

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 099**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)
A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06739994 .9**
96 Fecha de presentación: **30.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1891208**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **Nuevas composiciones celulares y métodos para su preparación**

30 Prioridad:
21.04.2005 US 110879

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

73 Titular/es:
CELSIS IN VITRO, INC. (100.0%)
1450 South Rolling Road
Baltimore, MD 21227 , US

72 Inventor/es:
DRYDEN, DANIEL y
HARDY, JAMES

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 389 099 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

Nuevas composiciones celulares y métodos para su preparación

Campo de la invención:

La presente descripción se refiere a nuevas composiciones celulares (por ejemplo, de hepatocitos, etc.) y a métodos para su preparación y uso. En particular, la invención se refiere a métodos para el tratamiento de dichas células de modo que permitan su crioconservación y descongelación repetidas aunque manteniendo su viabilidad sustancial

Antecedentes de la invención:

Los hepatocitos son células parenquimales del hígado y constituyen el 60-80% de la masa citoplásmica del hígado. Los hepatocitos tienen un papel clave en la detoxificación, modificación y excreción de las sustancias exógenas y endógenas (Ponsoda, X. et al. (2004) "*Drug Metabolism By Cultured Human Hepatocytes: How Far Are We From The In Vivo Reality?*", *Altern. Lab. Anim.* 32(2):101-110). Una de las funciones detoxificadoras de los hepatocitos es transformar el amoníaco en urea para su excreción. También son importantes en la síntesis y almacenamiento de las proteínas, en la transformación de los hidratos de carbono y en la síntesis del colesterol, sales biliares y fosfolípidos (Postic, C. et al. (2004) "*Role Of The Liver In The Control Of Carbohydrate And Lipid Homeostasis*", *Diabetes Metab.* 30(5):398-408). El hepatocito es la única célula en el organismo que fabrica albúmina, fibrinógeno y el grupo protrombina de los factores de coagulación. Es el sitio principal para la síntesis de las lipoproteínas, ceruloplasmina, transferrina y glicoproteínas. Los hepatocitos fabrican sus propias proteínas estructurales y enzimas intracelulares. Los hepatocitos son también importantes depósitos de vitamina B12 y hierro.

Debido a estas propiedades, los hepatocitos aislados y cultivados han llegado a ser muy atractivos como sistemas modelos para el estudio de las funciones hepáticas (Chesne, C. et al. (1993) "*Viability And Function In Primary Culture Of Adult Hepatocytes From Various Animal Species And Human Beings After Cryopreservation*", *Hepatology* 18(2):406-414; Guillouzo, A. et al. (1986) "*Isolated and Cultured Hepatocytes*" Paris: les Editions INSERM and London: John Libbey Eurotext); Ponsoda, X. et al. (2004) "*Drug Metabolism By Cultured Human Hepatocytes: How Far Are We From The In Vivo Reality?*", *Altern. Lab. Anim.* 32(2):101-110; Gomez-Lechon, M.J. et al. (2004) "*Human Hepatocytes In Primary Culture: The Choice To Investigate Drug Metabolism In Man*", *Curr. Drug Metab.* 5(5):443-462; Lemaigre, F. et al. (2004) "*Liver Development Update: New Embryo Models, Cell Lineage Control, And Morphogenesis*", *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14(5):582-590; Nanji, A. A. (2004) "*Animal Models Of Nonalcoholic Fatty Liver Disease And Steatohepatitis*", *Clin. Liver Dis.* 8(3):559-574; Hewitt, N.J. et al. (2004) "*Cryopreserved Rat, Dog And Monkey Hepatocytes: Measurement Of Drug Metabolizing Enzymes In Suspensions And Cultures*", *Hum. Exp. Toxicol.* 23(6):307-316).

Además de su uso en modelos hepáticos, los hepatocitos pueden ser potencialmente usados para producir hígados bioartificiales (abreviadamente BAL, del inglés *BioArtificial Liver*) o en el trasplante de hepatocitos que pueden proporcionar funciones hepáticas a individuos que padecen enfermedades hepáticas o insuficiencia hepática. Los hígados bioartificiales (BAL) han sido descritos por Anand, A. C. (1996) "*Bioartificial Livers: The State Of The Art*", *Trop. Gastroenterol.* 17(4): 197-198, 202-211; Gan, J. H. et al. (2005); "*Hybrid Artificial Liver Support System For Treatment Of Severe Liver Failure*", *World J. Gastroenterol.* 11(6):890-894; Fukuda, J. et al. (2004) "*Hepatocyte Organoid Culture In Elliptic Hollow Fibers To Develop A Hybrid Artificial Liver*", *Int. J. Artif. Organs.* 27(12):1091-1099; Meng, Q. et al. (2004) "*Hepatocyte Culture In Bioartificial Livers With Different Membrane Characteristics*", *Biotechnol. Lett.* 26(18):1407-1412; Sekido, H. et al. (2004) "*Usefulness Of Artificial Liver Support For Pretransplant Patients With Fulminant Hepatic Failure*", *Transplant. Proc.* 36(8):2355-2356; documentos WO03/105663A2, WO05/000376A2 y Patente de EE.UU. Nº 6.759.245. El trasplante de hepatocitos ha sido descrito por Chan, C. et al. (2004) "*Hepatic Tissue Engineering For Adjunct And Temporary Liver Support: Critical Technologies*", *Liver Transpl.* 10(11):1331-1342; Lee, S.W. et al. (2004) "*Hepatocyte Transplantation: State Of The Art And Strategies For Overcoming Existing Hurdles*", *Ann. Hepatol.* 3(2):48-53; Horslen, S. P. (2004) "*Hepatocyte Transplantation*", *Transplantation* 77(10):1481-1486; Burlina, A.B. (2004) "*Hepatocyte Transplantation For Inborn Errors Of Metabolism*", *J. Inherit. Metab. Dis.* 27(3):373-83; y Fox, I.J. et al. (2004) "*Hepatocyte Transplantation*" *Am. J. Transplant.* 4 Suppl. 6:7-13.

Un factor limitante en el desarrollo de dichos sistemas modelos y en el desarrollo de hígados bioartificiales (BAL) ha sido la fuente irregular y la disponibilidad limitada de los hepatocitos, especialmente los hepatocitos humanos. Los hepatocitos frescos se obtienen sólo de resecciones hepáticas o hígados no trasplantables de donantes de multiórganos (Lloyd, T. D. R. et al. (2003) "*Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking*", *Cell and Tissue Culture Banking* 4:3-15). El suministro de dicho tejido es desigual y con frecuencia geográficamente inconveniente debido a la vida útil funcional limitada del tejido hepático (Smrzova, J. et al. (2001) "*Optimization Of Porcine Hepatocytes Cryopreservation By Comparison Of Viability And Enzymatic Activity Of Fresh And Cryopreserved Cells*", *Acta Veterinaria Brunensis* 70:141-147).

Una propuesta para resolver este problema implica el desarrollo de condiciones de conservación de los hepatocitos

que permitan que los hepatocitos sean mantenidos durante cierto tiempo conservando sus funciones celulares. Para resolver esta necesidad se han desarrollado métodos de crioconservación para la conservación de hepatocitos (véase, Lloyd, T. D. R. *et al.* (2003) "*Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking*", *Cell and Tissue Culture Banking*, 4:3-15; Loretz, L. J. *et al.* (1989) "*Optimization Of Cryopreservation Procedures For Rat And Human Hepatocytes*", *Xenobiotica*. 19(5):489-498; Shaddock, J. G. *et al.* (1993) "*Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Rat Hepatocytes: Effects On Substrate-Specific Cytochrome P450-Dependent Activities And Unscheduled DNA Synthesis*", *Cell Biol Toxicol.* 9(4):345-357; Novicki, D. L. *et al.* (1982) "*Cryopreservation Of Isolated Rat Hepatocytes*", *In Vitro*. 18(4):393-399; Zaleski, J. *et al.* (1993) "*Preservation Of The Rate And Profile Of Xenobiotic Metabolism In Rat Hepatocytes Stored In Liquid Nitrogen*", *Biochem Pharmacol.* 46(1):111-116). Típicamente, dichas medidas comprenden conservación en nitrógeno líquido (-196°C) o en nitrógeno gaseoso congelado (-150°C). Se ha encontrado que la capacidad para recuperar células descongeladas viables depende de múltiples factores, tales como la velocidad de congelación, la concentración de hepatocitos, el tipo de crioconservante empleado y la temperatura de enfriamiento final. Típicamente se han empleado concentraciones celulares de 10^6 - 10^7 células/mL. Los hepatocitos aislados se incuban típicamente en suspensión durante un periodo (por ejemplo, 4-48 horas) para permitir que se recuperen del proceso de aislamiento. A continuación, se añade un crioconservante (tal como glicerol, DMSO, polivinilpirrolidona o dextrano) y se congelan los hepatocitos. La técnica ha desarrollado diversos procesos de congelación, diseñados todos para minimizar o evitar la presencia de hielo intracelular. Las velocidades de congelación varían típicamente desde -0,05°C/min hasta -50°C/min (véase, Lloyd, T.D.R. *et al.* (2003) "*Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking*", *Cell and Tissue Culture Banking* 4:3-15).

