



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 337 320**

(51) Int. Cl.:

A61L 33/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99933792 .6**

(96) Fecha de presentación : **09.07.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1096962**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2001**

(54) Título: **Método para oscurecer el reconocimiento inmune.**

(30) Prioridad: **10.07.1998 US 113437**
01.07.1999 US 346212

(73) Titular/es: **ENCELLE, Inc.**
1800 N. Greene Street
Greenville, North Carolina 27858, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.04.2010

(72) Inventor/es: **Usala, Anton-Lewis y**
Klann, Richard, Chris

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.04.2010

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 337 320 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para oscurecer el reconocimiento inmune.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está dirigida a una matriz de hidrogel para la utilización en el oscurecimiento del reconocimiento inmune en un mamífero. Más particularmente, la presente invención está dirigida a una matriz de hidrogel para su uso en el encapsulamiento de un tejido.

10 **Antecedentes de la invención**

El cuerpo se defiende así mismo de los agentes infecciosos a través de una respuesta inmune. Hablando en sentido amplio, el cuerpo tiene muchas capas de defensas, incluyendo barreras físicas tales como la piel, sustancias químicas protectoras, los fluidos sanguíneo y de los tejidos y las reacciones fisiológicas de los tejidos a las heridas o infecciones. 15 La estrategia de defensa más efectiva, sin embargo, es llevada a cabo por células que han desarrollado habilidades especializadas para reconocer y eliminar sustancias potencialmente nocivas.

La respuesta de un cuerpo a una infección ocurre en la forma de inflamación. Una respuesta inflamatoria involucra el paso de fluidos, proteínas, células de la sangre a áreas y tejidos focales. El resultado es la liberación local de agentes que pueden combatir efectivamente las infecciones. El proceso involucra a células inflamatorias, productos de células inflamatorias, proteínas sanguíneas, y caminos de respuesta. La iniciación de una respuesta inflamatoria comienza por un incremento en el flujo de sangre a los tejidos infectados y por la separación de células que recubren los vasos o capilares sanguíneos, seguida por la emigración de células hacia el tejido involucrado.

25 La respuesta inmune involucra tanto respuestas inmunes humorales como celulares. Ambas respuestas son componentes esenciales de la defensa contra las bacterias, virus, parásitos y otros objetos extraños patogénicos. La inmunidad celular es mediada por una clase de células de glóbulos blancos llamadas linfocitos. Estas células se originan a partir de células madre en la médula ósea y migran hacia la glándula del timo. Mientras que están en el timo, sufren diferenciación antes de migrar hacia los órganos linfoides periféricos. Las células procesadas en el timo son denominadas linfocitos T o células T. las células T pueden destruir células infectadas por diversos tipos de virus o bacterias intracelulares. La inmunidad humoral, o la respuesta humoral, es mediada por anticuerpos. Los anticuerpos son moléculas de proteínas sintetizadas por otra clase de linfocitos llamados células B. Las células B también se originan a partir de células madre en la médula ósea, pero no entran al timo. Las células B se encuentran en todo los órganos linfoides periféricos, y los anticuerpos que ellas secretan son encontrados a través de todo el cuerpo. La respuesta inmune es una secuencia compleja intrincadamente regulada de eventos que involucran estos tipos de células. Se disparan cuando un antígeno, o un objeto extraño, entre al cuerpo.

40 Entre los principales obstáculos en la investigación dirigidos al trasplante de isletas pancreáticas para el tratamiento de la diabetes está una incapacidad para producir una aceptación permisiva de los trasplantes de tejidos xenoinjertados en el mamífero huésped. Los métodos actuales de trasplante deben suprimir la respuesta inmune por parte del mamífero huésped que pueda llevar al rechazo de las células transplantadas y a la pérdida de la función de las isletas. Muchas modalidades de trasplante requieren que el huésped consuma agentes inmunosupresores generales para evitar que una respuesta inmune del huésped destruya el tejido transplantado. Sin embargo, tales agentes inmunosupresores son 45 deseables porque reducen la respuesta inmune del huésped en general, y así pueden llevar a una salud pobre. Así, hay una necesidad en la técnica para un método simple no invasivo para introducir un trasplante en un huésped sin requerir agentes inmunosupresores generales.

50 La WO 97/20569 divulga un dispositivo implantable para la liberación efectiva de entidades terapéuticamente deseables que incluyen hormonas, donde una matriz que contiene una unidad estructural celular que produce una entidad terapéuticamente deseable es encapsulada con un material polimérico no inmunogénico de poliparaxilíleno u otra unidad estructural basada en estructuras aromáticas que tiene una porción membrana con una porosidad efectiva para bloquear el paso a través de la misma de agentes inmunogénicos a la vez que permite el paso a través de la misma de nutrientes de dicha unidad estructural celular y de la entidad producida por la misma.

55 La EP-A-0564786 divulga un método para procesar y preservar una matriz de tejido con base en colágeno no celular para trasplantes.

Resumen de la invención

60 La presente invención proporciona una matriz de hidrogel que comprende gelatina, dextrano y una cantidad efectiva de aminoácidos polares para su uso en el oscurecimiento de proteínas de la superficie celular de un trasplante encapsulado en la matriz frente a anticuerpos de alta afinidad de un huésped mamífero para inducir una aceptación permisiva del trasplante por parte del mamífero huésped. El reconocimiento inmune de un trasplante es oscurecido 65 encapsulando el tejido del trasplante dentro de una matriz de hidrogel que comprende aminoácidos altamente polares y fragmentos de gelatina, tales como fragmentos de colágeno desnaturalizado, que tienen grupos polares expuestos. Los grupos polares expuestos de los fragmentos de colágeno y los aminoácidos polares posibilitan que la matriz se enlace a las proteínas de la superficie celular, oscureciendo por lo tanto las proteínas de la superficie celular, particularmente

de anticuerpos específicos de alta afinidad del organismo huésped. Puesto que los anticuerpos de alta afinidad son incapaces de reconocer la estructura proteínica del tejido extraño, los anticuerpos son incapaces de estimular la respuesta inmune y destruir el trasplante. La presente invención es aún efectiva en el oscurecimiento del reconocimiento inmune de trasplantes xenoinjertados, tal como se alcanza la aceptación permisiva del trasplante xenográfico por parte del organismo huésped.

