de células secretoras en diversos materiales biocompatibles. Como se trata en dicho documento, las células secretoras son células que secretan productos biológicos. En líneas generales, las células secretoras poseen, al menos, algunas propiedades de células endocrinas, y pueden, en general, ser tratadas como equivalentes a células que son endocrinas por naturaleza. La solicitud en tramitación con la presente trata, por ejemplo, el encapsulado de células que producen insulina, preferentemente en forma de islotes, en perlas de agarosa-colágeno que han sido recubiertas también con agarosa. Los productos resultantes son útiles para tratar enfermedades en las que un individuo necesita terapia con insulina, como la diabetes.

La solicitud de Jain, *et al.* trata, en algún detalle, los enfoques anteriores en terapia de trasplantes realizados por la técnica. Estos se resumen también en la presente memoria.

Se conocen cinco planteamientos fundamentales para proteger el tejido transplantado de la respuesta inmunitaria del anfitrión. Todos implican intentos de aislar el tejido transplantado del sistema inmunitario del anfitrión. Las técnicas de inmunoaislamiento usadas hasta la fecha incluyen: cámaras de difusión extravascular, cámaras de difusión intravascular, cámaras de ultrafiltración intravascular, microencapsulado, y macroencapsulado. Sin embargo, todos estos métodos han fallado, debido a uno o más de los siguientes problemas: una respuesta fibrótica del anfitrión al material implantado, inestabilidad del material implantado, difusión limitada de nutrientes a través de las membranas semipermeables, agentes secretores y permeabilidad del producto, y difusión retrasada a través de las barreras de membrana semipermeable.

Por ejemplo, un procedimiento de microencapsulado para cercar células viables, tejidos, y otras membranas inestables dentro de una membrana semipermeable fue desarrollado por Lim en 1978. (Lim, informe de investigación para Damon Corporation (1978)). Lim usó microcápsulas de alginato y poli L-lisina para encapsular los islotes de Langerhans. En 1980 se informó de la primera aplicación *in vivo* con éxito, en investigación de diabetes, de esta novedosa técnica (Lim, *et al.*, Science 210: 908 (1980)). La implantación de estos islotes de Langerhans microencapsulados dio como resultado mantener un estado euglicémico en animales diabéticos. Sin embargo, otros investigadores repitiendo estos experimentos, encontraron que el alginato provocaba reacción tisular y fueron incapaces de reproducir los resultados de Lim *et al.* (Lamberti, *et al.* Applied Biochemistry and Biotechnology 10: 101 (1984); Dupuy, *et al.*, J. Biomed. Material and Res. 2-2: 1061 (1988); Weber, *et al.*, Transplantation 49: 396 (1990); y Doon-shiong, *et al.*, Transplantation Proceedings 22: 754 (1990)). Se considera ahora que la solubilidad en agua de estos polímeros es responsable de las limitadas estabilidad y biocompatibilidad *in vivo* de estas microcápsulas (Dupuy, *et al.* citado anteriormente, Weber, *et al.* citado anteriormente, Doon-shiong, *et al.*, citado anteriormente, y Smidsrod, Faraday Discussion of Chemical Society 57: 263 (1974)).

Recientemente, Iwata *et al.*, (Iwata, *et al.* Jour. Biomedical Material and Res. 26: 967 (1992)) utilizó agarosa para el microencapsulado de islotes pancreáticos alogénicos y descubrió que podía usarse como un medio para la preparación de microperlas. En su estudio, 1500-2000 islotes se microencapsularon individualmente en agarosa al 5% y se implantaron en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina. El injerto sobrevivió durante un largo periodo de tiempo, y los receptores mantuvieron normoglucemia indefinidamente.

Su método padece, sin embargo, varios inconvenientes. Es incómodo e inexacto. Por ejemplo, muchas perlas permanecen recubiertas de forma parcial y varios cientos de perlas de forma vacía de agarosa. Se requiere, de este modo, un tiempo adicional para separar los islotes encapsulados de las perlas vacías. Es más, la mayoría de la microperlas implantadas se reúnen en la cavidad pélvica, y se requiere un gran número de islotes en perlas individuales completamente recubiertas para conseguir normoglucemia. Además, las perlas transplantadas son difíciles de recuperar, suelen ser frágiles, y liberarán fácilmente islotes tras ligero daño.

También se ha probado un procedimiento de macroencapsulado. Se hicieron macrocápsulas de diversos materiales diferentes, como poli-2-hidroxietil-metacrilato, policloruro de vinilo-c-ácido acrílico, y acetato de celulosa, para el inmunoaislamiento de islotes de Langerhans. (Véase Altman, *et al.*, Diabetes 35: 625 (1986); Altman, *et al.*, Transplantation: American Society of Artificial Internal Organs 30: 382 (1984); Ronel, *et al.*, Jour. Biomedical Material

Research 17: 855 (1983); Klomp, *et al.*, *Jour. Biomedical Material Research* 17: 865-871 (1983)). En todos estos estudios sólo se consiguió una normalización transitoria de la glucemia.