Aunque el desarrollo de los métodos de crioconservación para la conservación de los hepatocitos ha facilitado significativamente la disponibilidad de los hepatocitos humanos, se ha encontrado que la crioconservación causa una disminución significativa de la viabilidad celular (por ejemplo, 25-35%) (Dou, M. *et al.* (1992) "*Thawed Human Hepatocytes In Primary Culture*", *Cryobiology* 29:454-469; Alexandre, E. *et al.* (2002) "*Cryopreservation Of Adult Human Hepatocytes Obtained From Resected Liver Biopsies*", *Cryobiology* 44:103-113). Coundouris, J. A. *et al.* (1993) encontraron una viabilidad del 67% después de 24 horas, que disminuía hasta el 49% después de 14 días (Coundouris, J. A. *et al.* (1993) "*Cryopreservation Of Human Adult Hepatocytes For Use In Drug Metabolism And Toxicity Studies*", *Xenobiotica*. 23(12):1399-1409). Adams, R. M. *et al.* describieron que la viabilidad de los hepatocitos se puede aumentar hasta el 90% usando fluidos especializados para la crioconservación, sin embargo, se encontró que sólo el 16% de las células eran capaces de replicación (Adams, R. M. *et al.* (1995) "*Effective Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Human Hepatocytes With Recovery Of Viability, Differentiation, And Replicative Potential*", *Cell Transplant.* 4(6):579-586). Métodos de crioconservación están descritos en las Patentes de EE.UU. No. 5.795.711, 6.136.525, 5.895.745; Publicaciones de Patentes Internacionales WO04/009766, WO92/12722, WO/0153462, Patente Europea N° EP0834252B, y Solicitudes de Patentes de Estados Unidos N° de Publicaciones US20020039786A1, US20030134418A1. La escasa recuperación de células crioconservadas continúa limitando el uso de hepatocitos en modelos de hígados *in vitro*.

Un segundo problema importante que afecta al uso de hepatocitos tanto recién extraídos como crioconservados es la variación de la expresión de las enzimas hepáticas que se observa en el tejido de diferentes donantes (Li, A. P. *et al.* (1999) "*Present Status Of The Application Of Cryopreserved Hepatocytes In The Evaluation Of Xenobiotics: Consensus Of An International Expert Panel*", *Chem. Biol. Interact.* 121(1):117-123; Li, A. P. *et al.* (1999) "*Cryopreserved Human Hepatocytes: Characterization Of Drug-Metabolizing Enzyme Activities And Applications In Higher Throughput Screening Assays For Hepatotoxicity, Metabolic Stability, And Drug-Drug Interaction Potential*", *Chem. Biol. Interact.* 121(1):17-35; O'Brien, Z. Z. *et al.* (sin fecha) "*The Construction Of A Representative Human Cryopreserved Hepatocyte Pool For Metabolism Study*", www.lionscience.com/repository/ISSX-2002.pdf). Una solución a esta variación de la muestra implica mezclar muestras de diferentes fuentes para producir una preparación "compuesta" de hepatocitos que tenga las características "medias" de las células hepáticas. Sin embargo, se ha citado como inconveniente para evitar la preparación de mezclas de hepatocitos la frecuencia de recepción de tejido fresco y la necesidad de crioconservar los hepatocitos inmediatamente después de su aislamiento. Así, múltiples compañías (por ejemplo, Xenotech, LLC; BD Biosciences) se abstienen de vender mezclas de hepatocitos forzando por tanto al usuario final a descongelar y mezclar los hepatocitos procedentes de diversos donantes diferentes. Esta dificultad se mantiene incluso en el caso de hepatocitos humanos mezclados crioconservados que son un modelo válido para los estudios metabólicos (Zhang, J. G. *et al.* (sin fecha) "*Validation Of Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes As A Model For Metabolic Studies*", (http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/gentest/products/pdf/SO4T126.pdf).

Ostrowska, A. *et al.* (2000) "*Investigation of Functional and Morphological Integrity of Freshly Isolated and Cryopreserved Human Hepatocytes*", *Cell and Tissue Banking*. 1:55-68, describen preparaciones de hepatocitos que ha experimentado una etapa de crioconservación, por lo que tienen una viabilidad media inferior al 70 %.

Por tanto, a pesar de todos los avances anteriores, se siguen necesitando procesos que permitan la disponibilidad de hepatocitos para investigación médica y otros fines. También se necesita una fuente estable y reproducible de hepatocitos humanos. La presente invención permite la producción y disponibilidad de preparaciones de hepatocitos

que pueden ser crioconservados y descongelados repetidamente sin pérdida inaceptable de viabilidad. La invención permite por tanto mezclar múltiples muestras de hepatocitos para producir de preparaciones de hepatocitos, mezclados, especialmente preparaciones de hepatocitos humanos, crioconservados mezclados. Utilizando dicho avance, los hepatocitos humanos crioconservados mezclados están ahora comercialmente disponibles en *In Vitro Technologies* (Baltimore, MD).

Sumario de la invención:

La presente invención se refiere a métodos de tratamiento de preparaciones de hepatocitos, de modo que permitan su crioconservación y descongelación repetidas pero manteniendo su viabilidad sustancial.

También se describe una preparación de hepatocitos multi-crioconservados que comprende hepatocitos que han sido congelados y descongelados al menos dos veces, de los que más del 50% y más preferiblemente el 70%, o incluso más, de los hepatocitos de la preparación es viable.

Se describe dicha preparación de hepatocitos multi-crioconservados en la que los hepatocitos se seleccionan del grupo que consiste en hepatocitos humanos, hepatocitos porcinos, hepatocitos de simio, hepatocitos caninos, hepatocitos felinos, hepatocitos bovinos, hepatocitos equinos, hepatocitos ovinos y hepatocitos de roedores.

Se describe dicha preparación de hepatocitos multi-crioconservados en la que la preparación comprende una preparación de hepatocitos mezclados de múltiples fuentes, que pueden ser del mismo o diferente género, raza o estado de salud o que proporciona la preparación mezclada con un nivel deseado de actividad metabólica (especialmente cuando la actividad metabólica se selecciona del grupo que consiste en actividad de cumarina (COUM), dextrometorfano (DEX), etoxicumarina (ECOD), glucurónido de 7-hidroxycumarina (7-HCG), sulfato de 7-hidroxycumarina (7-HCS), mefenitoína (MEPH), testosterona (TEST), fenacetina (PHEN) y clorzoxazona (CZX).

La invención se refiere a un método para producir una preparación deseada de hepatocitos multi-crioconservados, siendo los hepatocitos capaces de ser congelados y descongelados al menos dos veces y en los que más del 70% de los hepatocitos de la preparación es viable, comprendiendo dicho método:

- (A) proporcionar hepatocitos procedentes de múltiples fuentes que han sido crioconservados y descongelados
- (B) mezclar dichos hepatocitos y someterlos a fraccionamiento en gradiente de densidad (especialmente centrifugación en gradiente de densidad en Percoll) para separar los hepatocitos viables de los hepatocitos no viables,
- (C) recuperar los hepatocitos viables separados, y
- (D) crioconservar los hepatocitos viables recuperados formando con ellos la preparación de hepatocitos deseada.

La invención se refiere además a la realización de dicho método en la que los hepatocitos se seleccionan del grupo que consiste en hepatocitos humanos, hepatocitos porcinos, hepatocitos de simio, hepatocitos caninos, hepatocitos felinos, hepatocitos bovinos, hepatocitos equinos, hepatocitos ovinos y hepatocitos de roedores.

La invención se refiere además a la realización de dicho método en la que la preparación comprende una preparación mixta de hepatocitos de múltiples fuentes, que pueden ser del mismo o diferente género, raza o estado de salud o que proporciona la preparación mixta con un nivel deseado de una actividad metabólica (especialmente, cuando la actividad metabólica se selecciona del grupo que consiste en actividad de COUM, DEX, ECOD, 7-HCO, 7-HCS, MEPH, TEST, PHEN y CZX).