En particular, el método aquí descrito incluye proveer tejido para su uso adecuado en un trasplante, donde el tejido comprende células que contienen proteínas en la superficie celular. El tejido es encapsulado en la matriz de hidrogel para formar un trasplante, donde la matriz se enlaza a las proteínas de la superficie celular del tejido encapsulado.

10 Despues de esto, el trasplante así formado puede ser implantado en un sitio de trasplante en un mamífero. Por ejemplo, el trasplante puede ser implantado intramuscularmente, subcutáneamente, dentro de órganos, intravascularmente, o en la cavidad peritoneal.

En algunas realizaciones, el sitio del trasplante puede ser preparado antes de la implantación del trasplante antes descrito aplicando un medio regulador al sitio del trasplante, donde el medio regulador comprende al menos un inhibidor de óxido nítrico, tal como L-cisteína y aminoguanidina. Por ejemplo, la etapa de aplicación puede comprender inyectar aproximadamente 10 hasta aproximadamente 300 cc del medio regulador en el sitio del trasplante antes de la implantación. Periódicamente, después de la implantación del trasplante, pueden hacerse aplicaciones adicionales del medio regulador al sitio del trasplante.

20 Breve descripción de los dibujos

Habiendo así descrito la invención en términos generales, se hará referencia ahora a los dibujos acompañantes, donde:

25 La figura 1 es una gráfica de barras que ilustra los niveles de glucosa en ayuno y la dosis total de insulina para un perro después de una inyección intraperitoneal de un tejido pancreático porcino;

30 La figura 2 es una gráfica de barras que ilustra los niveles de glucosa en ayuno y una dosis total de insulina para un perro después de la inyección intramuscular de un tejido pancreático porcino; y

La figura 3 es una gráfica de barras que muestra la relación entre los niveles de glucosa en la sangre de dos perros.

Descripción detallada de la invención

35 La invención comprende una matriz de hidrogel útil para hacer y utilizar trasplantes. Se describen composiciones y métodos para mantener la viabilidad y la función celular dentro de un trasplante por largos períodos de tiempo. Específicamente, la invención proporciona una matriz de hidrogel para su uso en el oscurecimiento del reconocimiento inmune de un trasplante e inducir la aceptación permisiva del trasplante por un mamífero huésped. La invención presente puede ser utilizada en la administración de trasplantes a cualquier mamífero que así lo requiera. Los mamíferos de interés incluyen humanos, perro, vacas, cerdos, gatos, ovejas, caballos y similares, preferiblemente humanos.

40 Por trasplante, se entienden células, tejidos u otros dispositivos vivos o no vivos para el trasplante en un mamífero. Los trasplantes de la invención incluyen xenoinjertos, halo-injertos, órganos artificiales, trasplante celular y otras aplicaciones para implantaciones productoras de hormonas o productoras de tejidos en individuos deficientes, que sufren de colisiones, tales como diabetes, deficiencia de tiroides, deficiencia en la hormona de crecimiento, hiperplasia adrenal congénita, enfermedad de Parkinson y similares. De la misma forma, la matriz de la presente invención es útil para trasplantes que involucran condiciones terapéuticas que se benefician de sistemas de liberación implantables para productos biológicamente activos y de terapia genética para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y otros desordenes crónicos. Más específicamente, el método como se describe encontrará aplicación en las diversas terapias de trasplante, incluyendo sin limitación células secretoras de insulina para el tratamiento de diabetes, células secretoras de factores de crecimiento de los nervios humanos para prevenir la pérdida de neuronas colinérgicas degenerativas, células satélite para la regeneración del miocardio, tejido cerebral estriatal para la enfermedad de Huntington, células de hígado, células de la médula ósea, tejido cerebral rico en dopamina y células para la enfermedad de Parkinson, sistema nervioso central rico en colinérgicos para la enfermedad de Alzheimer, células de cromafina adrenales para liberar analgésicos al sistema nervioso central, epitelio cultivado para injertos de piel, y células que liberan el factor nuerotrófico ciliar para la esclerosis lateral amiotrópica y similares. Ejemplos de células que pueden ser adecuada para su inclusión en un trasplante incluyen células derivadas de una variedad de tejidos tales como pulmón, hígado, riñones, timo, tiroides, corazón, cerebro, páncreas (incluyendo células acinares y células isletas) y similares, así como diversas poblaciones de células cultivadas.

45 En la presente invención, el reconocimiento inmune del trasplante por el mamífero huésped es oscurecido encapsulando el trasplante dentro de una matriz de hidrogel. La matriz de hidrogel incluye un componente de gelatina que tiene grupos polares expuestos. Por ejemplo, los grupos polares expuestos pueden ser grupos amina y carbonilo. El componente de gelatina proporciona andamios para la conexión celular. El componente de gelatina preferido es colágeno desnaturalizado. El colágeno desnaturalizado contiene aminoácidos polares y no polares que rápidamente forman un gel basado en interacciones con amina, grupo caiboxilo, grupo hidroxilo y grupo sulfhídrido.

La gelatina está presente en una concentración de aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 40 mM, preferiblemente aproximadamente de 0.05 hasta aproximadamente 30 mM, lo más preferiblemente aproximadamente de 1 a 5 mM. De manera ventajosa, la concentración de gelatina es aproximadamente 1.6 mM. Las concentraciones anteriores proporcionan una fase sólida a temperatura de almacenamiento y una fase líquida a temperatura de trasplante. Con el fin de incrementar el enlazamiento celular, el colágeno intacto puede ser añadido en pequeñas cantidades para proveer una red de enlace adicional para las células contenidas en la matriz. La concentración final del colágeno intacto es de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 5 mM, preferiblemente de 0 a aproximadamente 2 mM, de manera más preferible aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5 mM en una realización, la concentración del colágeno intacto es aproximadamente 0.11 mM.

