

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 218**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

A61M 1/34 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008 E 08762515 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2170429**

54 Título: **Cámara multifuncional para alojar un componente biológico**

30 Prioridad:

06.07.2007 GB 0713595

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

16.12.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE LONDON (100.0%)
5 GOWER STREET
LONDON WC1E 6BT, GB**

72 Inventor/es:

**SELDEN, CLARE;
HODGSON, HUMPHREY y
COWARD, SAM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 434 218 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

Cámara multifuncional para alojar un componente biológico

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere al campo de la perfusión hepática extracorporeal y, más en particular, al diseño de una cámara en la cual se puede alojar un componente biológico para formar, p. ej., un hígado bioartificial (BAL, por su nombre en inglés). También se refiere a un hígado bioartificial en sí mismo, sus componentes y las etapas metodológicas asociadas a su desarrollo y uso.

Antecedentes de la invención

10 En la actualidad, el trasplante es la única cura para la hepatopatía crónica y aguda y la insuficiencia hepática. No obstante, este tratamiento está limitado por una ausencia de órganos de donantes. Tan solo en los EE.UU. se encuentran 17.000 pacientes en la lista de espera de trasplantes. Muchos de ellos se mueren mientras esperan un trasplante. Por lo tanto, hay una necesidad urgente de un dispositivo que pueda desempeñar de forma temporal la función del hígado de un paciente, manteniéndolo vivo mientras se encuentra un órgano de donante adecuado, o que proporcione un entorno que garantice que el paciente no se morirá mientras que su propio hígado recupera
15 suficiente funcionalidad para la supervivencia del paciente.

Existen dos tipos principales de máquinas hepáticas:

- Una máquina puramente artificial; y
- Una máquina bioartificial.

20 Ambas se basan en la perfusión del plasma o de la sangre de un paciente en un circuito extracorporeal durante un periodo de 6 horas o más.

Existen sistemas puramente artificiales y se encuentran en desarrollo una serie de sistemas bioartificiales.

Sin embargo, los sistemas puramente artificiales, tales como la diálisis de albúmina, son incapaces de reemplazar todas las funciones hepáticas, entre ellas:

- Desintoxicación
- 25 • Biotransformación,
- Síntesis y
- Conservación

y aunque han resultado ser relativamente seguros en los ensayos clínicos, no han mejorado de forma significativa la supervivencia de los pacientes.

30 Los sistemas puramente artificiales tienen una naturaleza únicamente física o química y proporcionan una función de desintoxicación mediante absorción o intercambio sobre, p. ej., resina, carbón, columnas de intercambio iónico o albúmina, o combinaciones de éstos.

35 En cambio, los hígados bioartificiales (BAL) contienen un componente biológico, a saber, hepatocitos, solos o en combinación con un dispositivo artificial a modo de sistema híbrido. La hipótesis que subyace a la incorporación de hepatocitos es que el funcionamiento del hígado es muy complejo, y comprende muchas vías de síntesis, de desintoxicación y metabólicas, que los dispositivos únicamente mecánicos siempre serán inadecuados para reemplazar el abanico de funciones deseadas; además, no se han definido completamente las funciones críticas para ganar tiempo para que se recupere la función hepática y el uso de los hepatocitos permite el reemplazo de las funciones tanto definidas como indefinidas. Para el componente biológico se utilizan hepatocitos aislados o, en
40 determinadas ocasiones, cortes de hígado, y los sistemas han utilizado tanto células humanas como animales (más a menudo porcinas).

La mayoría de los primeros BAL utilizaban cartuchos de fibra hueca en los cuales las células se separaban con una membrana del plasma o de la sangre completa. El tamaño de los poros de la membrana difería de un sistema a otro, algunos se limitaban a la transferencia de moléculas de menos de 10.000 Da, algunos con un tamaño de poro de
45 hasta 2 µm.

Más recientemente han surgido otras configuraciones que abordan mejor las limitaciones de la transferencia de masa. Incluyen:

- Un AMC-BAL que contiene células adheridas a una matriz de poliéster que está expuesta directamente al

plasma oxigenado, (Flendrig L M, LaSoe J W, Joming G G A, Steenbeek A, Karlisen O T, Bovee W M M J, Ladiges N C J J, TeVelde A A, Chamuleau R A F M «In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound non-woven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates». *Journal of Hepatology*, 1998; 26: 1379-1392).

- 5
- Un biorreactor de tejido sin tejer (Li L J, Du W B, Zhang Y M, Li J, Pan X P, Chen J J, Cao H C, Chen Y, Chem Y M. «Evaluation of a bioartificial liver based on a non-woven fabric bioreactor with porcine hepatocytes in pigs». *Journal of Hepatology*, 2006; 44: 317-324).
 - Un biorreactor de flujo radial (Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Bellini T, Ricci D, Pazzi P, Puviani A C. «Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial flow bioreactor». *Artif. Organs*. 2001; 25: 740-748) y
- 10
- El hígado bioartificial de Innsbruck que contiene agregados de hepatocitos (Hochleitner B, Hengster P, Duo L, Bucher H, Klima G, Margreiter R. «A novel bio-artificial liver with culture porcine hepatocyte aggregates under simulated microgravity». *Artif. Organs*. 2005; 29: 58-66).

Los ejemplos anteriores utilizan hepatocitos de animales.

15 Los ejemplos de reactores con células humanas incluyen los que utilizan:

- Hepatocitos primarios (Gerlach J C, Mutig K, Sauer I M, Schrade P, Efimova E, Mieder T, Naumann G, Grunwald A, Pless G, Mas A, Bachmann S, Neuhaus P, Zeilinger K. «Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study». *Transplantation* 2003; 76: 781-786).
- 20
- Cartuchos de fibra hueca que utilizan líneas celulares procedentes de tumores bien diferenciados, tales como células C3A (Ellis A J, Hughes R D, Wendon J A, Dunne J, Langley P G, Kelly J H, Gislason G T, Sussman N L, Williams R. «Pilot controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure». *Hepatology* 1996; 24: 1446-1451) y
- 25
- Un biorreactor de lecho fluidizado con células C3A humanas encapsuladas a gran densidad (aproximadamente 1 millón de células/ml) en alginato (David B, Dufresne M, Nagel M D, Legallais C. «In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidized bed bioreactor». *Biotechnol. Prog.* 2004; 20: 1204-1212).

Distintos grupos en todo el mundo están trabajando con diferentes componentes biológicos, que incluyen:

- El uso de cultivos primarios de hepatocitos humanos;
- 30
- El uso de cultivos primarios de hepatocitos de cerdo; y
 - El uso de células C3A, una línea celular capaz de proliferar procedente inicialmente de un tumor bien desarrollado de hepatocitos humanos.