También describe un método de investigación del metabolismo de fármacos *in vitro* que comprende incubar hepatocitos de una preparación de hepatocitos multi-crioconservados en presencia de un compuesto xenobiótico y determinar el destino metabólico del compuesto xenobiótico, o el efecto del compuesto xenobiótico sobre los hepatocitos o sobre una de sus enzimas o actividad metabólica, en el que los hepatocitos han sido congelados y descongelados al menos dos veces y en el que más del 50% y más preferiblemente el 70%, o incluso más, de los hepatocitos de la preparación es viable.

Descripción de las realizaciones preferidas:

Se describen nuevas composiciones celulares y métodos para su preparación y uso. En particular, se describen métodos de tratamiento de preparaciones de células de modo que permitan su crioconservación y descongelación repetidas, manteniendo su viabilidad sustancial. Los métodos son generalmente aplicables a una amplia variedad de tipos de células, incluyendo hepatocitos, células renales, células del bazo, células del timo, células de la médula ósea, células madre, células musculares (incluyendo las células musculares cardíacas), células endocrinas

(incluyendo células pancreáticas, células suprarrenales, células tiroideas, etc.), células epidérmicas, células endodérmicas, etc. Los métodos de la presente invención se ilustran a continuación con relación a un tipo de células preferido: hepatocitos.

5 Se describen preparaciones de células, por ejemplo, hepatocitos, que han sido repetidamente criopreservados y descongelados para obtener una preparación de alta viabilidad, útil para una variedad de fines experimentales, diagnósticos y terapéuticos. La presente invención amplía la capacidad de los hepatocitos de ser criopreservados y descongelados para usos posteriores, de modo que se permita que las preparaciones de hepatocitos sean repetidamente criopreservadas y descongeladas sin una pérdida inaceptable de la viabilidad.

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "preparación de células" significa una composición de células líquida o congelada procedentes de una o más fuentes (por ejemplo, "preparación de hepatocitos" significa una composición de células hepáticas procedentes de una o más fuentes). Las fuentes pueden ser células primarias que han sido disociadas o aisladas de un tejido por resección, biopsia o de órganos de donantes, o pueden ser cultivos celulares secundarios, inmortalizados o transformados. Las células pueden proceder de cualquier fuente de mamífero, incluyendo fuentes humanas, porcinas, de simio, caninas, felinas, bovinas, equinas, ovinas o de roedores. Se prefiere el uso de células humanas, porcinas o de roedores (especialmente ratas). Preferiblemente, más del 50% y más preferiblemente el 70%, o incluso más, de los hepatocitos de dichas preparaciones será viable.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "preparación de células multi-criopreservadas" significa una preparación de células que ha sido congelada y a continuación descongelada al menos dos veces (por ejemplo, una "preparación de hepatocitos multi-criopreservados" significa una preparación de hepatocitos que ha sido congelada y a continuación descongelada al menos dos veces). Dichas preparaciones pueden haber sido congeladas y descongeladas tres, cuatro, cinco o más veces.

25 La expresión "preparación mezclada" significa una preparación de células (por ejemplo, hepatocitos) en la que las células (por ejemplo, hepatocitos) proceden de dos, tres, cuatro, cinco o más fuentes diferentes, tales como diferentes donantes, biopsias, resecciones de tejidos de diferentes muestras de tejidos o diferentes fuentes de tejidos o diferentes cultivos celulares (por ejemplo, de hepatocitos) primarios, secundarios, inmortalizados o transformados. Las células de dichas preparaciones mezcladas pueden ser células seleccionadas aleatoriamente o pueden haber sido seleccionadas para proporcionar la preparación mezclada con un nivel deseado de una o más actividades metabólicas (tal como, por ejemplo, una preparación de hepatocitos que tiene un nivel deseado de actividad de COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, 7-HCS, MEPH, TEST, PHEN y/o CZX), o una característica celular deseada (tal como, por ejemplo, una preparación de hepatocitos procedente de fuentes del mismo género, edad, raza (por ejemplo, caucásica, etc.) o estado de salud (por ejemplo, hepatocitos de hígado infectado con el virus de la hepatitis, hepatocitos de hígado infectado con el VIH-I, hepatocitos de hígado sano, hepatocitos de fumadores, hepatocitos de individuos que padecen cirrosis hepática u otras enfermedades o estados). Por ejemplo, para obtener una preparación de hepatocitos mezclados con una mínima actividad de DEX, podría prepararse una preparación mixta a partir de los N° de lotes 067, CEK, ETR, PFM, VTA o WWM (véase la Tabla III).

40 En una realización preferida, ilustrada con relación a las células hepatocitos, la práctica comprende alguna o todas de las siguientes etapas: el aislamiento de hepatocitos, una primera criopreservación de los hepatocitos primarios aislados para obtener una primera preparación de hepatocitos criopreservados, la descongelación de la primera preparación de hepatocitos criopreservados para obtener hepatocitos viables, la mezcla de los hepatocitos descongelados, el fraccionamiento en gradiente de densidad para separar los hepatocitos viables de los hepatocitos no viables y la reformulación de los hepatocitos viables descongelados para permitir su posterior conservación y uso por criopreservación y descongelación repetidas para obtener hepatocitos viables.

El aislamiento de hepatocitos

45 Se puede emplear o adaptar cualquiera de una amplia variedad de métodos para permitir el aislamiento de los hepatocitos primarios usados en la presente invención. Por ejemplo, se describen técnicas adecuadas para el aislamiento de hepatocitos en el trabajo de Morsiani *et al.*, (1995) "Automated Liver Cell Processing Facilitates Large Scale Isolation And Purification Of Porcine Hepatocytes", *ASAIO Journal* 41:155-161 y en el trabajo de Seglen, P.O. (1976) "Preparation Of Isolated Rat Liver Cells", *Meth. Cell Biol.* 13:29-83). Se hace referencia específica al método de digestión con colagenasa en dos etapas descrito por Li, A. P. *et al.* (1992) "Isolation And Culturing Of Hepatocytes From Human Liver", *J. Tissue Cult. Meth.* 14:139-146.

55 Los hepatocitos pueden ser cultivados en cualquier medio de cultivo adecuado para hepatocitos. Como ilustración y no limitación se pueden mencionar los siguientes medios de cultivo: medio esencial de Chee (Hamilton, G.A. *et al.* (2001) "Effects Of Medium Composition On The Morphology And Function Of Rat Hepatocytes Cultured As Spheroids And Monolayers", *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 37(10):656-667; Zurlo, J. *et al.* (1996) "Characterization Of A Primary Hepatocyte Culture System For Toxicological Studies", *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 32(4):211-220; Arterburn, L. M. *et al.* (1995) "A Morphological Study Of Differentiated Hepatocytes In Vitro", *Hepatology* 22(1):175-187); medio de Eagle modificado (o medio de Eagle modificado por Dulbecco) (Arikura, J. *et al.* (2002) "UW Solution:

- A Promising Tool For Cryopreservation Of Primarily Isolated Rat Hepatocytes", *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 9(6):742-749; Washizu, J. et al. (2000) "Amino Acid Supplementation Improves Cell-Specific Functions Of The Rat Hepatocytes Exposed To Human Plasma", *Tissue Eng.* 6(5):497-504; Iwata, H. et al. (1999) "In Vitro Evaluation Of Metabolic Functions Of A Bioartificial Liver", *ASAIO J.* 45(4):299-306; Stutenkemper, R. et al. (1992) "The Hepatocyte-Specific Phenotype Of Murine Liver Cells Correlates With High Expression Of Connexin 32 And Connexin 26 But Very Low Expression Of Connexin 43", *Exp. Cell Res.* 201(1):43-54), medio de Leibowitz (Coundouris, J. A. et al. (1993) "Cryopreservation Of Human Adult Hepatocytes For Use In Drug Metabolism And Toxicity Studies", *Xenobiotica.* 23(12):1399-1409); medio de Waymouth (Vind, C. et al. (1992) "Regulation By Growth Hormone And Glucocorticoid Of Testosterone Metabolism In Long-Term Cultures Of Hepatocytes From Male And Female Rats", *Biochem. Pharmacol.* 44(8):1523-1528; Nemoto, N. et al. (1991) "Proline Is Required For Transcriptional Control Of The Aromatic Hydrocarbon-Inducible P(1)450 Gene In C57BL/6 Mouse Monolayer-Cultured Hepatocytes", *Jpn J. Cancer Res.* 82(8):901-908; Dich, J. et al. (1988) "Long-Term Culture Of Hepatocytes: Effect Of Biohormones On Enzyme Activities And Metabolic Capacity", *Hepatology* 8(1):39-45; Goethals, F. et al. (1984) "Critical Biochemical Functions Of Isolated Hepatocytes As Sensitive Indicators Of Chemical Toxicity", *Fundam. Appl. Toxicol.* 4(3 Pt 1):441-450); medio de Krebs (House, J. D. (2001) "Threonine Metabolism In Isolated Rat Hepatocytes", *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281(6):E1300-1307; Irvine, F. et al. (1993) "Extracellular Calcium Modulates Insulin's Action On Enzymes Controlling Cyclic AMP Metabolism In Intact Hepatocytes", *Biochem. J.* 293 (Pt 1):249-253; Marsh, D.C. et al. (1991) "Hypothermic Preservation Of Hepatocytes. III. Effects Of Resuspension Media On Viability After Up To 7 Days Of Storage", *Hepatology* 13(3):500-508), etc.
- En una realización preferida, los hepatocitos se crioconservan en un medio que contiene aproximadamente 10% de DMSO y aproximadamente 90% de suero fetal bovino (Loretz, L. J. et al. (1989) "Optimization Of Cryopreservation Procedures For Rat And Human Hepatocytes", *Xenobiotica* 19:489-498; Ruegg, C.E. et al. (1997) "Cytochrome-P450 Induction and Conjugated Metabolism In Primary Human Hepatocytes After Cryopreservation" *In Vitro Toxicol.* 10:217-222).
- La viabilidad de los hepatocitos aislados se puede determinar usando cualquiera de una variedad de métodos. Preferiblemente, dicha viabilidad se determinará usando el método de exclusión con azul tripán (véase, por ejemplo, Berry, M. N. et al. (1992) "Techniques For Pharmacological And Toxicological Studies With Isolated Hepatocyte Suspensions" *Life Sci.* 51(1):1-16). Por tanto la frase "hepatocitos viables" o "viabilidad porcentual", como se usan en la presente memoria, se refieren a la viabilidad de hepatocitos como se determina usando el método de exclusión con azul tripán.

Crioconservación de los hepatocitos primarios aislados

- Los hepatocitos de la presente invención se crioconservan preferiblemente usando nitrógeno líquido y más preferiblemente en las 36 horas siguientes a su aislamiento. Las consideraciones para la crioconservación de hepatocitos humanos se estudian en el trabajo de Lloyd, T. D. R. et al. (2003) "Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking", *Cell and Tissue Culture Banking*, 4:3-15. Los métodos adecuados para la crioconservación de hepatocitos se pueden encontrar también en los siguientes documentos: Adams, R.M. et al. (1995) "Effective Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Human Hepatocytes With Recovery Of Viability, Differentiation, And Replicative Potential", *Cell Transplant.* 4(6):579-586; Chesne, C. et al. (1993) "Viability And Function In Primary Culture Of Adult Hepatocytes From Various Animal Species And Human Beings After Cryopreservation", *Hepatology* 18(2):406-414; Coundouris, J. A. et al. (1993) "Cryopreservation Of Human Adult Hepatocytes For Use In Drug Metabolism And Toxicity Studies", *Xenobiotica* 23(12):1399-1409; Hewitt, N.J. et al. (2004) Cryopreserved Rat, Dog And Monkey Hepatocytes: Measurement Of Drug Metabolizing Enzymes In Suspensions And Cultures", *Hum. Exp. Toxicol.* 23(6):307-316; Novicki, D. L. et al. (1982) "Cryopreservation Of Isolated Rat Hepatocytes", *In Vitro*, 18(4):393-399; Shaddock, J. G. et al. (1993) "Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Rat Hepatocytes: Effects On Substrate-Specific Cytochrome P450-Dependent Activities And Unscheduled DNA Synthesis", *Cell Biol. Toxicol.* 9(4):345-357; Zaleski, J. et al. (1993) "Preservation Of The Rate And Profile Of Xenobiotic Metabolism In Rat Hepatocytes Stored In Liquid Nitrogen", *Biochem Pharmacol.* 46(1):111-116.
- Preferiblemente, los hepatocitos aislados se ponen en suspensión en un medio crioconservador y las células en suspensión se distribuyen en recipientes congeladores seguros. Un medio crioconservador comprende típicamente un medio de cultivo de hepatocitos que contiene al menos un agente crioconservante que minimiza los efectos perjudiciales de la crioconservación, tal como la formación de hielo intracelular durante la congelación. Como ilustración y no limitación, se enumeran los siguientes agentes crioconservantes usualmente empleados: dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol, aminoácidos, propanodiol y glicerol. Un agente crioconservante preferido de la presente invención es DMSO. Agentes crioconservantes adecuados y métodos para su uso en la crioconservación de hepatocitos pueden encontrarse, por ejemplo, en: Loretz, L. J. et al. (1989) "Optimization Of Cryopreservation Procedures For Rat And Human Hepatocytes", *Xenobiotica* 19(5):489-498; Chesne, C. et al. (1993) "Viability And Function In Primary Culture Of Adult Hepatocytes From Various Animal Species And Human Beings After Cryopreservation", *Hepatology* 18(2):406-414; Diener, B. et al. (1993) "A Method For The Cryopreservation Of Liver Parenchymal Cells For Studies Of Xenobiotics", *Cryobiology* 30(2):116-127; Lawrence, J. N. et al. (1991)

"Development Of An Optimal Method For The Cryopreservation Of Hepatocytes And Their Subsequent Monolayer Culture", *Toxicology In Vitro* 5(1):39-51; Houle, R. et al. (2003) "Retention of Transporter Activities in Cryopreserved, Isolated Rat Hepatocytes", *Drug Metab. Disposit.* 31(4):447-451; Silva, J. M. et al. (1999) "Induction Of Cytochrome-P450 In Cryopreserved Rat And Human Hepatocytes", *Chem. Biol. Interact.* 121:49-63.

5 Los hepatocitos aislados se ponen en suspensión preferiblemente en un medio crioprotector en la preparación que se ha de congelar. Las células en suspensión se distribuyen preferiblemente en recipientes congeladores resistentes a una densidad celular de aproximadamente 10^6 células/mL a aproximadamente 4×10^7 células/mL. Los volúmenes de congelación preferidos varían de 0,1 a 10,0 mL. El volumen de congelación preferido es 1,0 mL.

10 A continuación los hepatocitos distribuidos se crioconservan preferiblemente usando un proceso de congelación a velocidad controlada, más preferiblemente a una velocidad de congelación entre aproximadamente $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ y aproximadamente $-25^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta que se alcanza una temperatura final de aproximadamente -90°C . Durante la fase inicial del proceso de crioconservación, se puede emplear siembra para inducir la cristalización controlada o la formación de hielo en las suspensiones de células que ya han sido enfriadas por debajo del punto de congelación del medio de cultivo. Dicha siembra sirve para minimizar el riesgo de formación de hielo y por tanto puede ser
15 beneficiosa para la viabilidad celular. Los métodos de siembra adecuados incluyen insertar una varilla metálica fría en los recipientes de congelación e introducir un chorro de nitrógeno líquido en los recipientes de congelación.

Una vez que se ha alcanzado la temperatura final deseada, las muestras de células congeladas pueden ser transferidas a congeladores de nitrógeno líquido para una conservación prolongada. Las muestras congeladas pueden ser conservadas en la fase líquida de nitrógeno líquido o en la fase gaseosa de nitrógeno líquido.
20 Preferiblemente la conservación se consigue en la fase gaseosa de nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se pueden conservar de este modo durante días, meses o años teniendo la duración de la conservación en la fase gaseosa del nitrógeno líquido poco efecto sobre la viabilidad y función en la descongelación posterior.

La descongelación de hepatocitos crioconservados

25 Las muestras congeladas pueden ser descongeladas para posterior tratamiento retirándolas de la presencia del nitrógeno líquido o del vapor del nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se descongelan preferiblemente colocándolas inmediatamente en un baño de agua precalentado a una temperatura de aproximadamente 37°C a aproximadamente 42°C . Preferiblemente las células se descongelan hasta al menos la etapa en la cual los trozos de hielo pueden desprenderse cuando se invierte el recipiente de las muestras. Preferiblemente a continuación las células descongeladas se tratan rápidamente para retirar las células del contacto con el DMSO, por ejemplo por
30 centrifugación en gradiente de Percoll (como se describe más adelante) o por lavados secuenciales.