10 El componente de gelatina de la matriz de la presente invención se mezcla con una composición líquida. La composición líquida se basa preferiblemente en un medio de cultivo estándar, tal como Medium 199, complementado con aditivos tal como se describe más abajo.

15 El dextrano se polimeriza de manera suelta alrededor del componente de gelatina y facilita la unión a la célula evitando el movimiento del andamiaje provisto por la gelatina. Para los trasplantes que contienen tejido, esto permite que las células dentro del tejido de un trasplante se unan finamente a la matriz. El dextrano está presente en una concentración de aproximadamente 0 a aproximadamente 2 mM, de manera preferiblemente de 0 a aproximadamente 1 mM, de manera lo más preferible de aproximadamente 0 a aproximadamente 0.1 mM. En una realización, el dextrano está presente en una concentración de aproximadamente 0.86 mM.

20 La matriz también incluye una cantidad efectiva de aminoácidos polares, tales como arginina, lisina, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico, los cuales adicionalmente potencian la bioadhesividad de la matriz. Una cantidad efectiva es la cantidad necesaria para incrementar la rigidez de la matriz y permitir la inyección directa de la matriz con el trasplante encapsulado en la misma en un mamífero huésped sin la necesidad de una inmunosupresión adicional. En una realización, la concentración de aminoácidos polares es aproximadamente 3 a aproximadamente 150 mM, de forma preferible aproximadamente 10 a aproximadamente 65 mM, y de manera más preferible aproximadamente 15 a aproximadamente 40 mM.

30 De manera ventajosa, los aminoácidos polares añadidos comprenden ácido L-glutámico, L-lisina y L-arginina. La concentración final del ácido L-glutámico es aproximadamente 2 a aproximadamente 60 mM, de forma preferible aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mM, de la manera más preferible aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM. En una realización, la concentración de ácido L-glutámico es aproximadamente 15 mM. La concentración final de L-lisina es aproximadamente de 0.5 a aproximadamente 30 mM, de manera preferible de aproximadamente 1 hasta 15 mM, de la manera más preferible aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM. En una realización la concentración de L-lisina es aproximadamente 5.0 mM. La concentración final de L-arginina es aproximadamente 1 hasta aproximadamente 40 mM, de manera preferible aproximadamente 1 hasta aproximadamente 30, de la manera más preferible aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 mM. En una realización, la concentración final de arginina es aproximadamente 10 mM.

40 Adicionalmente, la matriz contienen preferiblemente al menos un inhibidor de óxido nítrico. El inhibidor de óxido nítrico es definido ampliamente de manera que incluya cualquier composición o agente que inhiba la producción de óxido nítrico o consuma o retire el óxido nítrico existente. El óxido nítrico es un mediador pleitrópico de la inflamación. El óxido nítrico es un gas soluble producido por las células endoteliales, macrófagos y neuronas específicas en el cerebro, y es activo en la inducción de una respuesta inflamatoria. El óxido nítrico y sus metabolitos son conocidos por causar la muerte celular por destrucción nuclear y lesiones relacionadas. Los inhibidores preferidos de óxido nítrico incluyen L-cisteína, análogos de L-arginina, cistina y heparina.

50 Preferiblemente, la matriz contiene L-cisteína. La L-cisteína actúa como un consumidor de óxido nítrico y oscurece los sitios de reconocimiento inmunes sobre la superficie de las células. La L-cisteína también proporciona uniones disulfuro, las que incrementan la resistencia de la matriz a las fuerzas y protege adicionalmente las células contenidas en ellas. La concentración final de L-cisteína esta aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 μ M, de manera preferible aproximadamente 10 a aproximadamente 100 μ M, de manera lo más preferible y aproximadamente 15 a aproximadamente 25 μ M. En una realización, la concentración final es aproximadamente 20 μ M.

55 Aventajosamente, la aminoguanidina también se añade a la matriz de la presente invención. Como se indicó más arriba, la aminoguanidina es un análogo de la L-arginina y actúa como un inhibidor de óxido nítrico. Otros análogos de la L-arginina también podrían ser utilizados en la presente invención. La concentración final de aminoguanidina es aproximadamente 5 a aproximadamente 500 μ M, de manera preferible aproximadamente 10 a aproximadamente 100 μ M, de la manera más preferible aproximadamente 15 a aproximadamente 25 μ M. En una realización, la concentración final es aproximadamente 20 μ M.

60 Adicionalmente, la matriz de la presente invención puede incluir un inhibidor de superóxido. Un inhibidor de superóxido preferido es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El superóxido es una especie con oxígeno reactiva altamente tóxica, cuya formación es catalizada por metales de transición divalentes, tales como hierro, manganeso, cobalto, y a veces calcio. Especies con oxígeno altamente reactivas tales como el superóxido (O_2^-) pueden ser convertidas adicionalmente al radical hidroxilo altamente tóxico (OH^-) en la presencia de hierro. Al quelatar estos catalizadores metálicos, el EDTA sirve como antioxidante. El EDTA también es un quelatador de cationes divalentes,

ES 2 337 320 T3

lo que incrementa la rigidez de la matriz eliminando la inhibición del enlace -NH2 al hidrógeno del -COOH. El rango de concentración para el inhibidor de superóxido es aproximadamente 0 hasta aproximadamente 10 mM, de manera preferible de 1 a aproximadamente 8 mM, de la manera más preferible de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 mM. En una realización preferida, el inhibidor de superóxido está presente en una concentración de aproximadamente 5 4 mM.

10 Otros aditivos conocidos en la técnica pueden ser incluidos en la matriz. Por ejemplo, aunque el suero no es requerido, pueden añadirse albumina u otras fuentes de nutrientes. Si se utilizan, la albumina es preferiblemente derivada de la misma especie que las células que van a ser encapsuladas dentro de la matriz.

15 La Tabla 1 muestra los componentes particularmente preferidos de la matriz de la presente invención junto con concentraciones adecuadas así como concentraciones preferidas para cada componente.