Archer *et al.*, *Journal of Surgical Research* 28: 77 (1980), usó fibras huecas de copolímero acrílico para prevenir de forma temporal el rechazo de islotes xenoinjertados. Informaban de supervivencia a largo plazo de injertos pancreáticos de murina neonatal dispersada en fibras huecas que fueron transplantadas a hamsters diabéticos. Recientemente, Lacy *et al.*, *Science* 254: 1782-1784 (1991) confirmaron sus resultados, pero encontraron que el estado euglicémico estaba en una fase transitoria. Descubrieron que cuando los islotes eran inyectados en la fibra, se agregaban dentro del tubo hueco con la resultante necrosis en la porción central de las masas de islotes. La necrosis central impedía la prolongación del injerto. Para resolver este problema usaron alginato para dispersar los islotes en la fibra. Sin embargo, este experimento no se ha repetido mucho. Por lo tanto, la función de las membranas como un medio de transplante de islotes en seres humanos es cuestionable.

De este modo, existía la necesidad de conseguir transplante de células secretoras, y, en particular, la supervivencia de islotes pancreáticos aloinjertados y xeroinjertados sin el uso de agentes inmunosupresores crónicos.

En el trabajo de Jain, *et al.* tratado anteriormente, los inventores informaban que encapsular células secretoras en un material de gel hidrófilo resulta en un material funcional, no inmunogénico, que puede ser transplantado a animales y que puede ser almacenado durante largos periodos de tiempo. El encapsulado de células secretoras proporcionó una técnica más eficaz y manejable para transplante de células secretoras. La técnica de encapsulado se describió como útil para encapsular otros agentes biológicos, como enzimas, microorganismos, agentes tróficos incluyendo agentes tróficos producidos de forma recombinante, agentes citotóxicos, y agentes quimioterapéuticos. Los agentes biológicos encapsulados fueron discutidos como útiles para tratar enfermedades que se sabe que responden a los agentes biológicos.

La solicitud no trata, en ninguna medida, la incorporación de células que producen materiales biológicos difundibles, siendo los últimos útiles en un contexto terapéutico. Se distingue en la presente memoria entre células secretoras y células que producen materiales biológicos difundibles. El formador, de acuerdo con los ejemplos dados en la solicitud de Jain, se refiere, en general, a productos como hormonas, agentes que dan señales celulares, etc., que se considera, normalmente, que son "mensajeros" biológicos. En contraste, los materiales biológicos difundibles se refieren a materiales como péptidos que son síntomas de MCH, reguladores de la expresión celular como supresores, activadores, inductores, y así sucesivamente. La distinción se verá en el campo de la oncología, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente discusión.

Estudios extensos en cáncer han incluido trabajos en extractos celulares heterogéneos, y diversos componentes celulares. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales, la técnica ha identificado relevantes antígenos asociados con cáncer, por ejemplo, GM2, TF, STn, MUC-1, y diversos epítomos derivados de ellos. Teorías actuales postulan que los epítomos derivados de forma no covalente de estos diversos complejos indicadores de tumores, con moléculas MCH, forman, de este modo, un agrotipo por células T citolíticas específicas. Este mecanismo no es distinto de diversos mecanismos involucrados en la respuesta biológica a infecciones víricas. Nota a este respecto, Van der Bruggen, *et al.*, *Science* 254: 1643-1647 (1991); Boon, *et al.*, documento 5.405.940, y Boon, *et al.*, documento 5.342.774.

Investigaciones adicionales que comparan el trabajo de identificación de los así llamados epítomos de cáncer se ha centrado en la regulación de la proliferación del cáncer, como vía supresión o, más generalmente, biomodulación. Véanse, por ejemplo, Mitchell, *J. Clin. Pharmacol* 32: 2-9 (1992); Maclean, *et al.*, *Can. J. Oncol.* 4: 249-254 (1994). El propósito que une todos estos diversos planteamientos al cáncer es la modificación de la respuesta inmunitaria del anfitrión, para provocar alguna mejora en la enfermedad del paciente.

La clave de todos estos planteamientos es la actividad de uno o más productos biológicos difundibles que actúan de común acuerdo con otros materiales para modular la respuesta inmunitaria. Boon, *et al.* y van der Bruggen, *et al.*, por ejemplo, revelan moléculas pequeñas de péptido. Mitchell habla de moléculas mayores que funcionan, por ejemplo, como supresores.