En una realización preferida, las células se descongelan en el medio InVitroGRO CP completo (In Vitro Technologies, Baltimore, MD; Roymans, D. et al. (2004) "Determination Of Cytochrome P450 1A2 And Cytochrome P4503a4 Induction In Cryopreserved Human Hepatocytes", *Biochem. Pharmacol.* 67(3):427-437). El medio se prepara descongelando el producto *Torpedo Antibiotic Mix* (In Vitro Technologies, Baltimore, MD) a 37°C en un baño
35 de agua hasta que se descongele, y luego se retira del baño de agua. Luego se mezcla 1,0 mL de *Torpedo Antibiotic Mix* con 45 mL de medio InVitroGRO CP. Después de la adición de *Torpedo Antibiotic Mix*, el periodo de validez del medio completo es 7 días. Cuando se descongela un solo vial, el medio InVitroGRO CP se precalienta hasta aproximadamente 37°C . Se añaden 5 mL de medio InVitroGRO CP calentado a un tubo cónico estéril de 50 mL. El vial de hepatocitos congelados se retira cuidadosamente del congelador. Si el vial estaba conservado en la fase
40 líquida, se le quita cuidadosamente la tapa, se decanta el nitrógeno líquido presente en el vial y se vuelve a cerrar con la tapa antes de colocar el vial en el baño de agua. A continuación se prefiere sumergir el vial inmediatamente en un baño de agua a 37°C y agitar el vial suavemente hasta que el hielo esté totalmente fundido, pero no más tiempo que el que lleve descongelar completamente el vial. Puede ser útil eliminar la etiqueta del vial, de modo que sea más fácil ver su contenido. El contenido descongelado se vacía luego en el medio InVitroGRO CP precalentado.
45 Luego se añade a cada vial 1,0 mL de medio InVitroGRO CP precalentado para volver a poner en suspensión las células restantes. A continuación el contenido del vial se decanta o pipetea en la suspensión de hepatocitos. Los hepatocitos se vuelven a poner en suspensión preferiblemente invirtiendo suavemente el recipiente receptor (por ejemplo, vial, tubo de ensayo, etc.) varias (por ejemplo, tres) veces.

50 Cuando se descongelan múltiples viales, se prefiere que todos los viales sean descongelados simultáneamente en el baño de agua. Como antes, el medio (preferiblemente, el medio InVitroGRO CP) debe ser calentado hasta 37°C . Es deseable asegurarse que hay suficiente medio para permitir que sean utilizados, para cada vial de hepatocitos crioconservado, 5 mL de medio InVitroGRO CP precalentado. Después de que los viales se han descongelado, sus tapas deben ser retiradas rápidamente y sus contenidos vertidos en un tubo o vaso estéril que contenga al menos 5 mL de medio InVitroGRO CP pre-calentado por vial descongelado. Por ejemplo, se emplean preferiblemente 25 mL
55 de medio para 5 viales en un recipiente que puede alojar un volumen de 50 mL.

Si se desea, se puede determinar el recuento total de células y el número de células viables usando el método de exclusión con azul tripán. Las células pueden ser diluidas hasta $0,70 \times 10^6$ células viables/mL con medio InVitro-

GRO CP.

La reformulación de hepatocitos descongelados para permitir posteriores crioconservación y descongelación

Un aspecto se refiere a la capacidad para reformular las células descongeladas de modo que puedan ser recongeladas y descongeladas en una o más ocasiones posteriores. Dichas preparaciones de hepatocitos multi-crioconservados tienen múltiples usos. Pueden ser empleadas en hígados bioartificiales, trasplantes de células hepáticas, dispositivos de asistencia hepática, trasplantes de hepatocitos y aplicaciones *in vitro*. En particular, las preparaciones de hepatocitos multi-crioconservados se pueden usar en estudios de metabolismo de fármacos *in vitro* (por ejemplo, en la identificación de hepatocitos con características únicas (por ejemplo, polimorfismos metabólicos, polimorfismos genéticos, etc.), en estudios sobre el destino metabólico de los compuestos xenobióticos y en estudios sobre el efecto de los compuestos xenobióticos para alterar el perfil enzimático metabolizante de fármacos de los hepatocitos, en estudios de inhibición para determinar la CI_{50} de los compuestos xenobióticos sobre las enzimas y funciones hepáticas (por ejemplo, el metabolismo del colesterol), en estudios de inducción de genes con compuestos xenobióticos, en estudios de inducción de proteínas con compuestos xenobióticos, en determinaciones de toxicidad de compuestos xenobióticos sobre los hepatocitos, en estudios de transporte con compuestos xenobióticos (por ejemplo, estudios sobre los sistemas de transporte de la P-glicoproteína, transportadores de iones orgánicos, transportadores de cationes orgánicos, etc.), en estudios de eliminación metabólica con compuestos xenobióticos, y en ensayos de eficacia (por ejemplo, tratamiento de lipoproteínas, gluconeogénesis, secreción de proteínas etc.). Las preparaciones de hepatocitos multi-crioconservados se pueden usar también para estudiar o propagar virus de la hepatitis y otros virus y agentes infecciosos. Las células recuperadas pueden ser reformuladas para uso en estudios de DNA, mRNA o proteómicos o en estudios de polimorfismos metabólicos. Las preparaciones de hepatocitos multi-crioconservados se pueden usar también en estudios de eliminación metabólica y ensayos de eficacia (por ejemplo, tratamiento de lipoproteínas, gluconeogénesis, secreción de proteínas, etc.). Las células pueden ser reformuladas para uso en bio-reactores de siembra para incubaciones a gran escala o como modelos para la regulación de genes vía microRNA, o para uso en sistemas de combinación con otros tipos de células (por ejemplo, células no parenquimales del hígado o células de otras fuentes, por ejemplo células Caco-2).

Dicha reformulación comprende separar células viables y no viables antes de una subsiguiente recongelación. Para este fin se emplea preferiblemente la centrifugación en gradiente de densidad. Por ejemplo, puede emplearse un método de centrifugación en gradiente de Percoll al 30% (Madan, A. *et al.* (1999) "Effect of Cryopreservation on Cytochrome P-450 Enzyme Induction in Cultured Rat Hepatocytes", *Drug Metab. Dispos.* 27(3):327-335; Sun, E.L. *et al.* (1990) "Cryopreservation Of Cynomologus Monkey (*Macaca fascicularis*) Hepatocytes For Subsequent Culture And Protein Synthesis Studies", *In vitro Cell Development and Biology* 25:147-150; Lawrence, J. N. *et al.* (1991) "Development Of An Optimal Method For The Cryopreservation Of Hepatocytes And Their Subsequent Monolayer Culture", *Toxicology In Vitro* 5(1):39-51; Dou, M. *et al.* (1992) "Thawed Human Hepatocytes In Primary Culture", *Cryobiology* 29(4):454-69; Utesch, D. *et al.* (1992) "Characterization Of Cryopreserved Rat Liver Parenchymal Cells By Metabolism Of Diagnostic Substrates And Activities Of Related Enzymes", *Biochemical Pharmacology* 44:309-315. Por ejemplo, las células descongeladas pueden ser puestas de nuevo en suspensión en un tampón de fraccionamiento isotónico de Percoll al 30% precalentado (aproximadamente a 37°C) y luego centrifugadas a 100 x g a temperatura ambiente durante veinte minutos para sedimentar las células viables. El líquido sobrenadante se desecha y las células se vuelven a poner en suspensión en un medio, directamente para una etapa subsiguiente de crioconservación o para posterior tratamiento antes de la crioconservación.

Las preparaciones crioconservadas que resultan de la congelación de una preparación previamente congelada-descongelada tendrán preferiblemente una viabilidad celular después de la descongelación mayor de 70%. Dichas altas viabilidades permiten a la presente invención realizar la congelación y descongelación repetidas de hepatocitos sin pérdidas inaceptables de células o la necesidad de fuentes de muestras progresivamente mayores.