TABLA 1

Componente	Rango de concentración	Concentración preferida
Ácido L-glutámico	2 a 60 mM	15 mM
L-lisina	.5 a 30 mM	5.0 mM
L-Arginina	1 a 40	10 mM
Gelatina	0.01 a 40 mM	1.6 mM
L-cisteína	5 a 500 µM	20 µM
Aminoguanidina	5 a 500 µM	20 µM
Colágeno intacto	0 a 5 mM	0.11 mM
EDTA	0 a 10 mM	4 mM
Albúmina	0 a 2% en volumen	0.05% en volumen
Dextrano	0 a 2 mM	0.086 mM

35 Aunque la presente invención no está limitada por ninguna teoría en particular, se cree que los grupos polares expuestos del componente de gelatina de la matriz, potenciados por la adición de aminoácidos altamente polares, permite que los fragmentos de gelatina, tales como fermentos de colágeno desnaturalizado, se aferren o enlacen a las proteínas de la superficie celular de las células de trasplante. Enlazándose a las proteínas de la superficie celular, la matriz previene que anticuerpos específicos de alta afinidad reconozcan la estructura proteínica específica del tejido 40 trasplantado y se enlacen al tejido. Esto evita la cascada de caminos citotóxicos que pueden llevar a la destrucción del tejido transplantado. En lugar de ello, se forman menos anticuerpos específicos de afinidad más baja los cuales no estimulan la misma cascada de caminos citotóxicos. Estos anticuerpos de afinidad más baja son aparentemente capaces de enlazarse al tejido transplantado; por lo tanto la protección adicional protegiendo las células dentro del trasplante de 45 una destrucción por anticuerpos de alta afinidad/alta mortandad.

45 La presente invención es capaz de proteger tejido autólogo, halogénico y xenogénico de la respuesta inmune de un mamífero huésped. Por autólogo se denominan los tejidos que se derivan del receptor de trasplante. Por halogénicos o haloinjertos se entienden tejidos que son derivados de la misma especie del receptor. Por xenogénicos y xenoinjertos se entienden tejidos que son derivados de una especie diferente a la del receptor. Utilizando los métodos aquí descritos, el tejido aislado de una especie puede ser implantado en un animal de una especie diferente sin provocar una respuesta inmune destructora y sin la necesidad de agentes inmunosupresores en general. Sin embargo, los métodos pueden ser utilizados en combinación con otros métodos o composiciones de supresión inmune conocidos en la técnica.

55 Por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos copendiente No.US 6,231,881, el tejido pancreático porcino, incluyendo tanto tejido de isletas como acinar, puede ser encapsulado en la matriz de hidrogel antes descrita e implantado en un mamífero diabético, proveyendo así producción de insulina *in vivo*. De la misma forma, otros tejidos que producen productos funcionales pueden ser utilizados en la presente invención para proveer una terapia de reemplazo para unidades estructurales específicas durante períodos extendidos de tiempo sin el uso de agentes inmunosupresores generales.

60 El trasplante encapsulado puede ser implantado utilizando cualquier método convencional conocido en la técnica. Por ejemplo, el tejido encapsulado puede ser colocado dentro de un dispositivo portador recubierto tal como el descrito en la patente de los Estados Unidos No. 5, 824,331, e implantado quirúrgicamente. Un dispositivo portador incluye cualquier dispositivo diseñado para contener y proteger el tejido transplantado en un organismo huésped. Ejemplos de otros dispositivos de trasplante adecuados para su uso con la matriz incluye los descritos en las patentes de los Estados Unidos No. 5,686,091, 5,676,943 y 5,550,050.

5 Sin embargo, la matriz puede ser utilizada como el único vehículo de trasplante sin utilizar tales dispositivos. De esta manera, el tejido puede ser encapsulado dentro de la matriz e implantado directamente en un mamífero huésped sin el uso de dispositivos portadores protectores adicionales. El tejido encapsulado dentro de la matriz puede ser implantado directamente por inyección o por cualquier otro medio adecuado conocido en la técnica.

10 El trasplante encapsulado es implantado en un sitio de trasplante predeterminado. Un sitio de trasplante es definido en sentido amplio como cualquier sitio dentro del mamífero huésped donde puede colocarse el trasplante, incluyendo intramuscularmente, de manera subcutánea, intraórganos, intravascularmente o en la cavidad peritoneal.

15 10 La cantidad de tejido encapsulado inyectada o administrada de alguna otra forma al huésped depende de numerosos factores, incluyendo el tamaño y peso del receptor, la naturaleza y tipo de tejido y similares. En una realización, para una inyección intramuscular, el tejido/matriz es inyectado directamente en un músculo con un volumen máximo de aproximadamente 0.75 ml/kg de peso corporal por sitio, hasta una carga corporal total de 10 ml/kg de peso corporal. En otra realización, para una inyección intraperitoneal, el receptor es anestesiado ligeramente, y se inyecta un catéter de calibre 14-18 en la cavidad peritoneal para administrar el tejido/matriz al receptor. Preferiblemente, la inyección intraperitoneal comprende de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 500 ml de trasplante de tejido/matriz.

20 20 En una realización, el sitio de trasplante es preparado aplicando una cantidad efectiva de la matriz antes descrita en el sitio antes de la implantación del trasplante. La matriz puede preparar el sitio contribuyendo a la vascularización del sitio de trasplante y a la inhibición del óxido nítrico. En una realización preferida, el sitio de trasplante es preparado para implante administrando, tal como por inyección, un medio regulador, donde el medio regulador comprende al menos un inhibidor de óxido nítrico. El medio regulador es una solución que contiene factores de crecimiento y nutrientes que se utilizan para soportar el crecimiento y desarrollo de las células. El medio regulador preferiblemente comprende un medio de cultivo estándar complementado con un agente regulador, solución salina y otros aditivos, incluyendo un inhibidor de óxido nítrico. El medio de cultivo estándar preferido es MEDIUM 199 1x líquido. Sin embargo, otros medios de cultivo estándar conocidos en la técnica serían adecuados para su uso con la presente invención. Los medios de cultivo estándar que pueden ser empleados de acuerdo con la presente invención son medios de cultivo estándar para células en crecimiento que proporcionan típicamente una fuente de energía, tal como glucosa, sustancialmente todos los aminoácidos esenciales y no esenciales y vitaminas y/o otros compuestos orgánicos que 25 30 35 soportan el crecimiento celular requerido en bajas concentraciones. Cuando se combina con un agente regulador y una solución salina, el medio de cultivo estándar proporciona muchos de los nutrientes requeridos para el funcionamiento metabólico normal de las células cultivadas. La solución salina preferida es sales balanceadas de Earle. La solución salina ayuda a mantener el pH y la presión osmótica y también proporciona una fuente de energía. El agente regulador preferido es Hepes. Otras soluciones salinas y agentes reguladores conocidos en la técnica pueden ser utilizados sin apartarse de la presente invención.

