

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 414**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06818357 .3**

96 Fecha de presentación: **03.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1956896**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54 Título: **CRIOCONSERVACIÓN DE HEPATOCITOS.**

30 Prioridad:  
**25.11.2005 DE 102005057106**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2011**

73 Titular/es:  
**CYTONET GMBH & CO. KG**  
**ALBERT-LUDWIG-GRIMM-STRASSE 20**  
**69469 WEINHEIM, DE**

72 Inventor/es:  
**ARSENIEV, Lubomir;**  
**ALEXANDROVA, Krassimira;**  
**BARTHOLD, Marc;**  
**KAFERT-KASTING, Sabine y**  
**LAUBE, Britta**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 369 414 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

## Crioconservación de hepatocitos

La presente solicitud se refiere al ámbito técnico de la crioconservación y en concreto a un procedimiento para la preparación de células hepáticas para la crioconservación, a un procedimiento de crioconservación de células hepáticas aisladas y a un procedimiento para la fabricación de un cultivo sandwich de células hepáticas crioconservadas aisladas.

Las células hepáticas aisladas del entramado de tejidos, en especial los hepatocitos, se utilizan sobre todo en forma de cultivos celulares primarios para comprobar el efecto fisiológico de los fármacos en desarrollo. Sobre todo los hepatocitos primarios recién preparados a partir de personas constituyen el "patrón oro" para identificar los principios activos en desarrollo en una serie de ensayos "in vitro" o para realizar estudios del metabolismo de los principios activos o de la inducción enzimática. En este contexto es un inconveniente que los hepatocitos humanos recién aislados no estén disponibles de modo regular y permanente. Existe, pues, demanda de un procedimiento que permita almacenar los hepatocitos aislados durante un cierto período de tiempo. Pero conviene preservar tanto como se posible la función fisiológica de las células, es decir, sobre todo su capacidad metabólica o enzimática.

Ya es sabido que los hepatocitos se almacenan crioconservados. Por lo general los hepatocitos se crioconservan en suspensión. Aparte de los hepatocitos, la suspensión contiene un medio de congelación, que está destinado a impedir que las células se deterioren por la congelación y descongelación. Para su almacenaje, la suspensión se congela normalmente a temperaturas inferiores a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para la utilización después del almacenaje, la suspensión celular congelada se descongela y se depositan las células sobre placas de cultivo o recipientes de cultivo. Para realizar el nuevo cultivo de las células descongeladas normalmente se recogen los recipientes de cultivo con un material de matriz, sobre el que pueden pegarse o fijarse las células. Que esta adhesión tenga éxito es esencial para el nuevo cultivo y los análisis posteriores. Por lo general solamente se logra que una pequeña porción de las células originales congeladas se conserve en estado viable y pueda recultivarse. El inconveniente de este procedimiento estriba sobre todo en que no puede preverse si o en qué medida las células descongeladas de la suspensión se podrán fijar sobre la placa de cultivo. La porción de las células pegadas de un lote dependerá del lote individual. Por lo general solamente en un reducido número de los lotes se conseguirá que las células crioconservadas y descongeladas se peguen de modo satisfactorio sobre la placa de cultivo.

Otro procedimiento conocido de crioconservación consiste en depositar las células recién aisladas en recipientes de cultivo para después congelar las células depositadas junto con los recipientes de cultivo. También en este caso, antes de depositar las células se recubren los recipientes de cultivo con una matriz, sobre la que las células podrán fijarse. Como ya es sabido, se emplean con preferencia geles de colágeno. En un procedimiento ya conocido se siembran los hepatocitos sobre placas de cultivo recubiertas con colágeno de tipo I y se deja que durante unas 4 horas se adhieran a la matriz de colágeno. Después se cultiva el cultivo monocapa resultante (cultivo celular monocapa) durante unas 20 horas. A continuación se eliminan por lavado las células que no se hayan adherido. Pasadas 6 horas se inunda el cultivo con medio de congelación, se enfría a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se almacena (Watts y Grant, *Human & Experimental Toxicology* 15, 30-37, 1998). Para su utilización posterior se descongelan los cultivos monocapa y se recultivan. Pero los cultivos descongelados presentan una porción elevada de células no adheridas y no viables así como escombros celulares. Es cierto que la mayor parte de la matriz está cubierta de células, pero no se consigue un conjunto celular confluyente ni coherente.

En otros procedimientos conocidos se congelan los hepatocitos en una configuración sandwich, es decir, en una configuración de doble gel. Para ello en primer lugar se siembra una suspensión de hepatocitos sobre placas de cultivo celular recubiertas con gel de colágeno. Pasadas 24 horas de cultivo de las células se vierte una segunda capa de gel de colágeno sobre las células sembradas previamente. A continuación se congela la estructura sandwich resultante en el medio de congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se almacena (Koebe y col., *Cryobiology* 27, 576-584, 1990).

Con la inmovilización de los hepatocitos en la matriz o entre dos matrices antes de la congelación se estabilizan mecánicamente las células y, de este modo, se aumenta el índice de supervivencia. Debido a que las células en estadio recién aislado de gran vitalidad pueden adherirse o fijarse, el grado de fijación es mucho mayor que la fijación de las células congeladas en suspensión y descongeladas después de haberse crioconservado. A pesar de ello, también en este caso después de la descongelación aparecen grandes porciones de células no adheridas o bien no viables. El estado ideal, que es un cultivo confluyente de hepatocitos viables, no se consigue. Además se pone de manifiesto que las células congeladas en suspensión por lo general pierden su capacidad metabólica a las pocas horas de haberse descongelado. Por ello son inadecuadas para un gran número de ensayos "in vitro".