Preparaciones de hepatocitos mezclados

La capacidad de la presente invención para permitir la congelación y la descongelación repetidas de hepatocitos facilita adicionalmente la producción de preparaciones de hepatocitos mezclados, especialmente preparaciones de hepatocitos humanos mezclados. Como se ha indicado antes, muestras individuales de hígado proporcionan hepatocitos que tienen diferentes capacidades metabólicas. Para facilitar el uso o estudio reproducible de hepatocitos, es deseable minimizar las diferencias de hepatocitos atribuibles a dicha variación de muestras mezclando hepatocitos de diferentes fuentes para obtener una preparación compuesta o "media" de hepatocitos. Dichas preparaciones compuestas de hepatocitos pueden por tanto ser formuladas de modo que proporcionen una preparación que tenga las actividades metabólicas de una muestra de hepatocitos "media" o una preparación cuyas funciones enzimáticas de los hepatocitos se aproximen a las funciones enzimáticas de los hepatocitos recientemente aislados. Dichas actividades metabólicas pueden incluir, por ejemplo, algunas o todas de las siguientes actividades enzimáticas: cumarina-7-hidroxilasa (COUM), dextrometorfano-O-desmetilasa (DEX), 7-etoxicumarina-O-desetilasa (ECOD), actividades responsables para el metabolismo en fase II de 7-hidroxicumarina (7-HCG), actividades

responsables para el metabolismo en fase II de 7-hidroxycumarina (7-HCS), mefenitoína-4-hidroxilasa (MEPH), testosterona-6(β)-hidroxilasa (TEST), tolbutamida-4-hidroxilasa (TOLB), fenacetina-O-desetilasa (PHEN) o clorzoxazona-6-hidroxilasa (CZX). Los sustratos, métodos de medidas y unidades para los ensayos de dichas actividades metabólicas se proporcionan en la Tabla I.

Tabla I			
Actividades metabólicas de los hepatocitos			
Abreviatura	Sustrato/Ensayo	Método de medida	Unidades
7-HCG	Glucurónido de 7-hidroxycumarina	Metabolismo en fase II de 7-hidroxycumarina	pmol/min/10 ⁶ células
7-HCS	Sulfato de 7-hidroxycumarina	Metabolismo en fase II de 7-hidroxycumarina	pmol/min/10 ⁶ células
NAT1	Ácido p-aminobenzoico	N-acetilación del ácido p-aminobenzoico	nmol/mg/min
NAT2	Sulfametazina	N-acetilación de sulfametazina	nmol/mg/min
VBTY	Viabilidad	Exclusión con azul tripán™	porcentaje
AP	Fosfatasa alcalina	Kit Sigma	unidades/mg de proteína
GGT	Gamma-glutamyl-transpeptidasa	Tinción con CGT	positiva
UGT1	7-hidroxycumarina	Metabolismo en fase II de 7-hidroxycumarina	169 pmol/mg/min
P450	Contenido de citocromo p450	Espectro de diferencias con monóxido de carbono difference spectrum	No determinadas para criohepatocitos nmol/mg de proteína
CZX	Clorzoxazona	6-hidroxilación de clorzoxazona	31,1 pmol/mg/min*
COUM	Cumarina	7-hidroxilación de cumarina	50,0 pmol/mg/min*
DEX	Dextrometorfano	O-desmetilación de dextrometorfano	21,4 pmol/mg/min*
MEPH	Mefenitoína	4-hidroxilación de mefenitoína	24,1 pmol/mg/min*
PHEN	Fenacetina	O-desetilación de fenacetina	28,9 pmol/mg/min*
TEST	Testosterona	6(beta)-hidroxilación de testosterona	96,8 pmol/mg/min*
TOLB	Tolbutamida	4-hidroxilación de tolbutamida	30,6 pmol/mg/min*
PROT	Contenido de proteínas	Kit Pierce para proteínas	No determinadas para criohepatocitos mg/mL
ECOD	Etoxicumarina	O-desetilación de 7-etoxicumarina	37,3 pmol/mg/min*

5 Por ejemplo, las preparaciones preferidas de hepatocitos mezclados proporcionarán valores de ensayo dentro de los intervalos identificados en la Tabla II. Alternativamente las muestras de hepatocitos usadas para formar la preparación mezclada puede seleccionarse para maximizar, minimizar o potenciar ciertas funciones de los hepatocitos sobre otras funciones de modo que proporcionen una preparación mezclada que exhiba un perfil deseado por el usuario de la(s) función(es) celular(es) hepática(s).

10 Las preparaciones de hepatocitos mezclados de la presente descripción comprenden hepatocitos obtenidos de diferentes fuentes. Preferiblemente las preparaciones de hepatocitos mezclados resultarán de la reunión o mezcla

de hepatocitos obtenidos de tres, cuatro, cinco, seis o más fuentes diferentes.

- 5 Más preferiblemente, las preparaciones de hepatocitos mezclados comprenderán al menos una población de hepatocitos que fueron crioconservados antes de la mezcla. Por ejemplo, una preparación de hepatocitos mezclados puede comprender una o más muestras de hepatocitos que fueron crioconservados antes de la mezcla con una o más muestras de hepatocitos recientemente aisladas. Alternativamente, una preparación de hepatocitos mezclados puede comprender solamente muestras de hepatocitos que fueron previamente crioconservados. La Tabla II proporciona el intervalo normal (es decir, el intervalo entre el valor mínimo del ensayo y el valor máximo del ensayo para cada ensayo). Los valores de la Tabla II son datos obtenidos de los últimos 150+ lotes de hepatocitos crioconservados humanos.

Tabla II	
Ensayos con hepatocitos	
Ensayo	Intervalo normal (pmol/min/10 ⁶ células)
7-Hidroxilación de cumarina	1 a 154
O-desmetilación de dextrometorfano	0,5 a 96
O-desetilación de 7-etoxicumarina	1 a 154
Metabolismo en fase I de 7-hidroxicumarina	2 a 545
Metabolismo en fase II de 7-hidroxicumarina	0 a 110
4-hidroxilación de mefenitoína	0,2 a 442
6(beta)-hidroxilación de testosterona	2 a 675
4-hidroxilación de tolbutamida	1,8 a 82
O-desetilación de fenacetina	1 a 125
6-hidroxilación de clorzoxazona	2 a 215

- 10 En ciertas realizaciones de la descripción, las preparaciones de hepatocitos tendrán valores de ensayo en los intervalos antes establecidos para al menos tres, y preferiblemente para al menos cuatro, aún más preferiblemente para al menos seis, y más preferiblemente para al menos ocho de los siguientes ensayos: el ensayo de COUM; el ensayo de DEX; el ensayo de ECOD; el ensayo de 7-HCG; el ensayo de 7-HCS; el ensayo de MEPH; el ensayo de TEST; el ensayo de TOLB; el ensayo de PHEN y el ensayo de CZX.
- 15 Si se desea, los hepatocitos crioconservados pueden ser cultivados en placas para cultivo de tejidos revestidas con colágeno o placas para cultivo de tejidos revestidas con otras proteínas de la matriz extracelular incluyendo, pero sin limitación, laminina, fibronectina, entactina, poli-L-lisina, gelatina o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, esto se realiza diluyendo un volumen apropiado (por ejemplo, 0,2 mL a 2,5 mL) de células diluidas (por ejemplo, células que tienen una concentración de aproximadamente $0,7 \times 10^6$ células/mL) en las placas. Para cultivar en placas de microtitulación de 96 pocillos, es deseable diluir más la suspensión de células para conseguir una concentración de $0,35 \times 10^6$ células/mL con el medio InVitroGRO CP y añadir 100 µL de la suspensión de células a cada pocillo. Se prefiere distribuir uniformemente las células en los pocillos. Esto se puede conseguir agitando suavemente las placas de delante hacia atrás y de lado a lado; el uso de un movimiento circular hará que las células se mezclen de modo no uniforme en el centro de los pocillos. Los hepatocitos humanos manipulados de este modo se adherirán a las placas en 2-4 horas, sin embargo, si se desea una manipulación mínima, se puede dejar que las células se adhieran durante una noche.

Habiendo descrito ahora en términos generales la invención, ésta se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se facilitan para ilustración y no se pretende que limiten la presente invención salvo que se especifique lo contrario.

30 Ejemplo 1

Recongelación de preparaciones de hepatocitos descongelados

Los hepatocitos crioconservados se descongelaron y recongelaron como se indica a continuación.

Materiales: jeringa de 30 cc, dos acopladores, Percoll en una bolsa de 1 litro, medio InVitroGro CP-2 en una bolsa de 2 litros, vaso para autoclave de 1-2 litros, calentador, baño de agua, gradilla para tubos de centrifuga.