40 Los inhibidores adecuados de óxido nítrico para el medio regulador incluyen L-cisteína, análogos de L-arginina, cistina, y heparina. La aminoguanidina es el análogo de L-arginina preferido. Otros análogos de L-arginina tales como N-monometil L-arginina, N-nitro-L-arginina o D-arginina también podrían utilizarse en la presente invención. En una realización preferida la aminoguanidina se proporciona en una concentración de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 250 μ M, de manera preferible aproximadamente 30 a 180 μ M, de la manera más preferible aproximadamente 80 a aproximadamente 120 μ M. En una realización la concentración de aminoguanidina es aproximadamente 100 μ M.

45 45 El medio regulador también incluye preferiblemente L-cisteína. La L-cisteína actúa como un consumidor del óxido nítrico ya formado y por lo tanto evita el daño celular inducido por el óxido nítrico. Adicionalmente, la L-cisteína puede oscurecer los sitios de reconocimiento inmune de las células cultivadas por la formación de puentes sulfhidrilo a las proteínas de la superficie integral que contienen grupos sulfuro. Adicionalmente, la L-cisteína proporciona enlaces sulfhidrilo que fortalecen las membranas celulares. La concentración final preferida de L-cisteína es aproximadamente 50 a aproximadamente 300 μ M, de manera preferible aproximadamente 80 a aproximadamente 250 μ M, de la manera más preferible aproximadamente 150 hasta aproximadamente 200 μ M. En una realización, la concentración final es aproximadamente 180 μ M.

55 55 El medio regulador también puede incluir una cantidad efectiva de aminoácidos polares. Los aminoácidos polares preferidos son seleccionados del grupo que consiste de arginina, lisina, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico, aunque pueden utilizarse otras sustancias químicas que contienen grupos amina y carboxilo polares. Una cantidad efectiva es la cantidad necesaria para fortalecer las membranas celulares, y enlazarse a los sitios de reconocimiento inmune de la superficie celular. En una realización, la concentración de aminoácidos polares se eleva hasta una concentración final de entre aproximadamente 5 hasta aproximadamente 150 mM, preferiblemente aproximadamente 10 a aproximadamente 65 mM, y de la manera más preferible aproximadamente 15 a aproximadamente 40 mM. De 60 65 manera ventajosa, las cantidades suplementarias de L-arginina y ácido L-glutámico son añadidas al medio regulador. Preferiblemente, la concentración final de L-arginina es aproximadamente 2 a aproximadamente 60 mM, de manera preferible aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mM, de la manera más preferible aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mM. La concentración final de ácido L-glutámico es aproximadamente 2 a aproximadamente 60 mM, de manera preferible aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mM, de la manera más preferible aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM. En una realización, la concentración final de L-arginina es aproximadamente 10 mM y la concentración final de ácido L-glutámico es aproximadamente 15 mM.

ES 2 337 320 T3

Adicionalmente, el medio regulador puede incluir un inhibidor de superóxido. Un inhibidor de superóxido preferido es el ácido etilendiaminotetraácetico (EDTA). El rango de concentración para el inhibidor de superóxido es aproximadamente 0 hasta aproximadamente 10 mM, de manera preferible de 1 a aproximadamente 8 mM, de la manera más preferible aproximadamente 2 a aproximadamente 6 mM. En una realización preferida, el inhibidor de superóxido está presente en una concentración de aproximadamente 4 mM.

Otros aditivos conocidos en la técnica, tales como antibióticos, pueden ser añadidos al medio regulador sin apartarse de la presente invención.

10 La Tabla 2 más abajo muestra los aditivos e ingredientes supplementarios particularmente preferidos para el medio regulador de la presente invención y resume los rangos de concentración final y concentraciones finales preferidas para cada ingrediente.

15 TABLA 2

Componentes	Rango de concentración	Concentración preferida
Albúmina	5 - 50 μ l/ml	20 μ l/ml
L-Cisteína HCL	50 - 300 μ M	180 μ M
Aminoguanidina	15 - 250 μ M	100 μ M
Coli-Micina	5 - 20 μ g/ml	10 μ g/ml
Anfotericina B	2 - 6 μ M	3.382 μ M
Ciprofloxacina	2 - 6 μ g/ml	5 μ g/ml
Sulfato de gentamicina	2 - 6 μ g/ml	4.8 μ g/ml
L-Glutamina	5 - 15 μ M	10 μ M
Ácido L-Glutámico	2 - 60 mM	15 mM
L-Arginina HCL	2 - 60 mM	10 mM

35 El medio regulador se administra preferiblemente en una cantidad que varías de aproximadamente 10 cc hasta aproximadamente 300 cc. Por ejemplo, el sitio de trasplante puede ser preparado inyectando aproximadamente 120 cc del medio regulador antes de implantar el trasplante. Después de la implantación, puede administrarse una cantidad adicional del medio regulador al sitio de trasplante. Por ejemplo, el implante puede ser seguido por otra inyección de aproximadamente 120 cc del medio regulador. Inyecciones adicionales de aproximadamente 120 cc del regulador pueden hacerse diariamente durante los siguientes 1 a 7 días. Los inhibidores de óxido nítrico dentro del medio regulador inhiben la atracción y activación de las células inmunes en el área del implante, ayudando de esta forma adicionalmente al proceso de aceptación permisiva del tejido trasplantado.