Además, las células aisladas de órganos humanos son por lo general menos robustas que las células extraídas de modelos animales. Esto puede atribuirse ante todo al hecho de que las células humanas se extraen de órganos de donantes por lo general en condiciones que son menos favorables que las existentes en el caso de las células de animales, que por lo general se crían para este fin y en el momento oportuno se eutanasian (por ejemplo ratas, ratones o cerdos). Por ello, las células humanas exigen condiciones de cultivo mucho más suaves. Hasta el presente

no se conoce ningún proceso de crioconservación que permita crioconservar con éxito los hepatocitos humanos, para después poder realizar estudios "in vitro" durante un período de tiempo prolongado.

Existe, pues, demanda de un procedimiento mejorado de crioconservación de hepatocitos, que permita una crioconservación cuidadosa, es decir, que permita realizar una descongelación suave con un alto índice de supervivencia.

- 5 Un procedimiento de crioconservación mejorado deberá ser apropiado sobre todo para crioconservar con éxito los hepatocitos humanos. Para ello debería garantizar que las células descongeladas puedan recultivarse en buena parte, a ser posible en forma de monocapa confluyente (monocapa coherente), sobre la matriz de cultivo. El procedimiento deberá además ser adecuado para poder preparar mejores cultivos sandwich de hepatocitos aislados, que en buena parte contengan células viables. Deberá asegurarse además que las células recultivadas, descongeladas
- 10 después de la crioconservación, conserven sus capacidades metabólicas o enzimáticas durante un período de tiempo lo más prolongado posible, de modo que puedan utilizarse para un gran número de ensayos "in vitro".

El problema técnico que se aborda con la presente invención consiste, pues, en aportar un procedimiento mejorado de crioconservación de células hepáticas aisladas, en especial de hepatocitos humanos, de modo que las células hepáticas crioconservadas puedan recultivarse finalmente en forma de cultivo sandwich mejorado.

- 15 El problema técnico abordado se resuelve con un procedimiento según la reivindicación 1, es decir, un procedimiento "in vitro" de preparación de hepatocitos para la crioconservación, que consta de los pasos siguientes:

En el paso (a) se prepara una matriz, en especial una matriz de colágeno, con preferencia un gel de colágeno. La matriz se deposita previamente con preferencia en un recipiente de cultivo celular, por ejemplo una placa de 6 hoyos. El recipiente de cultivo se recubre con preferencia con el material de matriz.

- 20 En el paso (b) se aportan las células hepáticas aisladas, en especial aisladas del tejido.

En el siguiente paso (c) se siembran las células hepáticas aisladas sobre la matriz. La densidad de los hepatocitos sobre la matriz se sitúa entre  $2$  y  $4 \times 10^3$  células por  $\text{mm}^2$  de la superficie de la matriz. La densidad celular preferida se sitúa entre  $2,6$  y  $3,2 \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$ . Es decir, en un recipiente de cultivo que tenga una superficie de fondo de  $9,6 \text{ cm}^2$ , por ejemplo la superficie del fondo de un hoyo de una placa de 6 hoyos, el número de células sembradas se situará entre  $2,5$  y  $3 \times 10^6$  por hoyo.

- 25 En el siguiente paso (d), que de modo preferente se efectuará de forma inmediata, se dejan las células en reposo sobre la matriz (fase de reposo, fase de adhesión). Para ello se deja en reposo la matriz revestida de células durante un período de 10 a 180 minutos, con preferencia de 30 a 90 minutos, con preferencia especial de aproximadamente 1 hora, de modo que las células sembradas sobre la matriz puedan adherirse a dicha matriz. El reposo se realiza con preferencia en la vitrina de cultivo, en especial en condiciones estándar: a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , una porción del 5 % de  $\text{CO}_2$  y una humedad relativa del aire del 95 %. Se puede realizar un control microscópico para verificar si la adhesión ha tenido éxito.
- 30

- Después del reposo del paso (d), en el paso (e) se eliminan por lavado de la matriz revestida con células (paso de lavado) las células que no se hayan pegado a dicha matriz, el lavado se realiza con mucho cuidado. El lavado se efectúa con preferencia inundando con medio de cultivo la matriz revestida de células y después succionando el líquido sobrenadante formado por el medio de cultivo y las células no adheridas. Este paso se repite por lo menos una vez.
- 35

- En un paso posterior (f) se deja de nuevo en reposo (segunda fase de reposo) la matriz revestida de células y lavada. El reposo tiene lugar durante un período de 180 minutos como máximo, en especial un período de 30 a 180 minutos, con preferencia especial de aprox. 1 hora. El reposo se realiza con preferencia en la vitrina de cultivo, en especial en condiciones estándar: a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , una porción del 5 % de  $\text{CO}_2$  y una humedad relativa del aire del 95 %.
- 40

- Después de la segunda fase de reposo, en el paso (g) se congela la matriz revestida con células dentro del medio de congelación (paso de congelación). Antes de la congelación y después de la segunda fase de reposo se lava con preferencia otra vez la matriz revestida con células, sobre todo para acabar de eliminar las células no adheridas (paso de lavado). Esta operación se realiza con preferencia de igual manera que el paso (e).
- 45

- El procedimiento de la invención prevé, pues, la siembra de células hepáticas aisladas con una densidad determinada sobre una matriz y después de una sucesión determinada de fases de reposo y lavado de las células no adheridas se procede a la congelación en un medio de congelación. Se congela, pues, una matriz revestida de células, en especial una matriz de colágeno, sobre la que las células se fijan y adoptan con preferencia la forma de una monocapa. Con las medidas de la invención se obtiene de modo sorprendente un cultivo de células intactas, que se puede congelar, es decir, crioconservar especialmente bien. Se ha constatado que los cultivos preparados y crioconservados según la invención son especialmente viables después de la descongelación y poseen un número
- 50

elevado de células adheridas sobre la matriz. Las células descongeladas pueden recultivarse con ventaja en una monocapa confluyente.