Un problema con todos los planteamientos terapéuticos que emplean estos materiales es la administración de éstos de una forma segura y eficaz. Esto no es realizable de forma fácil. Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que la técnica de Jain, *et al.* que fue tan útil en el desarrollo de terapias para enfermedades que requieren productos de células secretoras, pueden ahora usarse en otros áreas.

Cómo se realiza esto es el tema de la invención, cuya descripción detallada viene a continuación.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Ejemplo 1

Este ejemplo, y los que siguen, emplean células RENCA. Éstas son células de adenocarcinoma renal espontáneo de ratones BALB/C, que están ampliamente disponibles, que han sido mantenidas tanto en cultivos *in vitro* como *in vivo*. Véase Franco *et al.*, *Cytokine Induced Tumor Immunogenicity*, 181-193 (1994).

ES 2 290 390 T3

Muestras de células RENCA congeladas fueron descongeladas a 37°C, y situadas después en matraces de cultivo hístico que contenían Medio Modificado de Dulbecco (D-MEM), que había sido suplementado con un 10% de suero bovino, penicilina (100 µg/ml) y estreptomicina (50 µg/ml), para dar lo que se denominará “medio completo” de aquí en adelante.

Las células se dejaron crecer hasta confluencia, y después se tripsinizaron, seguido de lavado con solución salina equilibrada de Hank, y después con el medio completo referido anteriormente.

Para determinar si las células RENCA producían tumores de forma eficaz, se inyectaron, de forma intraperitoneal, 10⁶ de estas células a dos ratones BALB/C. Se observó a los ratones durante un periodo de 3-4 semanas. Clínicamente, parecían sanos durante las dos primeras semanas, y mostraban una actividad normal. De ahí en adelante, las manifestaciones clínicas de cáncer se hicieron evidentes. Un ratón murió después de 23 días, y el segundo después de 25 días. Se examinó a los ratones después de la muerte, y se detectaron numerosos tumores de diversos tamaños. Algunos de los tumores mostraban, también, hemorragia.

Una muestra de un tumor, tomada de uno de los ratones, se fijó en formol al 10% para posterior examen histológico.

Ejemplo 2

Tras la demostración de que las células RENCA crecían *in vivo*, se realizaron estudios para determinar si estas células crecían en perlas de acuerdo con la invención.

Las células se dejaron crecer hasta confluencia, como se describió anteriormente, se tripsinizaron y se lavaron, como se describió también con anterioridad. Se prepararon entonces muestras de entre 60.000 y 90.000 células. Las células se centrifugaron después, a 750 rpm, y se eliminó el líquido. Las células se suspendieron después en soluciones de atelocolágeno al 1%, en solución salina de fosfato tamponada a un pH de 6,5.

Se preparó una solución de agarosa al 1% de baja viscosidad, en el mínimo medio esencial (MEM), se mantuvo a 60°C, y después se añadieron 100 µl de ella a la suspensión de células RENCA y atelocolágeno, descrita anteriormente. Los materiales se transfirieron después, inmediatamente, como una única gran gotita, a un aceite mineral estéril a temperatura ambiente. La mezcla formó una única perla semisólida lisa. Este procedimiento se repitió para producir varias perlas.

Después de un minuto, las perlas se transfirieron al medio completo, como se describió anteriormente, a 37°C. Las perlas se lavaron entonces tres veces con el mínimo medio esencial que contenía los antibióticos listados anteriormente. Se incubaron entonces las perlas a 37°C hasta el día siguiente, en una atmósfera humidificada de aire y un 5% de CO₂. Tras la incubación, las perlas, ahora sólidas, se transfirieron a una cuchara estéril que contenía 1 ml de agarosa al 5% en el mínimo medio esencial. Se hicieron rodar las perlas en la solución 2-3 veces para recubrirlas de forma uniforme con agarosa. Se transfirieron las perlas a aceite mineral antes de que la agarosa solidificara, para proporcionar una superficie exterior lisa. Después de 60 segundos, se lavaron las perlas, cinco veces, con medio completo a 37°C para eliminar el aceite. Siguió incubación hasta el día siguiente (37°C, atmósfera humidificada de aire, 5% CO₂).

Estas perlas que contenían RENCA se usaron en los experimentos que siguen.

Ejemplo 3

Antes de realizar investigaciones *in vivo*, fue necesario determinar si las células RENCA crecerían en las perlas preparadas de la manera descrita anteriormente.

Para hacer esto, perlas preparadas como se trató en el ejemplo 2 se incubaron en el medio descrito en el ejemplo 2, durante un periodo de tres semanas en las condiciones enumeradas. Se cortaron entonces tres de las perlas en trozos pequeños, y se cultivaron en matraces normalizados de cultivo, permitiendo el contacto directo tanto con el matraz como con el medio de cultivo.