35 Hay diferencias fundamentales entre los sistemas que utilizan líneas celulares capaces de proliferar y los que utilizan células primarias. Las líneas celulares capaces de proliferar se pueden inocular de forma individual y se deja que se multipliquen *in situ*, para formar esferoides cohesivos durante un periodo de tiempo, que depende del tiempo de generación de un tipo celular específico. En cambio, las células primarias, incluso si se inoculan a una densidad celular muy alta, no formarán necesariamente contactos intercelulares entre células cercanas y, por consiguiente, no darán lugar necesariamente a un entorno tridimensional verdadero, lo cual está asociado a la inducción de la función, ya que imita la situación *in vivo*.

40 La estrategia del solicitante ha sido utilizar una línea celular, y tiene similitudes con la estrategia de C3A que no ha resultado ser eficaz en los ensayos clínicos. Sin embargo, la línea celular del solicitante es diferente y tiene algunas propiedades funcionales diferentes. También hay diferencias fundamentales entre el alojamiento y el cultivo inicial de las células antes de su uso.

Las células C3A se han utilizado con anterioridad en:

- 45
- Una «configuración de cultivo de cartuchos de fibras huecas» o bien
 - «Sin cultivar», en un lecho fluidizado en perlas de alginato de baja ocupación.

Esto contrasta con la metodología utilizada por el solicitante, que utiliza una matriz de alginato sin revestir en una configuración de biorreactor de lecho fluidizado con precultivo de células encapsuladas para que tengan buena calidad.

50 El componente biológico de los solicitantes, que comprende líneas celulares de hepatocitos humanos cultivados en

una configuración tridimensional, se ha demostrado, a escala de laboratorio, que proporciona una capacidad funcional hepática gracias a las células, que se acerca a la observada *in vivo* para varias de las funciones clave del hígado, que incluyen:

- Síntesis de factores de coagulación;
- 5 • Metabolismo de los corticoesteroides, y
- Funciones de desintoxicación específicas.

A continuación se ofrecen más detalles sobre la expresión de la función específica de los hepatocitos, en los que es pionero el solicitante:

10 El solicitante es pionero (a escala de laboratorio) en el cultivo de líneas celulares procedentes de hepatocitos humanos como colonias esferoides tridimensionales (3-D) en • perlas de alginato, tal y como se describe en:

- Selden C, Shariat A, McCloskey P, Ryder T, Roberts E, Hodgson H. «Three-dimensional in vitro cell culture leads to a marked upregulation of cell function in human hepatocyte cell lines—an important tool for the development of a bioartificial liver machine». *Annals of the New Academy of Science* 1999, 875: 353-363;
- 15 • McCloskey P, Edwards R J, Tootle R, Selden C, Roberts E, Hodgson H J. «Resistance of three immortalized human hepatocyte cell lines to acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinoneimine toxicity». *J. Hepatol* 1999, 31; 841-851;
- Selden C, Khalil M, Hodgson H. «Three dimensional culture upregulates extracellular matrix protein expression in human liver cell lines - a step towards mimicking the liver in vivo?». *Int. J. Artif. Organs* 2000, 23: 774-781;
- 20 • Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, Hodgson H, Selden C. «Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function». *Journal of Hepatology* 2001; 34: 68-77;
- McCloskey P, Tootle R, Selden C, Larsen F, Roberts E, Hodgson H J. «Modulation of hepatocyte function in an immortalized human hepatocyte cell line following exposure to liver-failure plasma». *Artif. Organs* 2002; 26: 340-348; y
- 25 • Coward S M, Selden C, Mantalaris A, Hodgson H J. «Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures». *Artif. Organs*. 2005, 29: 152-158.

Las ventajas de este sistema son:

- 30 • Las células que proliferan en este medio mantienen una arquitectura celular casi cuboidal;
- Tienen una estrecha organización intercelular y celulomatricial.
- Secretan proteínas de la matriz extracelular y un gran repertorio de proteínas secretadas específicas del hígado, como se ejemplifica mediante:
 - Albúmina
 - 35 • Protrombina,
 - Fibrinógeno,
 - α 1-antitripsina y
 - glucoproteína α 1 ácida.

40 Expresan muchas funciones a unos niveles equivalentes a los de los hepatocitos *in vivo*, p. ej., metabolismo de los corticoesteroides, síntesis de glucógeno, etc.

45 El solicitante también ha demostrado que algunas funciones se expresan poco o están ausentes, pero que se pueden complementar. Por ejemplo, han mostrado que aunque los clones de HepG2, entre ellos el subclón de C3A, que se encuentra en la base de un dispositivo bioartificial, producen urea, esto ocurre mediante un mecanismo independiente del ciclo de la urea que no desintoxica el amonio. Así pues, sin modificar, tales células es poco probable que sean beneficiosas para el tratamiento de la encefalopatía dependiente del amonio debida a insuficiencia hepática. Mediante la transferencia génica para reemplazar dos enzimas ausentes, han demostrado que se restaura la producción de urea a partir de amonio en los clones de HepG2 (Marivi-Damelin D, Eaton S,

Damelin L H, Rees M, Hodgson H J, Selden C. «Ornithine transcarbamylase and arginase I deficiency are responsible for diminished urea cycle function in the human hepatoblastoma cell line HepG2». *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2006).

5 También las han caracterizado extensamente con respecto a las funciones hepáticas específicas, como se describe en:

- (Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, Hodgson H, Selden C. «Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly up-regulate both synthetic and detoxificatory liver function». *Journal of Hepatology*, 2001, 34: 68-77;
- 10 • Selden C, Shariat A, McCloskey P, Ryder T, Roberts E, Hodgson H. «Three-dimensional in vitro cell culture leads to a marked upregulation of cell function in human hepatocyte cell lines - an important tool for the development of a bioartificial liver machine». *Annals of the New York Academy of Science* 1999, 875: 353-363; y
- 15 • Selden C, Khalil M, Hodgson H. «Three dimensional culture upregulates extracellular matrix protein expression in human liver cell lines - a step towards mimicking the liver in vivo?» *Int. J. Artif. Organs* 2000, 23: 774-781).

(Referencia a todo lo anterior) y

- L H Damelin, M Kirwan, S Coward, P Collins, I J Cox, C Selden, H J F Hodgson. «Fat-loaded insulin resistant HepG2 cells are resistant to cytokine and pro-oxidant induced damage, but become damage susceptible after down-regulation of AMP-activated kinase» *BASL* 2005; y
- 20 • Selden C, Roberts E, Stamp G, Parker K, Winlove P, Ryder T, Platt H, Hodgson H. «Comparison of three solid phase supports for promoting three-dimensional growth and function of human liver cell lines». *Artif. Organs*, 1998; 22: 308-319.