5 El procedimiento de la invención preserva de modo sorprendente las células en alto grado y por ello es incluso apropiado para las células menos robustas, como son los hepatocitos aislados de órganos humanos. Se pone de  
manifiesto sobre todo que las células preparadas y criopreservadas según la invención, si se recubren con una  
segunda matriz después de la descongelación, conservan su plena actividad metabólica o su capacidad metabólica  
durante varios días, en especial durante más de 3 días.

10 En una forma preferida de ejecución del procedimiento de la invención, la congelación del paso (g) se realiza con un medio de congelación, que se añade en una cantidad aproximada de 0,5 ml por mm<sup>2</sup> de superficie de fondo del  
recipiente de cultivo. Con preferencia se inunda con medio de congelación la matriz revestida con las células. El  
medio de congelación contiene con preferencia un 10 % de suero fetal bovino (FCS) y un 10 % de sulfóxido de  
dimetilo (DMSO).

15 En una forma especialmente preferida de ejecución, en el paso (g) después de la adición del medio de congelación se realiza un enfriamiento controlado, es decir, se congela de modo controlado, con preferencia a una temperatura  
de -80°C o menos. Se aplica con preferencia una velocidad de enfriamiento de -0,5 a - 20°C por minuto. En una  
variante preferida se compensa la transición de fases; esto se realiza con preferencia mediante un calentamiento de  
corta duración, con velocidades de calentamiento comprendidas entre +1 y +3°C/minuto.

20 Después de la preparación y la congelación según la invención de las células hepáticas aisladas sobre una matriz se almacena dicha matriz revestida con las células en estado congelado, en el contexto de una criopreservación. La  
temperatura de almacenado se sitúa con preferencia en -80°C o menos, con preferencia especial en -150°C o me-  
nos. De modo conveniente, el almacenaje se realiza en un congelador o en la fase vapor del aire líquido, o bien en  
nitrógeno líquido. Obviamente son también adecuados todos los demás procedimientos ya conocidos de almacena-  
do de células a temperaturas bajas. Los expertos podrán elegir los procedimientos de almacenaje en función del  
ámbito de aplicación y de la finalidad perseguida.

25 La presente invención se refiere, pues, también a un procedimiento de criopreservación de células hepáticas aisla-  
das, que consta de los pasos de (a) a (g) caracterizados previamente, mientras que en paso ulterior (h) se almacena  
la matriz junto con las células que la revisten a lo largo de un período de tiempo indeterminado, que se elige en  
función del ámbito y de la finalidad de aplicación.

30 En otro paso posterior (i) se vuelve a descongelar la matriz revestida con las células, en cada caso en función del  
ámbito y de la finalidad de aplicación, con preferencia inmediatamente antes del uso o bien en otro momento apro-  
piado. Esto se realiza con preferencia mediante la inundación con un medio de cultivo caliente de la matriz revestida  
con las células que se había congelado. La matriz revestidas con las células y congelada está depositada con prefe-  
rencia en un recipiente de cultivo, por ejemplo una placa de 6 hoyos. El recipiente de cultivo se saca con preferencia  
del arcón congelado o del tanque de nitrógeno y, en especial inmediatamente después, se incuba en la vitrina de  
35 cultivo en condiciones estándar (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del aire del 95 %) durante unos 5 minutos. A  
continuación se pipetea con preferencia un medio de descongelación (medio 1), con preferencia lentamente y por  
goteo, sobre la matriz revestida de células. Como referencia se añaden aprox. 1 ml del medio 1 a una superficie de  
aprox. 9,6 cm<sup>2</sup> (placa de 6 hoyos). La temperatura del medio se sitúa con preferencia en 37°C. Se repite la operación  
para cada recipiente de cultivo celular. Como referencia se emplean como máximo tres placas de 6 hoyos, de modo  
40 que como máximo se inundan con medio caliente 18 hoyos de la matriz revestida con las células. A continuación se  
inunda de igual manera con preferencia cada recipiente de cultivo celular o bien cada hoyo con la misma cantidad  
del medio 1 (1 ml por 9,6 cm<sup>2</sup>), con preferencia lentamente y por goteo. En una forma preferida de ejecución, el  
medio 1 es un medio de descongelación que contiene suero, con preferencia un 10 % de suero fetal bovino (FCS).

45 En otro paso (j) del procedimiento se eliminan por lavado de la matriz revestida con las células sobre todo aquellas  
células que no se han adherido o que se han soltado y no son viables, de modo que se obtiene una matriz libre de  
células no adheridas. Para ello se succiona del modo más completo posible en primer lugar el líquido sobrenadante  
resultante de la adición del medio 1 en el paso (i). Este líquido sobrenadante contiene fundamentalmente células  
descongeladas, no viables y no adheridas. En una forma especialmente preferida de ejecución se añade seguida-  
mente otro medio, es decir, el medio 2, a la matriz revestida de células y succionada y esta adición se realiza con  
50 preferencia por goteo. El medio 2 tiene con preferencia una temperatura aprox. de 37°C. Para la adición del medio 2  
se elige con preferencia la operación de dos pasos descrita para el paso (i); en primer lugar se reparte la primera  
mitad del medio entre todos los recipientes de cultivo celular y después se reparte de igual manera la segunda  
mitad. Las cantidades de medio 2 añadidas equivalente a las cantidades de medio 1 del paso (i). El medio 2 tiene  
con preferencia una composición diferente de la del medio de descongelación (medio 1). El medio 2 contiene con  
55 preferencia suero, con preferencia un 10 % de FCS.