Método:

- 1) Ajustar a 37-42°C un calentador para un baño de agua recirculante.
- 2) Añadir aproximadamente 200-400 mL de medio InVitroGro CP-2 a un vaso de 1-2 litros. Equipar una cabina de seguridad biológica con una pipeta manual o un robot para manipulación de líquidos.
- 5 3) Retirar aproximadamente 50 crioviales del receptáculo Dewar y colocarlos rápidamente en 2 gradillas para tubos de ensayo. Siempre que sea posible mantener los viales separados.
- 4) Sumergir las suspensiones de células sólidas en el baño de agua calentado hasta que los trozos de hielo puedan desprenderse cuando se invierte el vial.
- 10 5) Verter la suspensión celular de cada vial en el vaso. Añadir 1 mL de medio InVitroGro CP-2 desde el vaso pequeño a cada vial para lavado y verter los contenidos en el vaso. Transferir la suspensión de células descongeladas a una bolsa estéril de 1 litro.
- 6) Unir a la bolsa el medio InVitroGro CP-2 en una bolsa de 2 litros y Percoll embolsado al 30% en un procesador celular COBE automático y tratar de acuerdo con las prácticas estándares.
- 7) Realizar un recuento de células.
- 15 8) Crioconservar la suspensión de células.

Se empleó Percoll/RediGrad™ (Amersham Biosciences) para la centrifugación en gradiente de densidad en Percoll. El Percoll está constituido por sílice coloidal revestida con polivinilpirrolidona (PVP). La formulación de RediGrad™ también está compuesta de sílice coloidal, pero está revestida covalentemente con silano. Se cree que estos revestimientos hacen que el material sea no tóxico e ideal para usar con materiales biológicos
 20 (http://www.apczech.cz/pdf/DF_Redigrad.pdf; [http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=3139FC720067CA6CC1256F360008566F&file=71500870AB.pdf](http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=3139FC720067CA6CC1256F360008566F&file=71500870AB.pdf)).

Ambas partículas tienen una densidad de 1,13 g/mL. La centrifugación de las muestras en presencia de Percoll/RediGrad dio como resultado la formación espontánea de un gradiente de densidad debido a la heterogeneidad de los tamaños de partículas en el medio.

25 Los materiales Percoll/RediGrad se usan mejor en soluciones salinas equilibradas, tal como solución salina fisiológica (NaCl 0,15 M), aunque puede emplearse sacarosa 0,25 M. La adición de 9 partes (v/v) de Percoll/RediGrad a 1 parte (v/v) de NaCl 1,5 M, 10 x medio de cultivo celular concentrado o sacarosa 2,5 M dará como resultado una solución ajustada a aproximadamente 340 mOs/kg de H₂O. Se pueden producir soluciones de diferentes presiones osmóticas ajustando los volúmenes relativos de Percoll/RediGrad y solución salina o de
 30 sacarosa. (Vincent, R. et al. (1984) "Adjustment Of The Osmolality Of Percoll For The Isopycnic Separation Of Cells And Cell Organelles", *Anal Biochem.* 141(2):322-328). El ajuste final hasta la osmolalidad requerida se puede realizar mediante la adición de sales o agua destilada. También se pueden usar satisfactoriamente concentraciones distintas de 10 x solución salina fisiológica.

35 Los materiales Percoll/RediGrad formarán gradientes autogenerados por centrifugación en cabezales de rotor de ángulo fijo después de 15 minutos. Los hepatocitos se pueden separar por centrifugación a 50-100 g (valor medio) en cabezales de rotor de ángulo fijo o flotantes después de 10-30 minutos.

Ejemplo 2

Variación de las muestras de hepatocitos primarios

40 Para ilustrar la variación muestra a muestra de diferentes fuentes de hepatocitos individuales (no mezclados), se aislaron hepatocitos de 82 donantes diferentes y se analizó su viabilidad celular y su función enzimática. Se evaluaron las siguientes actividades metabólicas: COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, T-HCS, MEPH, TEST, TOLB, PHEN y CZX. Los resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III
Variación de las muestras de hepatocitos

Nº del lote	Sexo	%V	COUM	DEX	ECOD	7- HCG	7- HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
067	M	62%	67	1	70	231	24	2	44	35	27	24
086	F	74%	51	23	10	50	9	1	38	13	BQL	18
089	F	77%	25	21	8	23	6	1	11	13	BQL	29
090	F	74%	30	25	7	13	BQL	2	19	15	BQL	16
091	F	73%	13	29	66	44	10	12	252	36	27	36
094	F	67%	41	12	37	24	4	21	126	40	19	87
099	F	86%	21	15	7	4	BQL	1	60	10	BQL	22
104	M	81%	63	21	44	247	25	2	58	37	8	20
105	M	67%	59	15	24	38	14	1	29	27	12	27
110	F	77%	45	24	35	23	4	6	206	11	54	36
111	F	71%	4	10	9	2	3	3	147	2	19	19
114	F	75%	39	23	21	10	5	5	59	TBD	3	45
122	M	79%	26	30	29	80	5	1	42	23	4	25
129	F	90%	4	24	27	67	18	1	16	33	10	51
ACU	F	81%	53	8	25	74	18	8	80	16	4	23
AIT	F	83%	45	29	13	118	14	BQL	82	15	11	7
AOK	M	73%	60	21	58	283	64	5	86	30	24	21
ATR	M	73%	7	11	1	39	11	BQL	11	8	3	4
AVF	M	70%	59	13	50	210	29	BQL	54	37	11	24
BTP	M	88%	66	29	36	214	25	3	50	45	11	12
CEC	M	86%	47	26	17	105	27	21	32	57	38	36
CEK	F	80%	55	2	39	141	5	16	302	41	7	16
CHD	F	77%	30	14	53	471	42	4	28	23	13	26
CPN	M	81%	28	6	40	100	13	2	168	14	37	21
ECM	M	85%	8	11	10	55	18	6	81	18	21	9
EFA	M	69%	9	9	35	47	5	18	66	12	47	67
EHI	F	90%	88	3	56	291	45	1	248	21	45	43
EJR	F	75%	89	14	32	288	43	8	62	41	1	41

Tabla III Variación de las muestras de hepatocitos												
Nº del lote	Sexo	%V	COUM	DEX	ECOD	7-HCG	7-HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
ENR	M	73%	69	28	27	124	31	107	77	36	38	32
EOB	M	88%	14	11	18	65	9	31	49	14	21	35
ETR	F	88%	30	1	34	13	13	7	13	13	37	69
EVY	M	80%	2	20	23	218	77	33	24	25	17	38
FNL	M	85%	17	27	62	282	32	6	6	50	14	24
FRW	M	75%	46	22	16	106	17	48	25	54	44	8
GBE	F	77%	5	49	31	165	20	2	16	19	5	54
GNG	F	74%	57	17	33	54	8	5	95	22	16	22
GTV	F	71%	32	6	8	47	7	BQL	40	28	16	11
GUY	M	92%	65	12	11	73	12	20	90	13	5	8
HHG	M	83%	2	8	14	251	29	BQL	28	12	4	40
HRU	M	90%	43	28	39	175	15	4	69	40	57	44
ICJ	M	74%	134	20	60	287	17	BQL	129	82	28	7
IEM	M	88%	34	17	23	129	34	72	48	23	19	34
IHR	F	76%	17	43	8	84	9	9	95	46	41	7
LID	M	86%	36	31	50	307	54	1	142	49	21	51
IRX	F	73%	57	5	40	172	24	12	113	43	6	18
JUL	M	82%	7	11	3	41	9	7	23	12	2	3
KK5	M	83%	1	8	27	319	38	BQL	61	17	17	42
KPT	F	83%	9	12	32	248	30	55	65	26	56	32
KRJ	F	76%	6	40	76	359	37	1	11	61	23	20
KRM	F	78%	126	36	55	83	17	103	98	46	74	44
K5E	M	73%	65	27	52	206	74	21	123	42	93	16
KZO	F	82%	38	16	38	262	8	6	75	32	30	20
LAE	M	76%	58	15	50	294	22	14	67	63	125	21
MOF	F	91%	79	17	29	10	12	2	85	5	7	46
MRS	M	72%	119	21	110	450	50	2	675	54	68	28
MTR	F	69%	2	33	23	218	3	5	38	67	39	8
MYO	F	94%	40	24	9	24	BQL	BQL	12	7	BQL	11
NPX	F	79%	36	32	13	130	6	15	76	25	20	10
NQT	M	85%	76	12	39	80	23	2	151	14	20	34
OAU	F	81%	47	26	24	86	8	6	85	46	53	13
OZL	M	76%	16	15	61	300	109	3	165	29	17	43
PFM	F	87%	21	1	11	67	10	3	116	8	15	33
PXK	M	80%	86	35	63	433	78	2	109	62	32	60
QWG	F	77%	16	32	29	300	21	9	50	10	BQL	15
REL	F	77%	40	20	15	109	9	65	100	33	75	10
RFA	F	78%	130	42	49	444	52	6	195	30	28	17
RKB	F	95%	42	16	16	100	8	3	36	17	20	19
RML	F	76%	BQL	6	45	129	31	14	152	24	42	29
RNG	F	91%	119	14	97	298	27	177	207	34	71	41
ROE	F	82%	73	24	36	302	37	2	55	17	2	51
SEO	F	72%	36	25	18	106	9	66	102	50	81	11
SQJ	F	74%	115	12	100	285	19	175	210	30	81	42
SRA	M	79%	50	6	71	409	84	10	23	28	18	44
TPZ	F	83%	120	13	101	301	26	171	204	31	82	41
TSR	F	62%	47	66	58	175	20	BQL	6	77	16	34
VCM	M	82%	42	28	79	415	110	0.2	94	16	4	215