La observación de estos cultivos indicó que las células crecían y formaban colonias RENCA estándar. Esto indicó que las células se habían mantenido viables en las perlas.

Ejemplo 4

Se realizaron entonces experimentos *in vivo*. En estos experimentos, se incubaron las perlas durante siete días a 37°C. Ratones sujeto recibieron transplantes de perlas. Para hacer esto se realizó a cada uno de cuatro ratones una incisión en la línea media llevada a término de forma intraperitoneal. Se transplantaron tres perlas, cada una de las cuales contenía 60.000 células RENCA. Se cerraron entonces las incisiones (sutura en dos capas), usando una sutura absorbible. Los cuatro ratones (BALB/C) eran normales, ratones macho, que pesaban entre 24-26 gramos y parecían

ES 2 290 390 T3

estar sanos. Se establecieron dos conjuntos de controles. En el primer conjunto, dos ratones recibieron tres perlas que contenían células no RENCA, y en el segundo, no se trató a dos ratones con nada.

Tres semanas después de la implantación, se inyectó a todos los ratones, de forma intraperitoneal, 10^6 células RENCA. Dieciocho días después, un ratón de control murió. Todos los ratones restantes fueron entonces sacrificados y observados.

Los ratones de control mostraban numerosos tumores, mientras que los ratones que recibieron los implantes de células encapsuladas en perlas mostraban sólo nódulos al azar por toda la cavidad.

Estos alentadores resultados sugerían el diseño de los experimentos expuestos en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 5

En estos experimentos, se simulaban cánceres demostrados inyectando células RENCA bajo una cápsula renal de cada uno de seis ratones BALB/C. Quince días después, se dividieron los ratones en dos grupos. Los tres ratones del primer grupo recibieron cada uno tres perlas, como se describió en el ejemplo 4, citado anteriormente. El segundo grupo (el grupo de control) recibió perlas que no contenían células RENCA.

Después de 4-5 días, los ratones que habían recibido implantes que contenían células RENCA parecían letárgicos y su pelo se había vuelto erizado, mientras el grupo de control permanecía energético, sin cambios en la condición del pelo.

Sin embargo, diez días después de la implantación (25 días después de la inyección de células RENCA), los ratones de control se volvieron perezosos y mostraban abdomenes distendidos. Uno de los tres ratones de control murió catorce días después del trasplante de las perlas. Siguió el sacrificio de los ratones.

Las cavidades corporales de los ratones de control mostraban profusa hemorragia, con numerosos tumores por todo el canal alimentario, hígado, estómago y pulmones. Toda la cavidad abdominal se había vuelto indistinguible debido al desenfrenado crecimiento tumoral. Los ratones que habían recibido perlas con células RENCA encapsuladas no mostraban, sin embargo, hemorragia y sólo mostraban unos pocos nódulos en los canales alimentarios. La comparación de los grupos de prueba y control mostró que, en el grupo de prueba, los nódulos no habían progresado.

Ejemplo 6

El crecimiento de forma libre de células RENCA inoculadas se inhibe cuando se incuban junto con células RENCA encapsuladas. Se realizó un conjunto adicional de experimentos para determinar si este efecto se observaba con otras células.

Una estirpe celular de adenocarcinoma, es decir, MMT (tumor mamario de ratón), se obtuvo a partir de la Colección americana de cultivos tipo. Las células de MMT encapsuladas se prepararon, como se describió anteriormente, con células MMT, para producir perlas que contenían 120.000 ó 240.000 células por perla. Tras la preparación de las perlas, se usaron para determinar si inhibirían la proliferación de células RENCA *in vitro*. Se prepararon, expresamente, dos placas Petri de seis pocillos, vía inoculación con 1×10^4 células RENCA por pocillo, en 4 ml de medio. En cada placa tres pocillos servían de control y tres de prueba. Uno de los tres pocillos de control en cada placa recibió una perla. Cada uno de los otros pocillos recibieron o dos o tres perlas vacías. El segundo pocillo se trató de forma similar, con pocillos que recibían una, dos o tres perlas que contenían 120.000 ó 240.000 células MMT. Los pocillos se incubaron a 37°C durante una semana, después de lo cual las células RENCA fueron tripsinizadas, lavadas y contadas, usando un hemocitómetro. Los resultados fueron los siguientes:

PLACA #1 (MACROPERLAS VACÍAS) # de células recuperadas después de una semana			PLACA #2 (MACROPERLAS CON CÉLULAS MMT) # de células recuperadas después de una semana	
Pocillo #	Control	Vacías	120.000 células MMT	240.000 células MMT
1	$2,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	1×10^5
2	$2,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	7×10^4
3	$4,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	9×10^4

ES 2 290 390 T3

Ejemplo 7

Tras los resultados del ejemplo 6, se realizaron los mismos experimentos usando 1×10^4 células MMT en lugar de células RENCA. El experimento se realizó exactamente como en el ejemplo 6. Los resultados se exponen a continuación.