En una forma especialmente preferida de ejecución, después se incuban en la vitrina de cultivo las matrices revestidas de células, inundadas con el medio 2 en condiciones estándar (fase de reposo, incubación) durante unos 30 minutos.

5 Para eliminar las células no adheridas y no viables se succiona del modo más completo posible el líquido sobrenadante de la matriz revestida con las células, situada en el recipiente de cultivo celular. De este modo se obtiene la matriz revestida con las células básicamente libre de células no adheridas y no viables.

10 En otro paso (k) se inunda la matriz revestida de células, ya descongelada y limpia de células no viables, con una segunda matriz, con preferencia con una matriz de colágeno, con preferencia especial con un gel de colágeno o bien se vierte el gel sobre la matriz de las células. El gel, que con preferencia se ha vertido sobre la matriz, se reticula o solidifica con preferencia en un período de tiempo comprendido entre pocos minutos y 1 hora. En una forma preferida de ejecución, la composición de la primera matriz, la inferior, y la de la segunda matriz, la superior, depositada después de la descongelación, son esencialmente iguales, con preferencia idénticas.

15 La segunda matriz, la superior, se vierte con preferencia en forma de gel sobre la monocapa de células hepáticas descongeladas adheridas a la matriz inferior. Según la invención, de este modo se obtiene un cultivo sandwich, en el que las células hepáticas aisladas están atrapadas u ocluidas entre dos matrices, en especial entre dos geles de colágeno.

En el paso final (l) se recultivan las células ocluidas entre las matrices y, según el ámbito y la finalidad de aplicación, se emplean de inmediato o después de un período de cultivo elegido en función de la finalidad, según lo previsto, es decir, con preferencia para ensayos "in vitro".

20 Las células hepáticas aisladas, preparadas y crioconservadas según la invención, descongeladas y recultivadas, poseen un grado de viabilidad especialmente elevado. Despliegan su capacidad metabólica en especial durante mucho tiempo después de la descongelación. De modo ventajoso, con el procedimiento de la invención pueden crioconservarse sobre todo los hepatocitos aislados de órganos humanos, que son menos robustos, y pueden descongelarse con éxito, de modo que pueden utilizarse seguidamente para los ensayos "in vitro" correspondientes a lo largo de un largo período de tiempo. De modo sorprendente se obtiene un cultivo celular, en el que las células pueden recultivarse fundamentalmente como monocapa confluyente y en el que la fracción de células no viables o no adheridas es muy pequeña.

30 La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de un cultivo sandwich de células hepáticas aisladas y crioconservadas, en el que se realizan por lo menos los pasos de (a) a (l) del procedimiento de la invención y se obtiene un cultivo sandwich de células aprisionadas u ocluidas entre una matriz superior y una matriz superior.

35 Es también objeto de la presente solicitud finalmente un procedimiento de preparación de un cultivo sandwich de células hepáticas aisladas, en el que en primer lugar se aporta el tejido hepático de un organismo animal o humano y después se aíslan las células hepáticas del tejido y por lo menos se realizan los pasos de (a) a (l) del procedimiento de la invención. Los expertos, en función del ámbito de aplicación y de la finalidad, podrán elegir procedimientos ya conocidos de aislamiento de las células hepáticas de los tejidos.

### Ejemplos de ejecución

40 La invención se ilustra con mayor detalle en los siguientes ejemplos y figuras. Los ejemplos no deberán tomarse como restrictivos, ya que con ellos se pretende meramente ilustrar mejor el pensamiento que subyace a la presente invención y poner de manifiesto con ejemplos concretos las ventajas de la invención.

Las figuras representan:

la figura 1: son tomas microscópicas de hepatocitos cultivados (escala aprox. 1x150); la figura 1A: hepatocitos humanos recién aislados; figura 1B: hepatocitos humanos crioconservados;

la figura 2: número de hepatocitos viables en función de la duración del cultivo;

45 la figura 3: formación del 6 $\beta$ -OHT y 16 $\alpha$ -OHT después de la inducción enzimática con rifampicina.

Ejemplo 1

Preparación de hepatocitos humanos para la crioconservación

1.1 Aislamiento de hepatocitos humanos

- 5 Los hepatocitos de donantes humanos se aíslan de manera de por sí conocida de partes de tejidos extraídos quirúrgicamente, que se extraen con el consentimiento del donante. Para ello se someten los tejidos a perfusión, con lo cual se sueltan los hepatocitos del entramado de tejidos y se pueden obtener del líquido de la perfusión. La capacidad de supervivencia de los hepatocitos recogidos se determina con el ensayo del azul tripano. Para los demás ensayos se emplean solamente preparaciones celulares que presentan más del 70 % de exclusión de azul tripano.

1.2 Preparación de la matriz

- 10 En los ensayos siguientes se emplean recipientes de cultivo celular en forma de placas multihoyo, placas de 6 hoyos (tipo 657 160, de la empresa Greiner Bio-One). Se recubren las placas con gel de colágeno nativo, que se aísla con preferencia de colas de ratas. Como alternativa se emplean placas multihoyo, placas de 6 hoyos, recubiertas previamente con colágeno de tipo 1 (tipo 657 950 CELLCOAT, de la empresa Greiner Bio-One). Las placas de 6 hoyos tienen una superficie de fondo de 9,6 cm<sup>2</sup> por hoyo.