45 Los siguientes ejemplos se ofrecen a manera de ilustración y no a manera de limitación.

Parte experimental

Preparación de la matriz

50 Se colocan 835 ml de Medium 199 en un matraz. Con agitación, se calienta la solución a 50°C. Utilizando una jeringa se añaden 20 ml de albumina a la solución agitada. Con pipeta se añaden 63.28 μ l de L-cisteína, 1 ml de L-glutamina y 200 μ l de aminoguanidina en el matraz con agitación. Se añaden los siguientes materiales secos irradiados con rayos gamma: 120 gramos de colágeno desnaturizado, 50 gramos de dextrano y 0.1 gramos de colágeno intacto.

55 Se utiliza una varilla agitadora de vidrio para ayudar a la mezcla de los materiales secos en la solución. Se añaden mediante pipeta 8 ml de EDTA en la solución. Se añade mediante pipeta 5 ml de ácido L-glutámico, 5 ml de acetato L-lisina y 5 ml de L- arginina HCl en el matraz con agitación. Nótese que la solución se torna amarilla. Se usa NaOH al 10% para ajustar el pH de la solución matriz a un pH final de 7.40 \pm 0.05.

60 Las células pueden ser embebidas en la matriz de la presente invención utilizando el siguiente procedimiento. Se aspira el sobrenadante de las pellas de células centrifugadas. Se añade un volumen de medio de cultivo celular y matriz a las pellas de células. Se añade un volumen de matriz aproximadamente igual a 4 veces el volumen de las pellas. Se añade un volumen de medio de cultivo celular a las pellas celulares igualando aproximadamente 0.05 veces el volumen de matriz añadido. Se almacenan las células encapsuladas a temperaturas refrigeradas si no se van a utilizar inmediatamente.

Ejemplo 1

Un perro diabético pancreatectomizado fue inyectado por vía intraperitoneal con un trasplante de tejido/matriz pancreático porcino después de cinco semanas de diabetes. La figura 1 ilustra los niveles de glucosa en desayuno AM y la insulina total suplementada para el perro durante un periodo de 18 semanas, incluyendo las cinco semanas antes de la inyección. Se hizo una segunda inyección intraperitoneal en el último día de la semana 3. La segunda inyección fue precedida por una inyección del medio regulador descrito más arriba y seguida por inyecciones diarias del medio regulador durante 3 días después de la implantación. En la semana 6, las inyecciones de insulina fueron disminuidas a una vez al día, en vez de dos veces al día. En la semana 7, las inyecciones de insulina regulares cesaron y únicamente se administró insulina ultralenta diariamente. Una tercera inyección peritoneal fue administrada el último día de la semana con el medio regulador administrado en el sitio de trasplante antes de la inyección. El nivel de glucosa objetivo es 180 mg/dl o inferior. Como se muestra, las inyecciones redujeron el nivel de glucosa del perro y redujeron la cantidad de insulina requerida para mantener el nivel de glucosa objetivo.

Ejemplo 2

Un perro diabético pancreatectomizado fue inyectado de manera intramuscular con un trasplante de tejido/matriz pancreática porcina. La figura 2 ilustra los niveles de glucosa AM en ayunas y la insulina total suplementada para el perro durante un periodo de 19 semanas después de la inyección. Como se muestra, la cantidad de insulina requerida para mantener el valor de glucosa objetivo (180 mg/dl o menos) disminuyó después de la inyección y el nivel de glucosa media del perro disminuyó.

Ejemplo 3

Dos sujetos caninos fueron pancreatectomizados a dos semanas uno de otro y fueron tratados con inyecciones de mezclas de insulina ultralenta y regular dos veces al día. Ambos animales fueron alimentados con cantidades idénticas de alimento con Viokase añadida a las enzimas digestivas de reemplazo pancreático. Los valores de glucosa sanguínea fueron determinados en la mañana y al final de la tarde, y los requerimientos de insulina exógena fueron basados en estos valores.

Durante cuatro semanas antes de que uno de los perros fuera inyectado con 8 cc de un volumen de tejido pancreático no purificado por cuatro volúmenes de matriz, los dos perros tenían determinaciones de glucosa sanguínea equivalentes estadísticamente, y recibieron la misma dosis de insulina dos veces al día. Los niveles de glucosa sanguínea de un perro que no fue inyectado (línea oscurecida sombreada) y un perro que fue inyectado al final intramuscularmente en el día 0 (línea sombreada ligeramente) se muestran en la Figura 3. Las determinaciones de glucosa sanguíneas diarias AM y PM se muestran al comenzar una semana antes de la inyección, y después de un total de tres semanas (22 días).

La figura 3 demuestra que no hubo una diferencia estadística entre las determinaciones de glucosa sanguínea AM o PM durante la semana antes de que uno de los perros recibiera la inyección de tejido porcino. Al comenzar el día de la inyección, el perro inyectado tenía una disminución estadísticamente significativa en la glucosa sanguínea PM con la misma dosis de insulina que el perro no inyectado, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la glucosa sanguínea AM durante la primera semana después de la inyección, reflejando probablemente la resistencia incrementada a la insulina que los mamíferos experimentan en la mañana debido a los efectos de las hormonas contrarreguladoras tales como el cortisol y la hormona de crecimiento. La diabetes tipo I requiere generalmente dos veces tanta insulina en la mañana para cubrir la misma ingestión de carbohidratos de la que requieren antes de la comida nocturna debido a este efecto "cortisol" de la mañana.

Al comenzar el séptimo día después de la inyección, los niveles de glucosa sanguínea del perro inyectado se separaron claramente de los del animal no inyectado. Ambos animales tenían su nivel de insulina disminuido en un 15% al comenzar la semana dos. La glucosa del perro inyectado continúo su normalización, mientras que la glucosa sanguínea del perro no inyectado se elevó como se esperaba. El animal inyectado continúo obteniendo un nivel de glucosa sanguínea disminuido con significado estadístico en comparación con el animal no inyectado durante el periodo de tres semanas. En este punto, separamos la dosis de insulina de los animales de manera que el perro no inyectado pudiera ser controlado mejor.