Pocillo #	Control	Macroperlas vacías	Macroperlas MMT(1)	Macroperlas MMT(2)
1	$3,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
2	$3,3 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
3	$3,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$

Estos resultados alentaron el uso de un experimento *in vivo*. Este experimento se presenta en el ejemplo 8.

Ejemplo 8

Las células RENCA, como se usaron en los ejemplos anteriores, son células renales cancerosas. Para demostrar de forma más completa la eficacia general de la invención, se realizó un trabajo usando un tipo diferente de células cancerosas. Específicamente, se usaron células de adenocarcinoma.

Se obtuvo una estirpe celular de tumor mamario de ratón (MMT) a partir de la Colección americana de cultivos tipo. Usando los protocolos expuestos anteriormente, se prepararon implantes que contenían 120.000 células por perla, y 240.000 células por perla.

El modelo experimental usado fue el modelo de ratón, mencionado anteriormente. Veintidós ratones se dividieron en grupos de 4, 9 y 9. El primer grupo, es decir, los controles, se dividieron además en tres grupos de dos, uno y uno. El primer subgrupo recibió implantes de una perla que no contenía células. Un ratón recibió dos perlas vacías y uno recibió tres perlas vacías.

Dentro del grupo experimental A (9 animales), las perlas contenían 120.000 células, mientras en el grupo B, las perlas contenían 240.000 células. Dentro de los grupos "A" y "B" había tres subdivisiones, cada una de las cuales contenía tres ratones. Tres subgrupos recibieron una, dos o tres perlas que contenían células MMT.

Veintiún días después de la implantación, se inyectó a todos los animales 40.000 células RENCA. Inmediatamente después de la inyección, los ratones estaban letárgicos, con el pelo erizado. Esto persistió durante, aproximadamente, cinco días, después de lo cual se observó un comportamiento normal.

Después de veinte días, los ratones de control mostraban abdómenes distendidos, y pelo extremadamente erizado. Un ratón de control murió 25 días después de la inyección, mientras el resto de los ratones de control aparecían terminales. Se sacrificaron todos los ratones, y se observó el desarrollo tumoral. Estas observaciones se registran a continuación:

ES 2 290 390 T3

NÚMERO DE MACROPERLAS EN RATONES	CONTROL	GRUPO EXPERIMENTAL A	GRUPO EXPERIMENTAL B
1	++++	--	--
1	++++	--	--
1		+	++
2	++++	--	--
2		--	--
2		++	++
3	++++	--	--
3		--	--
3		--	+++

Estos resultados muestran, que de dieciocho ratones probados, trece no mostraron enfermedad. De los ratones del grupo (A), un ratón mostraba unos pocos nódulos y otro ratón mostraba unos pocos tumores. Un ratón que recibió dos perlas mostraba unos pocos tumores.

Dentro del grupo B, un ratón que había recibido una perla y un ratón que recibió dos perlas mostraban unos pocos tumores, enredados con los intestinos. Uno de los ratones que recibió tres perlas, había desarrollado un gran tumor sólido y estaba aparentemente muy enfermo. Aún así, los resultados de conjunto mostraron que las células de tumor mamario de ratón encapsuladas inhibían la formación de tumores.

Ejemplo 9

Como se sugirió anteriormente, la práctica de la invención resulta en la producción de algunos materiales o factores que inhiben y/o previenen la proliferación de células tumorales. Esto fue más explorado en el experimento que sigue.

Se hicieron perlas adicionales, como se describió anteriormente en el ejemplo 2, excepto que no se incluyó atelocollágeno. Por lo tanto, estas perlas son perlas de agarosa/agarosa. Las células RENCA, como se describió anteriormente, se incorporaron a estas perlas, de nuevo como se describió anteriormente.

Se usaron entonces dos conjuntos de tres placas de seis pocillos como control, y grupos experimentales. En el grupo de control, los pocillos se llenaron con 4 ml de medio completo RPMI (10% de suero fetal de ternera y 11 ml/l de penicilina). Cada pocillo del grupo de control fue inoculado entonces con 10.000 células RENCA.

En el grupo experimental, se acondicionó el medio completo RPMI, añadiendo material asegurado incubando 10 perlas que contenían RENCA, inmunoaisladas (120.000 células por perla), en una placa Petri de 35 x 100 mm que contenía 50 ml del medio completo RPMI. Tras cinco días de incubación, se recogió el medio de estas placas, y se colocaron 4 ml de él en cada pocillo de prueba. Se inocularon después estos pocillos con 10.000 células RENCA.