15 1.3 Siembra de las células

Se siembran los hepatocitos aislados en las placas multihoyo. Para ello se prepara una suspensión de los hepatocitos aislados, que contiene de 2,5 a 3 millones de hepatocitos viables por 2 ml de suspensión. Con la pipeta se introducen 2 ml de esta suspensión celular en cada uno de los 6 hoyos de la placa. La densidad celular se sitúa, pues, entre 2600 y 3200 hepatocitos viables por 1 mm<sup>2</sup> de la superficie del recipiente de cultivo celular.

- 20 Después de la siembra se dejan las placas en reposo durante 1 hora. Para ello se introducen las placas en una vitrina de cultivo, en la que reinan condiciones estándar (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del aire del 95 %). La fase de reposo permite a las células de la suspensión adherirse al gel del colágeno. El éxito de la adhesión puede evaluarse mediante un control microscópico. Después de la fase de reposo/adhesión se succiona el líquido sobrenadante de la suspensión celular, que presenta fundamentalmente células no adheridas.

25 1.4 Congelación de la matriz revestida de células

- Una vez succionado el líquido sobrenadante se añade aprox. 1 ml del medio 1 a 37°C a cada hoyo. A continuación se dejan de nuevo las células en reposo durante una hora más en la vitrina de incubación en condiciones estándar. Después se succiona completamente el líquido sobrenadante, que contiene fundamentalmente células no adheridas. El medio 1 se deriva de un medio de cultivo celular estándar para hepatocitos y contiene un 10 % de suero fetal bovino (FCS). Antes de la congelación se añaden a cada hoyo 0,5 ml del medio de congelación. La adición del medio de congelación se realiza con rapidez. Una vez finalizada la adición del medio de congelación se introducen las placas inmediatamente en la máquina congeladora enfriada previamente a 0°C y se inicia el programa de congelación.

- 35 El medio de congelación se basa fundamentalmente en el medio 1 y contiene un 10 % de suero fetal bovino (FCS) y un 10 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO).

El programa de congelación prevé una compensación de la transición de fases y con él se alcanza la temperatura deseada de -100°C.

A continuación se almacenan las placas de cultivo celular a -151°C en un arcón congelador o en la fase gaseosa de un tanque de nitrógeno.

40 Ejemplos 2

Descongelación de los hepatocitos crioconservados

Se descongelan los cultivos de hepatocitos congelados con arreglo al ejemplo 1 y almacenados a -151°C para su posterior uso en ensayos "in vitro" después de un período de almacenado de hasta 4 semanas y se recultivan.

- 45 Para descongelar los cultivos de hepatocitos crioconservados, inmediatamente después de sacarlos del congelador o del tanque de nitrógeno, se introducen primeramente las placas de 6 hoyos en una vitrina de cultivo durante 5 minutos, que trabaja en condiciones estándar (ver ejemplo 1). A continuación se añaden lentamente y por goteo a

## ES 2 369 414 T3

cada hoyo 1 ml del medio 1 precalentado a 37°C (ver ejemplo 1). Esta operación se repite como máximo para tres placas de 6 hoyos que se descongelan al mismo tiempo, es decir, como máximo para 18 hoyos.

5 A continuación se repite la operación, añadiendo de nuevo lentamente a cada hoyo 1 ml del medio 1. Después se succiona el líquido sobrenadante con una pipeta Pasteur. El líquido sobrenadante contiene fundamentalmente células descongeladas no viables y no adheridas.

10 Para el posterior lavado se añaden de igual manera dos veces 1 ml del medio 2 calentado a 37°C a cada hoyo. Para ello se añade el medio 2, del modo descrito previamente para el medio 1, en dos operaciones de 1 ml cada una a cada hoyo. Después se incuban las placas en la vitrina de cultivo en condiciones estándar durante 30 minutos. Después de la incubación se succiona el líquido sobrenadante completo con una pipeta Pasteur, dicho líquido contiene células no viables y no adheridas.

Se recubre la monocapa resultante de hepatocitos adheridos con otra capa de gel de colágeno, para formar una configuración sandwich. Después de la adición por colada, el gel de colágeno reticula o solidifica al cabo de unos 30 minutos. Tiene una composición que esencialmente equivale a la composición del gel de colágeno inferior, que se deposita previamente en el recipiente de cultivo.

15 El medio 2 es un medio estándar para el cultivo de larga duración de hepatocitos y contiene un 10 % de suero fetal bovino (FCS).

El recultivo posterior del cultivo sandwich formado se realiza en medio 2, que se va sustituyendo cada 24 horas por medio fresco.

### Ejemplo 3

20 **Determinación del número de células viables**

25 Se determina el número de células viables en los cultivos de hepatocitos recién aislados y en cultivos de hepatocitos crioconservados según la invención mediante el recuento de las células morfológicamente intactas. Para ello se contaron en las fotografías de superficies de comparación de una extensión de 0,259 mm<sup>2</sup>. A partir del número de células intactas encontradas en la superficie de comparación se puede determinar el número de células intactas de todo el recipiente de cultivo celular (para las placas empleadas de 6 hoyos, de una superficie de 9,6 cm<sup>2</sup> por hoyo, se obtiene un factor de corrección de 3700).

Antes de la congelación y en diversos momentos después de la descongelación posterior a la crioconservación se documenta fotográficamente la morfología de los hepatocitos recultivados y se compara con los cultivos de hepatocitos recién aislados y cultivados.