Nº del Lote	Sexo	%V	COUM	DEX	ECOD	7- HCG	7- HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
VEN	F	70%	79	69	89	328	53	2	32	58	48	81
VTA	M	78%	32	1	25	84	12	5	120	21	40	15
WWM	M	84%	42	1	27	127	12	6	58	21	16	37
ZAG	M	85%	35	28	39	96	73	1	11	42	17	18
ZCR	M	80%	84	11	39	160	22	38	14	57	20	18
ZIJ	M	72%	6	33	31	320	29	13	25	34	3	13

BQL = por debajo del límite de cuantificación (corresponde a la expresión inglesa *Below Quantitation Limit*)

TBD = pendiente de determinar (corresponde a la expresión inglesa *To Be Determined*)

Ejemplo 3

Caracterización de los hepatocitos mezclados

5 Se prepararon lotes de hepatocitos mezclados criopreservados y se analizó su viabilidad después de descongelación y su función enzimática. Se evaluaron las siguientes actividades metabólicas: COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, T-HCS, MEPH, TEST, TOLB, PHEN y CZX.

10 Se prepararon como se ha descrito antes seis lotes de hepatocitos mezclados, que comprendían mezclas de cinco donantes o mezclas de diez donantes. Los hepatocitos se recogieron de donantes individuales y luego se criopreservaron como lotes individuales usando nitrógeno líquido como agente de congelación. La criopreservación se realizó poniendo en suspensión los hepatocitos en viales de congelación seguros que contenían un medio que tenía aproximadamente 10% de DMSO y aproximadamente 90% de medio de criopreservación. Los hepatocitos distribuidos se congelaron luego en un congelador a velocidad controlada hasta que se alcanzó una temperatura final de aproximadamente -80°C.

15 Para formar las preparaciones de hepatocitos mezclados, se descongelaron los lotes individuales, y las células viables se aislaron por centrifugación en gradiente de Percoll. Los viales de los hepatocitos criopreservados de donantes individuales se descongelaron en un baño de agua a 37°C durante 60-90 segundos. Las células descongeladas se decantaron en un medio a 37°C que contenía 30% de Percoll isotónico y 70% de medio CP-2. La suspensión de células se centrifugó a 100 g durante 20 minutos. Las células viables se recuperaron en un medio de criopreservación y se contaron. Las células viables se diluyeron hasta 20 millones de células por mililitro. Se preparó una segunda solución que contenía 20% de DMSO y 80% de medio de criopreservación (igual volumen al de la suspensión de células antes citada). El 20% de DMSO y el 80% de medio de criopreservación se añadieron lentamente a la mezcla de suspensiones de células. La adición llevó 5-10 minutos. La mezcla resultante contenía 10% de DMSO y 90% de medio de criopreservación con una concentración de células de 10 millones por mililitro. Esta solución se repartió en partes alícuotas en crioviales a 1,0 mL por vial. A continuación se criopreservaron las células. Las células viables de lotes individuales se mezclaron luego para formar preparaciones de hepatocitos mezclados cuyas células tenían valores de ensayos funcionales dentro de los intervalos deseados.

25 Los lotes mezclados se criopreservaron a continuación. La Tabla IV siguiente muestra los resultados de la viabilidad después de descongelación ("% V") y el análisis de la función enzimática de los lotes mezclados. Como se indica en la Tabla III, los lotes tienen una viabilidad media de 79% (Desviación típica \pm 6%).

Tabla IV
Resumen de los datos de lotes de hepatocitos mezclados

Mezcla	%V	COUM	DEX	ECOD	7-HCG	7-HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
MJI ^a	89	63	28	66	301	44	12	70	61	50	62
YDJ ^a	72	66	30	80	470	41	1	165	31	27	71
APO ^b	79	79	21	55	276	43	2	112	22	26	30
HMB ^b	76	61	18	70	231	46	3	151	23	20	83
IJU ^b	75	32	19	35	232	44	2	124	32	11	42
RKS ^b	81	84	20	73	336	53	2	131	28	23	55

^a lotes de 5 donantes ^b lotes de 10 donantes

5 Para comparación, la Tabla V siguiente muestra datos resumidos de un análisis de la viabilidad después de descongelación y de la función enzimática de ochenta y un lotes individuales que estaban crioconservados (es decir, sometidos a un ciclo de crioconservación). Estos datos confirman que la variabilidad lote a lote de la función enzimática encontrada en fuentes de hepatocitos individuales es muy alta. Los datos confirman la idoneidad de emplear preparaciones de hepatocitos mezclados para proporcionar células crioconservadas que se aproximan a la función enzimática de los hepatocitos "medios" para una variedad de enzimas.

Tabla V
Resumen de los datos de lotes de hepatocitos mezclados

	%V	COUM	DEX	ECOD	7-HCG	7-HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
Media	79	37	17	51	276	27	8	35	35	15	19
Alta	95	134	69	110	471	110	177	675	82	125	215
Baja	62	6	1	31	231	24	2	25	34	3	13

10 **Ejemplo 4**

Caracterización de la viabilidad de los hepatocitos mezclados después de descongelación

15 Un uso habitual de los hepatocitos crioconservados es descongelar los hepatocitos y luego incubarlos con diversos compuestos xenobióticos. Para este fin, se prefiere que los hepatocitos mantengan su viabilidad durante al menos varias horas. Para examinar la viabilidad después descongelación con el tiempo para un lote de hepatocitos crioconservados mezclados, las células se descongelaron, se pusieron partes alícuotas en los pocillos de una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. La viabilidad de los hepatocitos se midió luego en diversos tiempos hasta seis horas. La Tabla VI muestra los resultados de este análisis, en donde a las 6 horas permanecían viables el 39% de los hepatocitos.

Tabla VI
Análisis de la viabilidad pos-descongelación de un lote de hepatocitos mezclados

Tiempo	% de viabilidad ^a
T=0	88%
0,5 horas	79%
1,0 horas	84%
2,0 horas	79%
3,0 horas	73%

ES 2 389 099 T3

4,0 horas	67%
6,0 horas	67%
^a viabilidad determinada por azul tripán	

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una preparación de hepatocitos multi-crioconservados, que comprende:
 - (A) proporcionar hepatocitos de múltiples fuentes que han sido crioconservados y descongelados,
 - (B) mezclar dichos hepatocitos y someterlos a fraccionamiento en gradiente de densidad para separar los hepatocitos viables de los hepatocitos no viables,
 - (C) recuperar los hepatocitos viables separados, y
 - (D) crioconservar los hepatocitos viables recuperados formando con ellos dicha preparación de hepatocitos, en donde son viables más del 70% de los hepatocitos de dicha preparación.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho fraccionamiento en gradiente de densidad comprende una centrifugación en gradiente de densidad en Percoll™.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dichos hepatocitos se seleccionan del grupo que consiste en hepatocitos humanos, hepatocitos porcinos, hepatocitos de simios, hepatocitos caninos, hepatocitos felinos, hepatocitos bovinos, hepatocitos equinos, hepatocitos ovinos y hepatocitos de roedores.
4. El método de la reivindicación 3, en donde dichos hepatocitos son hepatocitos humanos.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas múltiples fuentes son del mismo género, raza o estado de salud.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los hepatocitos de dicha preparación mezclada de hepatocitos proporcionan dicha preparación mezclada con un nivel deseado de actividad metabólica.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicha actividad metabólica se selecciona del grupo que consiste en cumarina (COUM), dextrometorfano (DEX), etoxicumarina (ECOD), glucurónido de 7-hidroxicumarina (7-HCG), sulfato de 7-hidroxicumarina (7-HCS), mefinitoína (MEPH), testosterona (TEST), fenacetina (PHEN) y clorzoxazona (CZX).
8. El método de la reivindicación 1, en donde más del 80% de los hepatocitos de dicha preparación son viables.