Todas las placas (tanto de control como experimentales) se incubaron a 37°C durante cinco días. Tras el periodo de incubación, las células fueron lavadas por tripsinización, y contadas usando un hemocitómetro. Se pusieron juntas las células de cada pocillo en las placas tras la tripsinización, y se contaron, los resultados fueron los siguientes.

POCILLO #	CONTROL (CÉLULAS)	ACONDICIONADAS (CÉLULAS)
1	7×10^5	3×10^5
2	8×10^5	$2,5 \times 10^5$
3	7×10^5	$3,4 \times 10^5$

ES 2 290 390 T3

Estos resultados muestran que las células, cuando estaban restringidas en, por ejemplo, las perlas de la invención, produjeron algún factor que resultó en la supresión de la proliferación de células tumorales. Este factor de restricción inhibidor se produce por las células en vista de su atrapamiento en la trampa de las perlas, y difiere de otros materiales como el factor de contacto inhibidor, que se produce cuando las células entran en contacto una con otras.

Ejemplo 10

El experimento expuesto anteriormente mostraba que el crecimiento de células RENCA, en un medio acondicionado, era aproximadamente la mitad del crecimiento de las células en medio de control. Los experimentos expuestos en la presente memoria examinaron si el factor que inhibe el crecimiento permanecería activo después de que el medio acondicionado fuera congelado.

El medio RENCA acondicionado se preparó incubando 10 perlas inmunoaisladas que contenían RENCA, durante cinco días. La incubación se realizó en placas Petri de 35 x 100 mm, con 50 ml de medio completo RPMI, a 37°C. Tras la incubación, se recogió el medio y se almacenó a -20°C. El medio acondicionado se preparó incubando perlas inmunoaisladas que contenían células MMT (tumor mamario de ratón). Las perlas contenían 240.000 células por perla; por lo demás todas las condiciones fueron las mismas.

El medio congelado fue descongelado a 37°C, y después usado en las pruebas siguientes. Se usaron tres placas de seis pocillos para cada tratamiento, es decir, (1) medio de control RPMI, (2) medio RENCA acondicionado congelado, y (3) medio MMT acondicionado congelado. Se dispensaron un total de 4 ml de medio en cada pocillo. Se inocularon entonces todos los pocillos con 10.000 células RENCA, y se incubaron a 37°C durante cinco días. Tras la incubación, se tomaron dos placas de muestras a partir de cada pocillo, se tripsinizaron, se juntaron, y se contaron en un hemocitómetro. A los ocho días, se analizaron de la misma forma el resto de las tres placas de cada pocillo.

Los resultados fueron los siguientes:

PLACA DE 5 DÍAS DE ANTIGÜEDAD	MEDIO DE CONTROL	MEDIO DE RENCA ACONDICIONADO CONGELADO	MEDIO DE MMT ACONDICIONADO CONGELADO
1	6×10^5	$\times 10^5$	8×10^4
2	$6,8 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$
8 DÍAS DE ANTIGÜEDAD			
3	$2,8 \times 10^6$	2×10^6	8×10^4

Cuando se comparan estos resultados con los del ejemplo 6, mencionado anteriormente, parecerá que, mientras que el medio RENCA acondicionado congelado/descongelado no detuvo el crecimiento en la misma extensión que lo hizo en medio no congelado (compárense los ejemplos 6 y 7), sin embargo, sí detuvo el crecimiento. El medio acondicionado congelado que usa células MMT detuvo el crecimiento incluso más que el medio MMT acondicionado no congelado. Estos resultados muestran que, de dieciocho ratones analizados, trece no mostraban enfermedad. De los ratones del grupo (A), un ratón mostraba unos pocos nódulos, y otro ratón mostraba unos pocos tumores.

Lo anterior describe la fabricación de perlas implantables que contienen uno o más tipos de células que producen un producto biológico difundible, como se define esta frase en la presente memoria. El producto biológico difundible es uno que tiene un efecto en el individuo en el que se implanta la perla. Este efecto es, preferentemente, de inmunomodulación, como estimular una respuesta inmunitaria, o suprimir una respuesta. En el caso del cáncer, por ejemplo, el producto biológico difundible puede ser un péptido que se compleje con las moléculas MHC en las células cancerosas en un individuo, provocando, de este modo, una respuesta CTL a ello, conduciendo sucesivamente a una reducción en la carga tumoral en el individuo. El producto difundible puede ser, también, un supresor del crecimiento tumoral. En relación con esta forma de terapia, es posible, aunque no necesariamente preferible, situar las perlas implantadas en o cerca de un tumor identificado.

“Producto biológico difundible” como se usa en la presente memoria se refiere a materiales como proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, hidratos de carbono, lípidos, glicolípidos, y péptidos. Más específicamente, materiales como anticuerpos, citoquinas, hormonas, enzimas, y así sucesivamente, son ejemplos, pero de ninguna manera son el único tipo de materiales incluido. Excluidos están los muy conocidos “productos finales” de los procesos celulares, como CO_2 y H_2O .