30 **Resultados**

35 En la figura 1 se representa la morfología de hepatocitos humanos recién aislados y sembrados sobre una capa de gel de colágeno (figura 1A) así como la morfología de hepatocitos humanos aislados, crioconservados, descongelados y recultivados durante siete días (figura 1B). Las células crioconservadas y recultivadas apenas pueden diferenciarse morfológicamente de las células recién aisladas. La porción de células vivas en el cultivo es ligeramente menor que la porción de células vivas en cultivos de hepatocitos recién aislados.

En la figura 2 se representa el número de hepatocitos humanos viables en función de la duración del recultivo después de la descongelación de los hepatocitos. La curva de comparación indica el número de hepatocitos humanos vivos después del cultivo de células recién aisladas durante el mismo período de tiempo. Inicialmente se sembraron 3 millones de células para la crioconservación y 1,5 millones de células para la preparación reciente.

40 Se pone de manifiesto que los hepatocitos humanos descongelados y recultivados crecen de modo confluyente y que el número de células adheridas vivas no se diferencia sustancialmente del número de células vivas en el caso de cultivos recientes similares. Es digno de mención que después de un período de cultivo más prolongado, el número de células vivas permanece casi constante en el caso de los preparados crioconservados y descongelados.

### Ejemplo 4

45 **Actividad enzimática de los hepatocitos crioconservados**

Un buen índice de la capacidad metabólica o enzimática de los hepatocitos es la capacidad de inducción de la hidroxilación enzimática de la testosterona. En los hepatocitos intactos existe una conversión básica (basal level) de

esta reacción, en la que se forma la hidroxitestosterona (OHT). El grado de formación puede incrementarse en las células intactas por inducción enzimática. La detección de la formación de la OHT en hepatocitos cultivados permite, pues, sacar conclusiones acerca de la capacidad enzimática y de la función fisiológica de los hepatocitos cultivados.

5 El análisis y la cuantificación de la hidroxilación regio- o estereoselectiva de la testosterona se realiza de modo de por sí conocido, por ejemplo por el método publicado por Friedrich y col., J. Chromatogr. B. 784, 49-61, 2003.

10 Para estos análisis se descongelan hepatocitos humanos crioconservados según la invención, se recultivan durante dos días y después se incuban durante 24 horas más en rifampicina. La rifampicina induce la hidroxilación de la testosterona en las posiciones 6 $\beta$ , 16 $\alpha$  y 2 $\beta$ . La hidroxilación de la testosterona en la posición 6 $\alpha$  no se estimula con la rifampicina. La medición de la testosterona hidroxilada en posición 6 $\alpha$  sirve, pues, como medición comparativa de la inducción enzimática causada por la rifampicina.

Como control se incuban en rifampicina cultivos recién aislados también durante 24 horas, después de haberse cultivado durante dos días. Las condiciones del cultivo se eligen similares a las del procedimiento de la invención.

Aparte de la inducibilidad enzimática se determina la conversión básica de la testosterona en las células crioconservadas y recultivadas así como en células recién preparadas y cultivadas.

15 Resultados

Los hepatocitos crioconservados según la invención y recultivados y los hepatocitos recién preparados y cultivados presentan una inducibilidad enzimática similar. Los valores promedio de la inducción de la hidroxilación de la testosterona se recogen en la tabla siguiente.

	hepatocitos crioconservados y recultivados (de la invención)	hepatocitos recién aislados (ejemplo comparativo)
hidroxilación en posición 6 $\beta$	2,8 veces	2,3 veces
hidroxilación en posición 16 $\alpha$	2,4 veces	1,6 veces
hidroxilación en posición 2 $\beta$	2,3 veces	2,4 veces

20 Como era de esperar, la rifampicina no consigue inducir la formación de la 6 $\alpha$ -hidroxitestosterona (6 $\alpha$ -OHT) ni en los hepatocitos crioconservados y recultivados ni en los hepatocitos recién cultivados.

25 En la figura 3 se representa la concentración absoluta de la hidroxitestosterona formada (se representa a título ilustrativo para la 6 $\beta$ -OHT y para la 16 $\alpha$ -OHT) antes y después de la inducción de la hidroxilación de la testosterona con rifampicina. En la parte izquierda de la figura se recogen los resultados de los hepatocitos recién cultivados, en la parte derecha los resultados de los hepatocitos crioconservados y recultivados de la invención. En la figura 3A se representa la formación de la 6 $\beta$ -OHT, en la figura 3B se representa la formación de la 16 $\alpha$ -OHT. Las gráficas de cajas y líneas (box-and-whisker) representan los cuartiles (cuartas partes del valor). El nivel de significancia tiene un valor  $p < 0,05$  (t-test).

30 Por experiencia con hepatocitos crioconservados en suspensión se sabe que la crioconservación reduce en gran manera el grado de conversión básica de la hidroxilación de la testosterona, si se comparan con los hepatocitos recién preparados. Como era de esperar, también en el caso de los hepatocitos crioconservados en monocapa se reduce la actividad básica de los hepatocitos recultivados frente a los hepatocitos recién cultivados. Pero al cabo de 24 y 72 horas después de la descongelación todavía podían detectarse bien.

35 Se pone de manifiesto en particular que los hepatocitos crioconservados al cabo de 72 horas después de la descongelación y después de una incubación previa de 24 horas con rifampicina presentan una clara inducibilidad de la hidroxilación de la testosterona.