Además, en un modelo animal de insuficiencia hepática fulminante, han demostrado que mejora los parámetros clínicos y bioquímicos.

- 25 • Rahman T M, Selden C, Khalil M, Diakanov I, Hodgson H J. «Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogeneic model». *Artif. Organs* 2004; 28: 476-482; y
- Rahman T M, Selden A C, Hodgson H J. «A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits». *J. Surg. Res.* 2002: 106: 264-272.

30 Además, han demostrado que mejora la calidad por perla mediante el cultivo en un sistema de cultivo de células en rotación (RCCS, por su nombre en inglés) en condiciones de microgravedad simuladas:

- Coward S M, Selden C, Mantalaris A, Hodgson H J. «Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures». *Artif. Organs.* 2005; 29: 152-158 (referido a lo anterior); y
- 35 • «Human liver cells in a pilot scale fluidised bed bioreactor maintain performance in human liver failure plasma, making them suitable for a bioartificial liver». Presentado en el Congreso Mundial de Biomecánica, 29 de julio-4 de agosto de 2006, en Munich, Alemania.

40 También han analizado la calidad de este sistema en el plasma humano normal y en el plasma recogido de pacientes con insuficiencia hepática aguda, y han establecido que se mantiene la viabilidad y la calidad del funcionamiento durante 8 horas.

- S. M. Coward, C. Legallais, M. Thomas, F. Tofteng, F. Larsen, H. J. Hodgson, C. Selden. «Alginate-encapsulated HepG2 cells in a pilot-scale fluidised bed bioreactor maintain performance in human liver failure plasma making them suitable for use in a bioartificial liver». *Journal of Hepatology* 44 [Supl 2], S53, 2006.

45 Sin embargo, la utilización del componente biológico a gran escala, a partir de un tamaño a escala de laboratorio, en la que interviene un volumen de no más de 70 ml de perlas de alginato, ofrece retos significativos, algunos de los cuales se tratan en la presente memoria, cuyas soluciones pueden formar la base de reivindicaciones independientes.

Así pues, por ejemplo, el componente biológico del sistema extracorporeal debe:

- 50 • Estar preparado para las normas de correcta fabricación (GMP, por su nombre en inglés),

- Ser fácilmente transportable a los centros donde se hospitalizarán los pacientes,
- Tener un embalaje cómodo para el almacenamiento, transporte y carga en un sistema de perfusión;
- Poderse trasladar desde la «fábrica celular» al «hospital» para usarlo en la circulación extracorporeal.

5 La patente de los EE.UU. US 6.218.182 da a conocer un biorreactor de ingeniería tisular para hacer crecer el tejido en tres dimensiones, en el cual las células se inoculan sobre una malla. Después de que el tejido se ha hecho crecer en el biorreactor, se sugiere que se puede congelar y conservar en el propio recipiente del biorreactor.

10 Un objetivo de la presente invención fue desarrollar una cámara, a gran escala para el uso en los humanos, en la cual el solicitante puede incorporar su, u otro, componente biológico para formar un hígado bioartificial que pueda proporcionar beneficio a los pacientes, pero que pueda utilizarse también para imitar un hígado en los estudios de metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. En el último caso no habría la necesidad absoluta de crioconservar las células.

Este objeto se consigue teniendo una cámara, en la que se puede alojar un componente biológico para formar, por ejemplo, un hígado bioartificial (BAL), que es funcionalmente modular por el hecho de poder conservar el componente biológico de una manera que le permite:

- 15
- la proliferación (*in situ*) del componente biológico;
 - la crioconservación (tanto congelación como descongelación) del componente biológico (*in situ*); y
 - que se pueda perfundir.

Presente invención

La invención se define mediante las reivindicaciones anexas.

20 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se da a conocer una cámara para el componente biológico de un hígado bioartificial que comprende un soporte de lecho fluidizado, una entrada de fluidización y una salida de fluidización caracterizada por que está configurada para permitir:

- La proliferación del componente biológico, *in situ*;
 - La crioconservación del componente biológico, *in situ*, mediante elementos de intercambio térmico, y
- 25
- La perfusión de componente biológico, *in situ*.

Preferiblemente, la cámara también está diseñada de tal manera que se puede esterilizar antes de introducir el componente biológico en la cámara.

Preferiblemente, el componente biológico comprende:

- Una línea celular, lo más preferiblemente células Hep G2;
- 30
- Un agente formador de matriz, lo más preferiblemente perlas de alginato; y
 - Un agente de control la densidad, lo más preferiblemente perlas de vidrio.

La línea celular está encapsulada en el agente formador de matriz junto con el agente de control de la densidad.

La encapsulación proporciona una serie de funciones:

- Protege las células durante la congelación/descongelación
- 35
- Facilita que la biomasa se manipule sin dificultad
 - Permite la perfusión en una cámara o reactor de lecho fluidizado; y
 - Proporciona un matriz que permite que las células formen una masa tridimensional.

El solicitante ha descrito que tales células encapsuladas en alginato pueden ser adecuadas para su uso a gran escala: Coward et al., Resumen de póster, 4-5 diciembre de 2006 (incorporada por referencia).

40 La cámara sirve de reactor de lecho fluidizado y comprende:

- Una entrada y una salida que permiten que el fluido fluya a través de la cámara; y

- Un soporte del lecho del fluido por encima del cual pueden estar en suspensión las células encapsuladas.

El concepto general de utilizar un lecho fluidizado para la perfusión se ha descrito también con anterioridad: Legallais et al., *Artificial Organs* 24 (7): 519-525. Sin embargo, no se ha sugerido con anterioridad que un lecho fluidizado pueda utilizarse beneficiosamente en la etapa de proliferación ni con esferoides celulares, sólo con suspensiones de células individuales encapsuladas.

El soporte del lecho del fluido comprende una placa que presenta una gran cantidad de agujeros espaciados, de no más de 200 µm, que permiten la fluidización controlada del lecho. El lecho tiene un filtro que lo cubre y que se mantiene en su sitio mediante, p. ej., un anillo de alambre. La placa se sella dentro de la cámara mediante, por ejemplo, una junta tórica.