Ejemplo 4

El animal no inyectado en el ejemplo 3 fue inyectado con tejido pancreático porcino no purificado embebido en la matriz de la presente invención para proteger adicionalmente las células del reconocimiento inmune. Aproximadamente 8 cc de este material fueron inyectados intramuscularmente en el perro no inyectado previamente.

Al comienzo de esta tarde, el nivel de glucosa sanguíneo del perro cayó, y la dosis total de insulina fue cortada al 33%. El perro duró al menos 7 días con el cambio en el nivel de glucosa sanguínea medio diariamente y la dosis de insulina media diariamente mostrada más abajo:

ES 2 337 320 T3

TABLA 3

	Glucosa sanguínea media diaria	Dosis de insulina total media diaria
Siete días antes de la inyección	180 mg%	64 unidades
Siete días después de la inyección	101 mg%	43 unidades

5 Estos datos demuestran que el tejido porcino inyectado tiene el efecto de más de 20 unidades de insulina administrada exógenamente, mientras que la glucosa sanguínea media había caído casi 40% y se había normalizado en 10 15 20 unidades menos de insulina. La insulina diaria total liberada en el sujeto humano es aproximadamente 0.25 unidades/kg de peso corporal, o 20 unidades por día en un hombre de 80 kg. Estos datos no necesariamente reflejan 20 unidades de producción de insulina, puesto que la liberación pulsada del tejido pancreático probablemente incrementa la sensibilidad a la insulina por parte del animal.

20 Estos datos muestran claramente la capacidad del tejido pancreático porcino no purificado para funcionar sin el uso de inmunosupresión. Con base en las figuras anteriores, las células aisladas de estos tres páncreas podrían tratar de 30 a 50 pacientes.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una matriz de hidrogel que comprende gelatina, dextrano y una cantidad efectiva de aminoácidos polares para su uso en el oscurecimiento de proteínas de la superficie celular de un trasplante encapsulado en la matriz de anticuerpos de alta afinidad del mamífero huésped para inducir aceptación permisiva del trasplante por parte del mamífero huésped.
- 10 2. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1 donde la matriz va a ser aplicada al sitio de trasplante antes de la implantación del trasplante, y el trasplante va a ser encapsulado rodeando el trasplante con la matriz.
- 15 3. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1 donde el trasplante encapsulado en la matriz va a ser implantado sin el uso de un dispositivo portador protector adicional.
- 20 4. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el trasplante es apropiado para implantación por inyección, en el huésped mamífero.
- 25 5. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el sitio de trasplante en el mamífero huésped es intramuscular, subcutáneo, intraórganos, intravascular o en la cavidad peritoneal.
- 30 6. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el trasplante comprende tejido, comprendiendo el tejido células que tienen proteínas de superficie celular.
- 35 7. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 6, donde el tejido es encapsulado dentro de la matriz de hidrogel de manera tal que la matriz de hidrogel se enlaza a las proteínas de la superficie celular del tejido.
- 40 8. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 donde el tejido comprende células seleccionadas de células de pulmón, células de hígado, células de riñón, células de timo, células de tiroides, células de corazón, células de cerebro, células isletas pancreáticas, células acinares pancreáticas y mezclas de las mismas.
- 45 9. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el tejido es derivado de una especie diferente del mamífero huésped.
- 50 10. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la gelatina comprende fragmentos de colágeno desnaturalizado, proveyendo los fragmentos de colágeno desnaturalizado grupos polares expuestos.
- 55 11. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 10, donde la gelatina comprende de 0.01 a 40 mM de colágeno desnaturalizado.
- 60 12. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los aminoácidos polares son seleccionados de arginina, lisina, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico.
- 65 13. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 12, donde los aminoácidos polares son seleccionados de arginina, ácido glutámico, lisina y mezclas de los mismos.
- 70 14. Una matriz de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la cantidad efectiva de aminoácidos polares comprende de 3 a 150 mM de aminoácidos polares.
- 75 15. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 14, donde la cantidad efectiva de aminoácidos polares comprende de 10 a 65 mM de aminoácidos polares.
- 80 16. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la cantidad efectiva de aminoácidos polares comprende:
- 85 de 2 a 60 mM de ácido L-glutámico; de 0.5 a 30 mM de L-lisina; y
- 90 de 1 a 40 mM de L-arginina.
- 95 17. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 16, donde la cantidad efectiva de aminoácidos polares, comprende:
- 100 de 5 a 40 mM de ácido L-glutámico;
- 105 de 1 a 15 mM de L-lisina; y
- 110 de 1 a 30 mM de L-arginina.

ES 2 337 320 T3

18. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual comprende adicionalmente de 5 a 500 μM de un inhibidor de óxido nítrico.
- 5 19. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 18, donde el inhibidor de óxido nítrico es L-cisteína.
20. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 18, donde el inhibidor de óxido nítrico comprende un análogo de L-arginina.
- 10 21. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 20, donde el análogo de L-arginina comprende amiguanidina.
- 15 22. Una matriz de hidrogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde un medio regulador que comprende al menos un inhibidor de óxido nítrico se va a aplicar al sitio de trasplante en el mamífero antes, o tanto antes como después, de implantar el trasplante.
- 20 23. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 22, donde al menos un inhibidor de óxido nítrico del medio regulador comprende de 50 a 300 μM de L-cisteína y de 15 a 250 μM de un análogo de la L-arginina.
24. Una matriz de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, donde de 0.01 a 0.3 L (10 a 300 cc) del medio regulador van a ser aplicados en el sitio del trasplante.
- 25 25. Una matriz de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde el medio regulador va a ser aplicado al sitio de trasplante aproximadamente una vez al día desde los días 1 a 7 después de la implantación del trasplante.