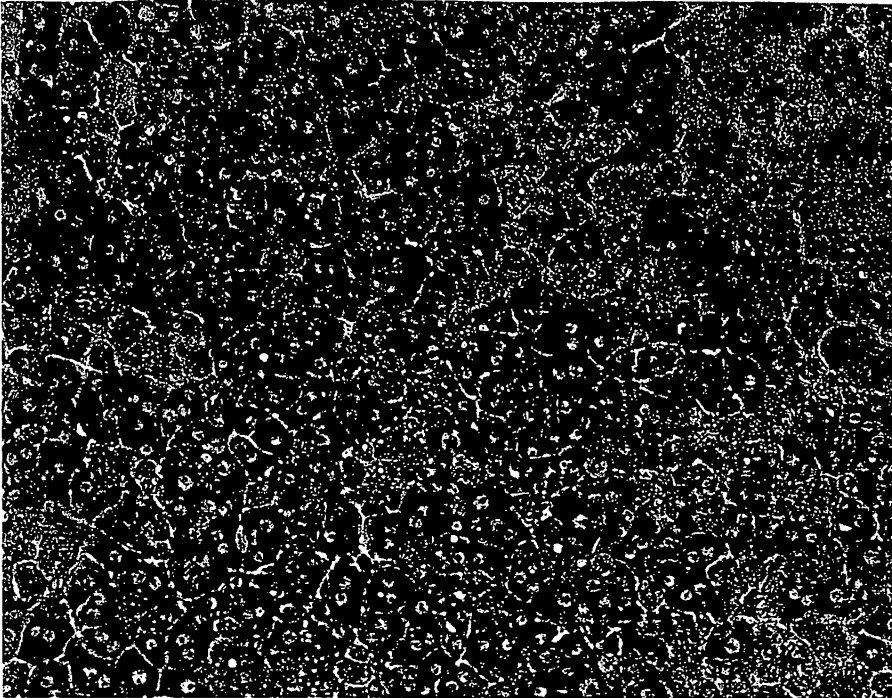
La actividad básica conservada por lo menos durante tres días junto con la inducibilidad no reducida son datos importantes que indican que los hepatocitos humanos crioconservados de la invención pueden utilizarse con éxito para un gran número de ensayos "in vitro".

40

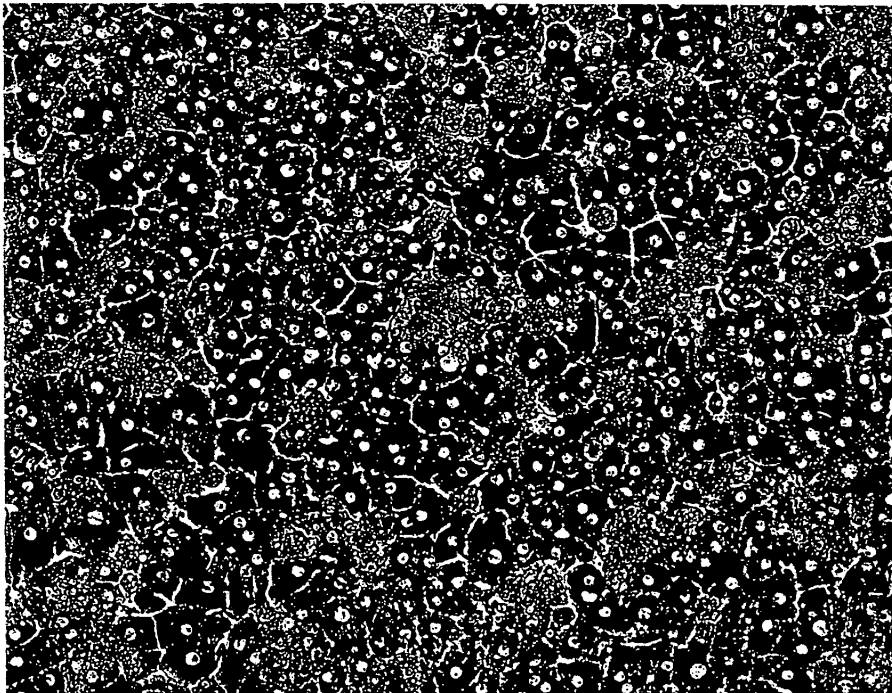


**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento "in vitro" de preparación de hepatocitos para la crioconservación, que consta de los pasos siguientes:
  - (a) aportar una matriz,
  - 5 (b) aportar los hepatocitos aislados,
  - (c) sembrar los hepatocitos sobre la matriz con una densidad comprendida entre  $2$  y  $4 \times 10^3$   $\text{mm}^{-2}$ ,
  - (d) dejar en reposo la matriz revestida con las células durante un tiempo de 10 a 180 min, de modo que las células puedan adherirse a dicha matriz,
  - (e) eliminar por lavado las células que no se han adherido a la matriz revestida con las células,
  - 10 (f) dejar en reposo la matriz revestida de células durante un tiempo como máximo de 180 min y
  - (g) congelar la matriz revestida de células en un medio de congelación.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la matriz es una matriz de colágeno.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (d) el reposo dura de 30 a 90 min.
- 15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (e) se recubre o inunda con medio de cultivo y después se succiona el líquido sobrenadante de la matriz revestida de células.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (f) el reposo dura de 30 a 180 min.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (g) se añade el medio de congelación en una cantidad de  $0,5 \mu\text{l mm}^{-2}$ .
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el medio de congelación contiene un 10% de suero fetal bovino (FCS) y un 10% de DMSO.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (g) la congelación tiene lugar después de inundar o recubrir la matriz revestida de células con el medio de congelación y enfriar de modo controlado hasta  $-80^\circ\text{C}$  o menos, con una velocidad de enfriamiento de  $0,5$  a  $20^\circ\text{C min}^{-1}$ , eventualmente con compensación de la transición de fases.
- 25 9. Procedimiento para el almacenado y recultivo de células hepáticas aisladas, que consta de estos pasos:
  - de (a) a (g) del procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 8,
  - (h) almacenar la matriz revestida de células congelada,
  - 30 (i) descongelar la matriz revestida de células congelada,
  - (j) eliminar por lavado las células no adheridas a la matriz revestida de células,
  - (k) recubrir la matriz revestida de células descongelada con una segunda matriz y
  - (l) recultivas las células aprisionadas u ocluidas entre las dos matrices.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que en el paso (h) se realiza el almacenado a  $-150^\circ\text{C}$ .
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, en el que en el paso (i) se recubre o inunda la matriz revestida de células con un medio de cultivo caliente.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 9 a 11, en el que en el paso (j) se recubre la matriz revestida de células con el medio de cultivo y después se succiona el líquido sobrenadante situado sobre la matriz revestida de células.
- 40 13. Procedimiento para la preparación de un cultivo sandwich de hepatocitos aislados, que consta de los pasos de (a) a (l) del procedimiento según una de las reivindicaciones de 9 a 12.