- 10 La cámara es preferiblemente cilíndrica y tiene una proporción de aspecto (a) = altura (h) / diámetro (d) de 10:1 a 1,3:1. Esto es significativo por dos razones:

En su posición derecha (vertical), tal proporción de aspecto proporciona un entorno óptimo (características de la relación de masa/volumen) para la proliferación inicial de las células y para el uso, a saber, para la transferencia de oxígeno y nutrientes a las células y para la transferencia de proteínas desde las células a, p. ej., plasma o medio de cultivo. También facilita la sustitución del medio antes de la crioconservación (congelación/descongelación rápida de las células).

- 20 En su posición horizontal (en particular cuando la proporción de aspecto se acerca a 10:1), el componente biológico puede «diseminarse», de tal forma que se puede poner en contacto una mayor superficie del mismo con la pared externa de la cámara y los elementos de intercambio térmico, lo que facilita que se caliente o enfríe mejor (con una alteración mínima de la fluidización) debido al desplazamiento lateral de la posición de los elementos de intercambio térmico respecto al volumen de la cámara principal.

- 25 Para tratar adicionalmente el problema de obtener suficiente oxígeno para las células, en un dispositivo a gran escala para el uso con los humanos (típicamente uno de un tamaño de un volumen de 1 a 10 l capaz de contener de 0,5 a 5 l de un componente biológico y que debe ser capaz de permitir una expansión de hasta el doble del volumen al fluidificarlo), en donde la cámara comprendía adicionalmente un sistema de transporte de fluido dispuesto en ésta. El sistema de transporte del fluido tiene una función principal de transportar los gases al componente biológico, pero puede tener también una función accesorio de transporte de un líquido de calentamiento o enfriamiento. Para facilitar su función principal, está hecho de un material permeable a los gases y se dispone dentro de una cámara de una manera que garantiza que no se forme un gradiente perjudicial de oxígeno desde la entrada a la salida cuando se encuentra en uso.

En una realización favorita, el sistema de transporte de fluido está dispuesto helicoidalmente alrededor de las paredes internas que rodean la cámara.

- 35 En otra realización preferida, el sistema de transporte de fluido tiene un grado de compresibilidad, de tal forma que puede funcionar como un «absorbedor de choques» durante la crioconservación, lo que proporciona un grado adicional de protección al componente biológico encapsulado.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se da a conocer un dispositivo de hígado bioartificial que comprende una cámara de la invención llena de un componente biológico.

Además, el dispositivo de hígado bioartificial puede comprender una solución, p. ej., un medio de cultivo (durante la proliferación), crioconservante (durante el almacenamiento) o plasma (durante la perfusión).

- 40 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se da a conocer un método de perfusión de sangre o plasma que imita un hígado en los estudios de metabolismo de fármacos y de hepatotoxicidad que comprenden la introducción del plasma o de la sangre en un dispositivo de hígado bioartificial de la invención, de tal manera que penetra en la cámara a través de la entrada y la abandona por la salida.

- 45 También se describe un método escalable para la fabricación de un componente biológico que comprende un agente formador de matriz que contiene una gran cantidad de células y uno o más modificadores de la densidad que comprende:

- Preparar el agente formador de matriz;
- Inocular el agente formador de matriz con una gran cantidad de células;
- 50 Densificar el agente formador de matriz con un modificador de la densidad de tal forma que las perlas del componente biológico conseguirán estar continuamente en suspensión cuando se perfunden en plasma humano;
- iv. Pasar el componente biológico a través de una boquilla moldeada para formar una corriente,

- v. Cortar la corriente en perlas; y
- vi. Polimerizar las perlas.

Preferiblemente, el agente formador de matriz es un alginato y se inocula con $0,5 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^6$ células por mililitro de alginato, el modificador de la densidad son partículas de vidrio, la boquilla moldeada tiene una sección transversal circular y tiene un diámetro de 250 a 450 μm , y la corriente se corta con discos de alambre a una velocidad de 3000 a 4000 rpm.

Se describe adicionalmente un método escalable para la proliferación de las células inoculadas en un agente formador de matriz que comprende:

1. Colocar las células inoculadas en el agente formador de matriz en una cámara que tiene un lecho fluidizado, y
2. Dejarlas crecer para que la funcionalidad sea la idónea.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se da a conocer un método para crioconservar las células proliferadas en una cámara que comprende un lecho fluidizado y uno o una gran cantidad de elementos de intercambio térmico dispuestos en ésta:

1. Que intercambian el crioprotector con las células proliferadas en la cámara;
2. Que cuando la cámara se dispone horizontalmente permiten la distribución de las células proliferadas a lo largo de la longitud (h) de la cámara; y
3. Que enfrían rápidamente las células proliferadas al hacer pasar un refrigerante a través de los elementos de intercambio térmico.

Los diferentes aspectos de la invención se describen con más detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras, en las que:

La figura 1 es una vista de la sección transversal de una realización de una cámara de acuerdo con la invención;

Las figuras 2A y 2B son imágenes de contraste de fases del componente biológico;

La figura 3A es una vista de la sección transversal de un BAL en la posición vertical (la de uso general);

La figura 3B es una vista de la sección transversal de un BAL en la posición horizontal (para pcrioconservación); y

La figura 4 muestra un BAL en un circuito para el uso en línea.

Descripción detallada

La invención da a conocer una cámara «funcionalmente modular» en la que se pueden alojar y manipular las células epiteliales, p. ej., hepatocitos, a lo largo de varias etapas de «desarrollo/ciclo de vida». Así pues, por ejemplo, los hepatocitos se pueden, de forma seriada:

- Cultivar para que sean de buena calidad;
- Crioconservar; y
- Utilizar

en la misma cámara, por ejemplo, mediante el cambio de las «soluciones» y la alteración de las «condiciones».

Así pues, por ejemplo, un componente biológico, tal como perlas de alginato que contienen hepatocitos, se pueden preparar y administrar en la cámara «funcionalmente modular», en la que:

- Tiene lugar la proliferación inicial para dar una masa celular óptima que es de buena calidad;
- Puede producirse la crioconservación posterior, y luego se transportan a un paciente enfermo, y después de la descongelación,
- Las células se pueden perfundir, en línea, en la misma cámara en un circuito extracorporal unido al paciente.

Así pues, mientras que la cámara (apartado 1.0) es fundamental para la invención, también se necesita un componente biológico (apartado 2.0) para formar un dispositivo de hígado bioartificial (apartado 3.0) que se puede utilizar para perfundir a un paciente (apartado 4.0).

Para llevar a cabo el sistema, era independientemente necesario desarrollar métodos escalables para:

- Fabricar el componente biológico (apartado 5.0),
- Proliferar las células (apartado 6.0), y
- Crioconservarlas (apartado 7.0).