Como muestra el experimento, las perlas implantables pueden usarse también de forma profiláctica. Es bien sabido que al menos un segmento de la población de pacientes con cáncer es propensa a la reaparición de la enfermedad. Los experimentos descritos en la presente memoria muestran que los implantes pueden prevenir la aparición o reaparición de cáncer, vía el efecto biológico que el producto difundible tiene en el sistema de un individuo.

La discusión de la invención está enfocada a planteamientos *in vivo*. También debe entenderse que hay aproximaciones *in vitro* a la invención, alguno de los cuales se tratan en la presente memoria. Por ejemplo, es bien sabido que muchas células que producen productos deseables, cuando se cultivan *in vitro*, requieren la presencia de células alimentadoras. Siempre hay asuntos con tales células alimentadoras. Pueden crecer más rápido que las células deseadas, conduciendo a una “estrangulamiento” *de facto* de los materiales de interés. Además, puede haber un problema con varios productos tóxicos que son producidos por las capas alimentadoras. Las perlas implantables de la invención actúan casi como incubadores celulares, protegiendo las células incorporadas, mientras permiten que los productos difundibles se muevan en un medio de cultivo, por ejemplo, en los que pueden ser recogidos.

Como se ha indicado anteriormente, la preparación de las perlas implantables requiere primero la suspensión de las células en solución, preferentemente acuosa de colágeno. El colágeno es, preferentemente, atelocolágeno, en una solución de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2%. Dependiendo del tipo de célula usado, el número de células en la solución a un tiempo dado, y, por lo tanto, el número de células en una perla, variará. Se usan, preferentemente, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000 células por perla, más preferentemente de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 100.000. Lo más preferentemente, se usan de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 60.000 células.

Tras la suspensión de las células en la solución de colágeno, se añade una solución de agarosa. Esta solución de agarosa estará, preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, preferentemente, aproximadamente 1%. Haciendo gotear la mezcla en o sobre materiales inertes, como Teflón® o aceite mineral, se forma una perla. Esta perla es semisólida. La perla semisólida se transfiere entonces a un medio estéril, preferentemente uno que contenga antibióticos, se lava y se incuba para polimerizar el colágeno. La polimerización del colágeno es un fenómeno muy estudiado, y las condiciones en las que ocurre no necesitan ser elaboradas en la presente memoria.

Tras la solidificación de la perla, se recubre entonces con agarosa, preferentemente haciéndola rodar en una solución de agarosa. Una forma preferida de llevar a cabo esto es una simple cuchara recubierta de Teflón® que contiene una solución de agarosa, preferentemente al 5% o al 10%.

La discusión anterior de productos biológicos difundibles no debe ser interpretada como estar limitada a los materiales naturales. Por ejemplo, se puede incorporar fácilmente células anfitrionas transformadas o transinfectadas, como células eucariotas (por ejemplo, células 293, células CHO, células COS), o incluso células procariotas (por ejemplo, *E. Coli*), que han sido tratadas para producir proteína heterogénea, o modificada, vía, por ejemplo, recombinación homóloga, para producir cantidades aumentadas de productos biológicos deseables. Se pueden usar también otros materiales, como los hibridomas, siendo el producto biológico difundible un anticuerpo monoclonal.

Otras características y aspectos de la invención estarán claros para el experto en la técnica, y no necesitan ser expuestos aquí.