**Fig 1A**



**Fig 1B**

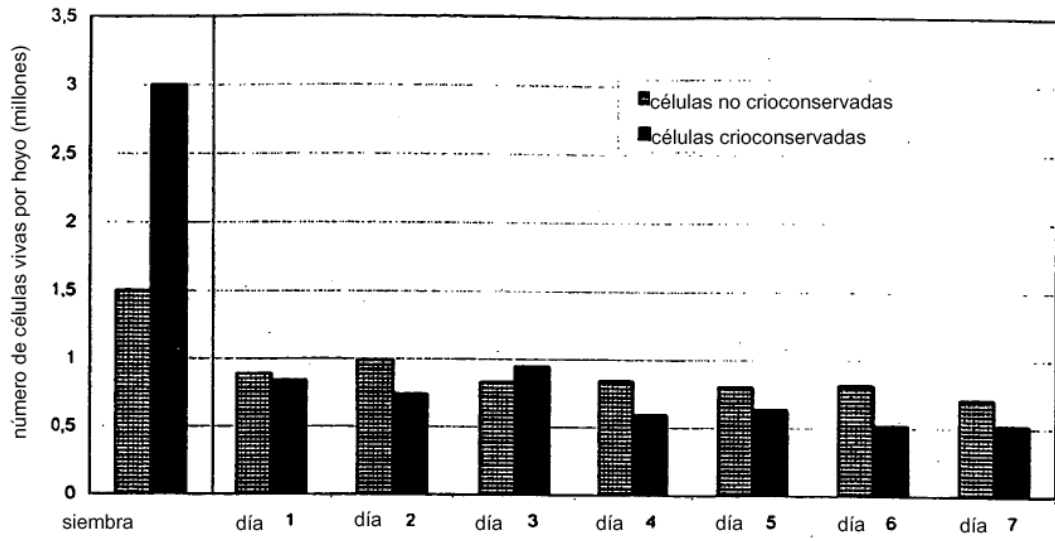


Fig. 2

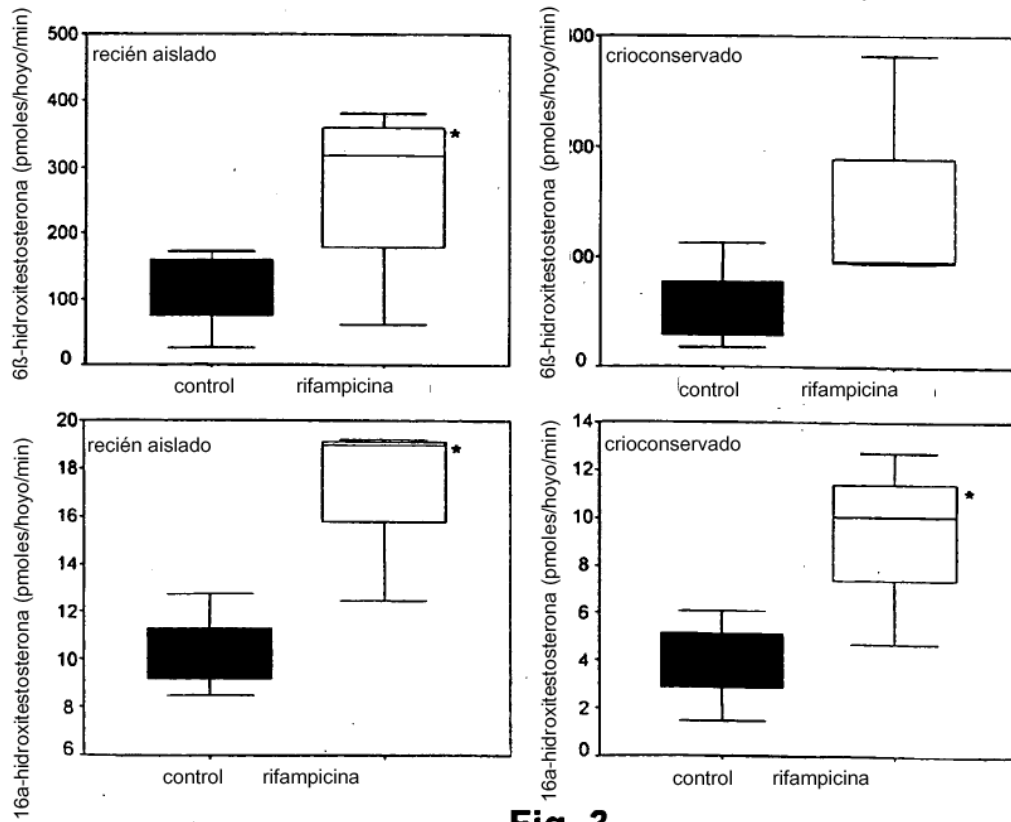


Fig. 3