5 Cada uno de estos aspectos se describe a continuación con más detalle:

Además, y a una escala más pequeña, el desarrollo de hepatocitos humanos encapsulados en alginato que expresan una gran cantidad de enzimas que metabolizan fármacos específicas de los hepatocitos, opcionalmente preparados en una forma transportable y crioconservada, ofrece una herramienta valiosa para los estudios del metabolismo de los fármacos y de la hepatotoxicidad.

10 1.0 Cámara vacía

En relación con la figura 1, la cámara (10) es por lo general de forma cilíndrica y tiene un diámetro (d), una altura (h) y una capacidad o volumen (v) apropiados para su función de perfusión hepática. Típicamente, este volumen será de 1 a 10 l, más preferiblemente de 1 a 5 l.

15 Está fabricada de un material que se puede esterilizar (p. ej., mediante autoclave a 121 °C a 1 bar), que resiste la temperatura de crioconservación (−160 °C) y que puede también resistir el cambio de temperatura rápido asociado a estos procedimientos. Adicionalmente, el material debe ser compatible con la presencia de esos materiales biológicos y soluciones que contendrán, p. ej., sangre, plasma, disolución salina, crioconservantes, medio de cultivo, etc.

20 Es una unidad sellable que comprende un alojamiento con una pared cilíndrica (36) contenido por las placas superior e inferior (12, 14). Como, en al menos un modo de operación, funciona como un lecho fluidizado, comprende una entrada de fluidización (16) en la placa inferior (14) y una salida de fluidización (18) en la placa superior (12). Estas entradas/salidas se pueden utilizar para introducir soluciones que incluyen: medio de cultivo, plasma y crioconservantes. Un soporte del lecho fluido (20) que comprende una gran cantidad de agujeros colocados en orden (22), que ayudan a controlar la fluidización, se mantiene en su sitio mediante una junta tórica (24)

25 que se sujeta mediante un anillo de alambre (28). El filtro sirve para atrapar las perlas de alginato (120, figura 2) dentro de la cámara durante todas las etapas de la fluidización y uso.

30 La cámara comprende adicionalmente un sistema de transporte de fluido (30) que se introduce en la cámara por la entrada (32) justo por encima del soporte del lecho fluido (20) y abandona la cámara por la salida (34) hacia la placa superior (12). El sistema de transporte de fluido toma la forma de un tubo que se dispone preferiblemente de forma helicoidal y, con un patrón regular, alrededor de la pared interna (36) del cilindro, aunque se pueden realizar otras configuraciones. El tubo, que es semipermeable a los gases, facilitará el intercambio de gases (su función principal) al componente biológico fluidizado (100) (no se muestra por claridad). Se puede fabricar de silicona o de cualquier otro material adecuado, p. ej., polímeros que son permeables a los gases, que no son tóxicos y que pueden resistir

35 las temperaturas que se experimentarán durante la operación. El material también debe mostrar un cierto grado de flexibilidad, de tal forma que el tubo pueda absorber la expansión que se produce cuando se congela el contenido de la cámara. El sistema de transporte de fluido puede actuar adicionalmente como un intercambio térmico a medida que los fluidos (líquidos o gases) se bombean a través de él.

40 Finalmente, la cámara comprende una o una gran cantidad de elementos de intercambio térmico (38) que en una realización descienden a través de la placa superior (12) y penetran en la cámara justo por encima del soporte del lecho fluidizado (20). Estos elementos se organizan para estar sustancialmente perpendiculares a las placas (12, 14) y se disponen con un patrón regular (que se distribuye sustancialmente de forma uniforme) dentro de al menos una parte del volumen de la cámara, para aumentar al máximo la congelación y la descongelación uniforme y eficaz, al mismo tiempo que se disminuye al mínimo su efecto sobre la fluidización. Para este fin, en una realización preferida,

45 los elementos de intercambio térmico (que en una realización comprenden varillas huecas hechas de, o revestidas con, titanio y aleaciones del mismo para aumentar al máximo el intercambio térmico) se disponen a lo largo de una longitud (h) de la cámara, de tal manera que cuando la cámara se coloca de forma horizontal (figura 3b) (a diferencia de su posición vertical para la fluidización (figura 3a)), es capaz de enfriar o calentar con eficacia el componente biológico que se distribuye favorablemente desde una perspectiva de transferencia de masa. Es importante que los

50 materiales no sean tóxicos para el componente biológico y no se corroan por, p. ej., la presencia de disolución salina.

En una organización alternativa, una o una gran cantidad de elementos de intercambio térmico (38) pueden atravesar directamente las placas superior e inferior siguiendo una línea recta. Dicha organización puede simplificar el bombeo o el empuje de un fluido refrigerante a través de los tubos. De hecho, en tal realización, los tubos pueden tener extremos con forma de embudo.

55 Tal y como se ha insinuado anteriormente con referencia a los elementos de intercambio térmico (38) y al sistema de

transporte de fluido (30), la «aplicación a gran escala» trae consigo el problema de garantizar el suministro de, p. ej., oxígeno y nutrientes, a las células y el intercambio de, p. ej., proteínas, desde las células a, p. ej., la sangre o el plasma. De acuerdo con esto, para ayudar al intercambio, se prefiere que el cilindro tenga una proporción de aspecto (a), $a = h/d$, de 10:1 a 1,3:1 y una capacidad (v) entre 1 y 10 l.

- 5 Aunque esté destinado a albergar líneas de hepatocitos humanos en este caso, este diseño es genérico para la proliferación de células epiteliales de mamífero y sería aplicable a otras necesidades de biomasa. Para obtener más detalles sobre el componente biológico favorito, véase el apartado 2.0.

La oxigenación puede proporcionarse de diversas maneras, que incluyen el simple intercambio de gases a través de membranas permeables a los gases, oxigenadores de fibra hueca y/o con mezclas de perfluorocarburos con una elevada capacidad de saturación de oxígeno.

2.0 Componente biológico

En relación con las figuras 2A y 2B, el componente biológico (100) comprende una gran cantidad de células (110) encapsuladas en perlas de alginato (120) de aproximadamente 400 μm de diámetro. Las perlas de alginato también comprenden una gran cantidad de modificadores de la densidad (130) en forma de perlas de vidrio.

- 15 Cada una de las células está encapsulada para conseguir aproximadamente 18 a 25 millones de células por mililitro de perlas de buena calidad.

Este sistema de encapsulación 3-D en alginato puede, por supuesto, utilizarse para que proliferen cualquier línea de células epiteliales, por lo que aunque emerjan líneas celulares funcionalmente mejores, la tecnología será igualmente eficaz. El desarrollo de líneas de células humanas alternativas que proliferan, y que muestran un fenotipo de hepatocito, incluye líneas celulares de hepatocitos diferenciadas a partir de células madre embrionarias o de sangre de cordón umbilical.