REIVINDICACIONES

1. Una perla que contiene agarosa, recubierta de agarosa, que contiene células cancerosas que producen un material que suprime la proliferación.
2. La perla según la reivindicación 1, en la que dicha célula es una célula cancerosa renal o una célula cancerosa de mama.
3. La perla según la reivindicación 1 ó 2, que comprende preferiblemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000 células, más preferiblemente, de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 100.000 células, lo más preferiblemente de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 60.000 células.
4. Método para producir una perla que contiene agarosa, recubierta de agarosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
 - (a) suspender células que producen un material que suprime la proliferación en una disolución de agarosa;
 - (b) formar una perla semisólida lisa a partir de dichas células suspendidas de la etapa (a);
 - (c) incubar dicha perla semisólida de la etapa (b) mientras se forma una perla sólida;
 - (d) recubrir dicha perla sólida de la etapa (c) con agarosa para obtener una perla que contiene agarosa, recubierta de agarosa.
5. Método de la reivindicación 4, en el que la etapa (a) comprende añadir una disolución al 1% de agarosa de baja viscosidad a las células y/o la etapa (d) comprende aplastar dicha perla sólida de la etapa (c) en agarosa al 5%, y/o poner en contacto dicha perla sólida aplastada con aceite mineral, y/o lavar dicha perla aplastada para obtener dicha perla que contiene agarosa, recubierta de agarosa.
6. Método de la reivindicación 4 ó 5, en el que dicha célula es una célula cancerosa renal o una célula cancerosa de mama.
7. Uso de una perla que contiene agarosa, recubierta de agarosa, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medicamento para suprimir la proliferación de células en un sujeto que lo necesite.
8. Uso de las perlas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la producción de un producto biológico difusible.
9. Uso de la reivindicación 8, en el que se emplea una cantidad terapéuticamente eficaz del producto para la preparación de un medicamento para suprimir la proliferación de células en un sujeto que lo necesite.
10. Método para producir un medio acondicionado que comprende
 - incubar al menos una perla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el medio, donde un material se difunde a través de dicha perla hacia el medio,
 - bajo condiciones apropiadas, y
 - recoger el medio con los medios apropiados.
11. Uso de las perlas de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la producción de un medio acondicionado.
12. El uso de la reivindicación 11, en el que las células son células cancerosas renales o células cancerosas de mama.
13. El uso de la reivindicación 11 ó 12, en el que las células son de ratón o humanas.
14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la perla contiene de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000 células y, preferiblemente, de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 100.000 células, lo más preferiblemente de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 60.000 células.
15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que las perlas se incuban en medio completo RPMI durante cinco días.
16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el medio acondicionado está congelado.

ES 2 290 390 T3

17. El uso de las reivindicaciones 11 a 16, en el que el medio acondicionado contiene material que puede suprimir la proliferación de células.

18. El uso de la reivindicación 17, en el que el material es una proteína, glicoproteína, lipoproteína, carbohidrato, lípido, glicolípido, péptido, anticuerpo, citoquina, hormona o enzima.

19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en el que el medio acondicionado o el material es para la preparación de un medicamento para estimular, o suprimir una respuesta inmune, o para el tratamiento de una afección patológica que se **caracteriza** por un crecimiento celular anormal en un sujeto.

20. Uso según la reivindicación 19, en el que la afección patológica es cáncer.

21. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en el que el medio acondicionado o el material es para aplicaciones *in vitro* tales como investigación, ensayo y diagnóstico.

22. Uso según la reivindicación 19 ó 20, en el que dichas células restringidas o atrapadas son del mismo tipo asociado a la afección con la que está afectado dicho sujeto, o de un tipo distinto del tipo de célula asociado con la afección con la que está afectado dicho sujeto.

23. Uso según la reivindicación 19 ó 20, en el que dichas células restringidas o atrapadas se toman del sujeto al que se administra dicha composición de materia.

24. Un método para determinar si una composición de materia es útil para suprimir la proliferación de células cancerosas, que comprende:

(a) añadir una muestra de células cancerosas no atrapadas a un medio de cultivo, donde dicho medio de cultivo se ha usado para cultivar una composición de materia que comprende una muestra de células cancerosas atrapadas en una perla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

cultivar dicha muestra de células cancerosas no atrapadas en dicho medio de cultivo durante un período de tiempo definido y

comparar la proliferación de dichas células cancerosas no atrapadas con una muestra de dichas células cancerosas no atrapadas en el mismo medio de cultivo, donde dicho medio de cultivo no se ha usado para cultivar dicha composición de materia,

donde una disminución de la proliferación indica que dicha composición de materia es útil para suprimir la proliferación de dichas células cancerosas no atrapadas, o

(b) mezclar una muestra de células cancerosas no atrapadas, medio de cultivo y una composición de materia que comprende una muestra de células cancerosas atrapadas en una perla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para formar una primera mezcla,

cultivar dicha mezcla durante un período de tiempo definido, y comparar la proliferación de dichas células cancerosas no atrapadas con una segunda mezcla de dicho medio de cultivo y dichas células cancerosas no atrapadas, en ausencia de dicha composición de materia, cultivadas durante el mismo período de tiempo, donde una disminución en la proliferación en dicha primera mezcla indica que dicha composición de materia es útil suprimiendo la proliferación de dichas células cancerosas no atrapadas.

25. El método de la reivindicación 24, en el que dichas células cancerosas atrapadas son células cancerosas de mama o células cancerosas renales.

26. El método de la reivindicación 24, en el que dichas células cancerosas atrapadas y/o no atrapadas son células cancerosas humanas, o células cancerosas de ratón.

27. El método de la reivindicación 24, en el que dicha composición de materia contiene preferiblemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000 células, más preferiblemente de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 100.000 células, lo más preferiblemente de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 60.000 células.

28. El método de la reivindicación 24, en el que dichas células cancerosas atrapadas son del mismo tipo o son de tipo distinto a las células cancerosas no atrapadas.