30

35

40

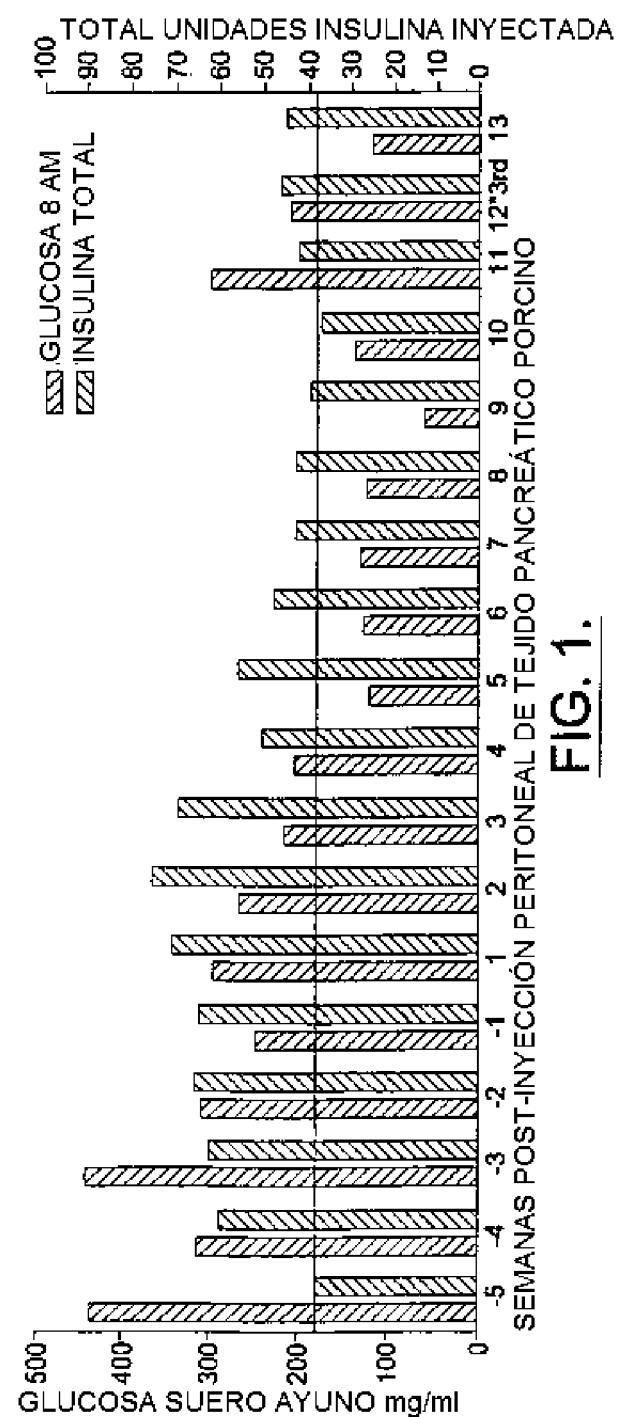
45

50

55

60

65



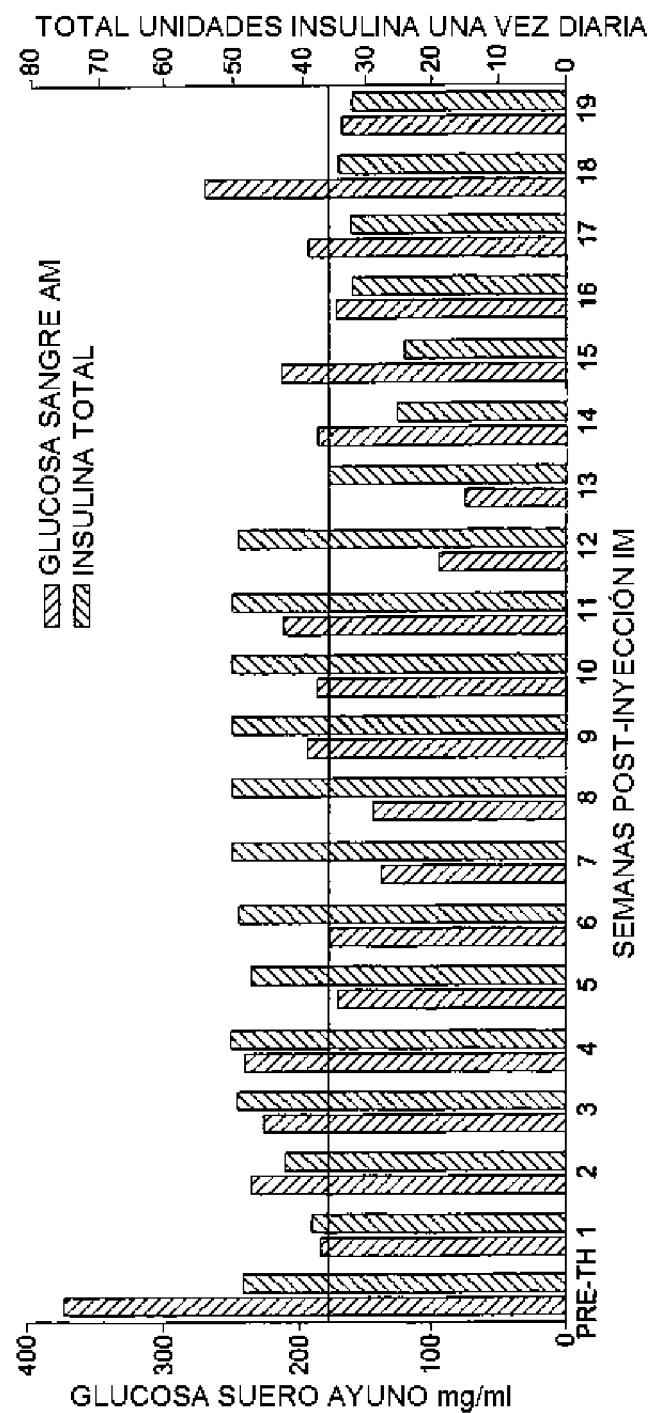


FIG. 2.