3.0 Dispositivo de hígado bioartificial (BAL)

El dispositivo de BAL se ilustra con más detalle en las figuras 3A y 3B. Cuando la cámara (10) se llena con el componente biológico (100), se convierte, o al menos tiene la posibilidad de convertirse, en un hígado bioartificial (200) que puede utilizarse en un circuito de perfusión extracorporeal (50).

Para funcionar como un hígado bioartificial (200), la cámara (10) debe comprender un volumen (v) que está relleno con suficiente componente biológico (100) y una solución adecuada (40), p. ej., plasma, para funcionar esencialmente, pero de forma temporal, como un hígado (a saber, ajustarse al propósito). Con esta finalidad, ya que la cámara funciona como un lecho fluidizado, el componente biológico se fluidificará y, por lo tanto, la capacidad de la cámara debe tener un volumen de aproximadamente 1,2 a 2 veces el volumen de perlas añadido.

Obviamente, el volumen de las perlas dependerá de la funcionalidad de los hepatocitos encapsulados dentro de las perlas. Un hígado humano puede funcionar a aproximadamente el 15%, y el BAL se ha modelado para que proporcione una función del 30% (dos veces el requisito mínimo).

Así pues, deberá comprender esferoides de células de buena calidad en perlas de alginato al 1-2%, de una densidad que permitirá la fluidización en el plasma humano. Los esferoides de células de buena calidad tendrán que cultivarse durante 8 a 12 días y contendrán cualquier valor de 18 a 60 millones de células por mililitro de perlas.

Para conseguirlo, una producción de aproximadamente 1000 millones de células (1×10^9) se utilizará para inocular cada 500 a 666 ml de perlas de alginato, y múltiplos de las mismas, de tal manera que la cámara contendrá entre 3×10^{10} y 1×10^{11} células de buena calidad.

Las perlas de alginato (120) tendrán un diámetro medio entre 300 y 1200 μm , preferiblemente 400 μm , y contendrá adicionalmente perlas de vidrio (130) con un diámetro medio entre 10 y 50 μm en una cantidad suficiente para controlar la densidad para la fluidización hasta dos veces el volumen del lecho. El componente biológico (100) se proporcionará en una solución adecuada (40), bien sea medio de cultivo (durante la proliferación), fluido isotónico (antes del uso), plasma (antes y durante la perfusión) o crioprotector (después de la proliferación, cuando están en conservación) según la fase del uso.

En uso, la cámara inicialmente se fluidificará a una velocidad de flujo entre 50 ml/min y 1200 ml/min para conseguir una expansión del lecho de 1,2 a 2 veces.

Sin embargo, moverse desde el uso de líneas celulares a una escala de laboratorio (70 ml o menos) al desarrollo de un hígado bioartificial trae consigo nuevos retos, entre ellos la necesidad de desarrollar métodos escalables y un conocimiento de la manera en que los materiales biológicos funcionarán en los volúmenes que será necesario utilizar para la perfusión hepática de los sujetos humanos. Requiere la experiencia multidisciplinaria de la ingeniería mecánica, modelado matemático, ingeniería bioquímica, ciencia de materiales, física teórica, así como experiencia médica.

Resulta significativo que el solicitante haya podido demostrar ahora, a una escala de hasta 200 ml, que este diseño de la cámara de lecho fluidizado de un dispositivo de BAL, que utiliza esferoides 3-D de líneas celulares procedentes de hígado humano, puede conseguir un funcionamiento metabólico comparable al encontrado *in vivo* y en los hepatocitos primarios.

5 Por ejemplo, la toma de muestras del reservorio del medio de cultivo mediante la recogida de muestras de 1 ml y su análisis ha demostrado:

- un consumo de glucosa de 4,98 μmol de glucosa/millones de células y día;
- una síntesis de proteínas similar (a la de un hígado humano);
- 10 • secreción de albúmina que muestra valores del mismo orden de magnitud que los encontrados *in vivo*, a saber, 12 g/10¹² hepatocitos al día; y (utilizando sondas de oxígeno que miden el oxígeno disuelto)
- un consumo de oxígeno de aproximadamente 19 μmol de O/min y mg de proteínas.

Resulta manifiesto que cualquier hígado artificial debe ser capaz de fabricarse y distribuirse con eficacia y con seguridad, mediante el uso de procedimientos que satisfacen los requisitos de las GMP.

15 El solicitante ha desarrollado adicionalmente un medio para almacenar perlas de buena calidad incluso durante 3 días a temperatura y presión ambientales a una proporción de perlas por medio de alta a media mediante la utilización de perfluorodecalina saturada con oxígeno (un transportador de oxígeno con una saturación mucho más elevada que la solución acuosa).

20 Esto es importante ya que permitiría que los fabricantes «descongelen» un dispositivo que contiene células de buena calidad y remitirlo directamente a un usuario (que no necesitaría descongelar el dispositivo en el momento de usarlo), lo que facilita su uso y lo hace menos propenso a errores de manipulación.

Algunos de los retos encarados, y de las soluciones independientes que se identificaron, se presentan en los apartados 5.0 a 7.0, pero primero se describe el uso del BAL:

4.0 Modificación para que el paciente lo use en línea

25 La fase final del tratamiento comprenderá la conexión del dispositivo de hígado bioartificial (200) (cámara (10) que contiene las células proliferadas (100)) en un circuito (50) de tal manera que se perfunde con plasma humano (40).

Así pues, en uso, el BAL (200) se conectará a un paciente de tal manera que el plasma (40) accede a la cámara (10), por ejemplo, por la entrada (16) y la abandona, por ejemplo, por la salida (18).

30 En relación con la figura 4, o bien se perfunde la sangre completa en un circuito (50), o bien se retira la sangre de un paciente (68) y el plasma (40) se separa de las células sanguíneas y se pasa a través de un circuito (50) y a través del BAL (200) antes de volverse a incorporar a las células sanguíneas y regresar al paciente. Típicamente, pero no imprescindiblemente, la sangre pasará a través de un monitor de la tensión arterial (52), se separa el plasma y se impulsa por bombeo (54) al BAL (200) mediante una bomba con heparina (56) y un monitor de la presión del flujo de entrada de la perfusión (58). En el BAL, el plasma recibe un tratamiento que permite el intercambio de, p. ej., toxinas desde el plasma a las células (110) y proteínas desde las células al plasma. Al abandonar el BAL, el plasma pasa a 35 través de un cartucho de retirada de ADN (60), se vuelve a incorporar a las células sanguíneas a través de un monitor de la presión venosa (62), trampa de aire (64) y detector de aire (66) antes de devolverlo al paciente.

Preferiblemente, el cartucho de retirada de ADN comprende fibras huecas microporosas con poros de 1 μm para conseguir un valor discriminatorio para la masa molecular de 2 millones de dalton.

40 El cartucho también deberá contener un casete de fijación al ADN que comprende la inmovilización de la enzima desoxirribonucleasa I para escindir el ADN en di- y trinucleótidos.

En uso, el dispositivo se fluidifica hasta una altura del doble del lecho en presencia de plasma humano como parte del circuito extracorporeal (50) que permitirá que la cámara funcione como una biomasa clínicamente útil.

Un hígado normal contiene aproximadamente 1-2 x 10¹¹ hepatocitos y se necesita aproximadamente el 15% de la masa de un hígado normal (1,5-3,0 x 10¹⁰) para mantener vivos a los individuos que, por lo demás, están bien.

45 De acuerdo con esto, el sistema del solicitante se ha desarrollado con el fin de proporcionar el 30% de la masa celular de un hígado normal. Esta masa celular debe estar contenida en un sistema de perfusión práctico con unos parámetros de difusión que permitan, p. ej., el acceso adecuado del oxígeno y de los nutrientes durante la fase de proliferación inicial, y que permite la salida de toxinas, y metabolitos, en productos desintoxicados, y de proteínas desde las células para regresar a un paciente durante el uso en línea en la perfusión extracorporeal. En este sentido, 50 el sistema del solicitante se beneficia del uso de perlas de gel de alginato sin revestir que disminuyen al mínimo las barreras de la difusión. También comprende una geometría adecuada para el uso en una circulación extracorporeal

humana, al permitir que contenga una cantidad adecuada de células en un volumen que se puede perfundir con facilidad en un dispositivo para uso humano. Si fuera necesario, se puede utilizar más de una cámara en paralelo.

- 5 El torrente circulatorio a través de la vena porta es de 1200 ml/min en el hombre y, por lo tanto, lo ideal es que el plasma deba circular a través de la cámara a una velocidad de flujo equiparable a la de las condiciones *in vivo* para la posología del tratamiento. Los trabajos anteriores han indicado que, para esta etapa, puede ser adecuada una velocidad de flujo de 400 ml/min, por lo que se puede utilizar cualquier velocidad de flujo que vaya de 50 a 1200 ml/min.

5.0 Fabricación del componente biológico

5.1 A escala de laboratorio

- 10 A escala de laboratorio, el solicitante empleó una técnica que utilizaba la vibración para ocasionar la formación de gotículas de la suspensión de células y alginato. Teóricamente, podría haberse utilizado una máquina con varias boquillas basadas en el mismo principio para conseguir la aplicación necesaria a gran escala, pero tal método también amplificaría los problemas inherentes de esta tecnología, que incluyen el bloqueo de la boquilla y una corriente inestable.
- 15 Para vencer estos problemas, el solicitante ha desarrollado una metodología escalable que se describe a continuación:

5.2 A gran escala

- 20 El solicitante ha llevado a cabo comprobaciones preliminares con una nueva tecnología (una tecnología de disco en rotación) con resultados esperanzadores. Se han podido producir perlas (en condiciones estériles) de un tamaño adecuado (300-5000 μm), y, sorprendentemente, la presión requerida (2-25 psi) no ha resultado ser perjudicial para la viabilidad celular.

Para optimizar un productor de gotículas por corte del chorro construido a medida para la escala necesaria para el uso clínico (que se estima que se basa en una función hepática del 30% - 1,5-5 l de perlas de alginato), se determinó que las siguientes condiciones eran las preferidas:

- 25
- Velocidad de agitación: de 50 a 200 rpm,
 - Presión/inyección de la corriente: de 2 a 15 psi;
 - Velocidad de flujo: de 15 a 30 ml/min;
 - Velocidad de corte: de 3000 a 4000 rpm con de 60 a 100 discos de alambre; y
 - Tamaño de la boquilla: 350 μm (intervalo de 250 μm a 450 μm) y de forma circular.
- 30 El alginato se inoculó con 0,5 a 3 millones de células por mililitro de medio con alginato y se densificó con partículas de vidrio de un diámetro de 10 a 50 μm en una cantidad de 1-5% p/v que conseguirá que estén en suspensión continuamente cuando se perfunden en el plasma humano.

Las perlas se polimerizaron durante 10 a 60 minutos en una solución de cloruro de calcio que contiene uno o más tensioactivos tales como ácido plúronico u otros equivalentes farmacéuticamente aceptables.

- 35 Además, se estableció un método para mantener una concentración de cloruro de calcio de 0,17M durante todo el periodo de producción para garantizar la polimerización adecuada de alginato, sin comprometer la viabilidad celular. El solicitante ha encontrado que cuando se encapsula un gran volumen de alginato, se produce la dilución de los iones de calcio, lo que conduce a una caída en la calidad de las perlas producidas con el tiempo. Para superar este problema se utiliza una solución concentrada de cloruro de calcio (70% p/v de CaCl_2 en NaCl a 0,15 M) para
- 40 suministrar un aporte extra iones de calcio que mantengan la concentración durante la encapsulación. Adicionalmente, un desbordamiento en el baño garantiza que el volumen total de la solución de calcio y de las perlas del baño permanece constante.

El medio de cultivo se utilizó para equilibrar las perlas antes de introducirlas en la cámara del biorreactor multifuncional.

- 45 A continuación se presentan más detalles de la metodología:

5.2.1 Encapsulación de células HepG2 en alginato mediante un sistema JetCutter de GeniaLab

La unidad JetCutter se colocó en una campana de clase 2. Comprendía un recipiente de presión que albergaba el material a encapsular, cuyo material se fuerza con presión para que pase a través de la boquilla hacia una herramienta de corte, impulsada por un motor, en donde se corta y el material resultante se dirige a un baño de

recogida donde el material se polimeriza.

El material puede fabricarse como sigue:

- 5 1) En un vaso de precipitados de vidrio o de propileno de 1 a 5 l, con un agitador magnético, las células HepG2 u otras células adecuadas se añaden a una mezcla de 1:1 de medio de cultivo α -MEM y el 2% de alginato a la densidad de inoculación necesaria ($0,5$ a $3,0 \times 10^6$ células/ml);
- 2) se añaden del 2% al 5% p/v de perlas de vidrio de 10 a 50 μm , y la mezcla se agita hasta la homogeneidad con el agitador magnético;
- 3) Se retira un tapón de llenado, sobre la tapa del recipiente de presión, y con un embudo se añade la mezcla para la encapsulación;
- 10 4) El tapón se vuelve a colocar inmediatamente, y comienza a funcionar un motor agitador a una velocidad adecuada para mantener una suspensión uniforme de células, perlas de vidrio y medio de cultivo en alginato; típicamente se puede utilizar una velocidad de 50 a 200 rpm;
- 5) Para aplicar presión se utiliza una tubería de aire comprimido (comienza a alrededor de 0,25 bar). La espita sobre la salida del recipiente de presión se abre para que comience a fluir a través del encapsulador;
- 15 6) La corriente resultante se recoge en un cilindro de 25 ml durante 45 s para medir la velocidad de flujo.
- 7) La presión del aire en la entrada se ajusta hasta la velocidad de flujo sea de 0,33 a 0,35 ml/s;
- 8) El JetCutter se prepara para cortar la corriente. Los parámetros de funcionamiento típicos incluirán: velocidad de flujo = 0,33 ml/s, tamaño de la boquilla = 350 μm , número de alambres = 60, diámetro del alambre = 100 μm , velocidad del motor = 3600 rpm;
- 20 9) El programa de JetCutter calculará el ángulo de inclinación óptimo (típicamente de 16 a 22 grados, más en particular de 18 a 20 grados), que luego se puede fijar de forma manual en el propio JetCutter;
- 10) El recipiente de recogida para las perlas puede ser una cuba con un tubo de desbordamiento unido al lateral de la cuba, y un filtro de malla de 200 μm . Este tubo de desbordamiento se debe colocar en una botella para recoger la solución residual de cloruro de calcio desde el baño, asegurándose de que la botella de recogida de residuos está colocada por debajo del recipiente de recogida para permitir que el líquido fluya por gravedad. La salida del tubo de alimentación y purga se une al lateral de la cubeta, de modo que sobresale por encima del borde unos aproximadamente 2 cm. Esto permite que la solución de cloruro de calcio concentrada gotee en el borde del baño. El tubo de alimentación y purga se conecta entonces al canal uno de, por ejemplo, la bomba 520DU/N de Watson Marlow que lleva unida una cabeza de bomba multicanal C305A. Finalmente, se coloca la salida en una botella que contiene una solución concentrada de cloruro de calcio en NaCl a 0,15 M (la concentración recomendada de CaCl_2 es del 70%). La velocidad de la bomba se fija de acuerdo con la velocidad de flujo utilizada en el JetCutter.
- 25 30 11) Se recogen las perlas en el tampón de polimerización.

5.2.2 Recogida y lavado de las perlas acabadas

- 35 1) Transferir el filtro al interior de un recipiente estéril de 1 a 5 l,
- 2) Enjuagar las perlas, que permanecen en la superficie de la malla, con DMEM (3 veces con 500 ml de medio durante 5 minutos cada uno por 400 ml de perlas) antes de añadir el DMEM hasta que las perlas queden cubiertas;
- 3) Utilizar una cuchara de pesada para transferir las perlas a un recipiente graduado y estéril, resuspender en el medio de cultivo α -MEM y dejar que se asienten las perlas;
- 40 4) Repetir este proceso hasta que se hayan procesado todas las perlas de la cubeta;
- 5) Una vez que las perlas se han sedimentado, se estima el volumen de perlas recogidas según la graduación que hay en el lateral del recipiente.

6.0 Metodología para la proliferación celular (escalable hasta 250 ml)

45 6.1 A escala de laboratorio

El solicitante ha demostrado con anterioridad que el valor de un «sistema de cultivo de células en rotación con microgravedad» es ventajoso para la etapa de proliferación.

Ahora han determinado que un biorreactor de lecho fluidizado, en el cual las células en alginato se mantienen en

una «suspensión» continua en el fluido, también se puede utilizar para conseguir la misma buena calidad de la biomasa. Tal procedimiento es escalable y tiene ventajas con respecto al método a escala de laboratorio anteriormente descrito.

6.2 A gran escala

- 5 El solicitante ha mostrado un método escalable con 400 ml de perlas, que es compatible con el sistema «modular» de la invención. Esto se describe con más detalle a continuación:

6.2.1 Etapas de proliferación inicial para la buena calidad

1. El dispositivo (200) se llena con el medio de cultivo (40) hasta el nivel del filtro (26) mediante una bomba peristáltica que administra el medio a éste;
- 10 2. Las células encapsuladas (100) se introducen en la cámara (10) a través de una toma de llenado (no se muestra) en la placa superior (12);
3. El volumen restante (v) de la cámara se llena completamente con el medio de cultivo (40);
4. El BAL (200) se conecta en el circuito independiente (no se muestra) que suministra el medio (40) mediante una bomba peristáltica desde el reservorio de, por ejemplo, un biorreactor Celligen Plus (New Brunswick Scientific) y se devuelve al mismo reservorio a través de una sonda de oxígeno disuelto en serie;
- 15 5. La velocidad de flujo utilizada es tal que se consigue una expansión de 1,2 a 2 veces del lecho empacado de perlas de alginato (100);
6. Un controlador automático del biorreactor vigila y controla la temperatura, la velocidad de agitación, el pH y el oxígeno disuelto en el reservorio del medio de cultivo. Esto permite escoger los puntos que garantizarán que el medio introducido al biorreactor de lecho fluidizado sea óptimo para el crecimiento de las células encapsuladas;
- 20 7. Aproximadamente el 50% del volumen del medio de cultivo en el circuito se reemplaza tras las primeras 48-72 horas del cultivo según la densidad celular y desde entonces cada 24 a 48 horas. También está disponible un sistema de alimentación y purga para un control más sutil.
- 25 8. Inmediatamente antes de que el medio en contacto con las perlas que reciclan el lactato proporcione piruvato (una fuente de energía) y oxígeno a las perlas, se introducirá un casete de enzimas inmovilizadas en contacto directo con la vía del flujo. Las enzimas a utilizar incluirán, pero sin limitarse a ellas, lactato oxidasa y catalasa.

30 Durante la proliferación, la actividad del citocromo P450 se puede mejorar mediante el cultivo con un inductor, tal como, por ejemplo, dibenzantraceno (en, p. ej., 6 µm) durante un periodo de tiempo de p. ej., 24-72 horas. Esto puede aumentar significativamente la cantidad de citocromo P450 durante una serie de días después de la inducción (que permanece sosteniblemente una vez que se retira el inductor) y puede, además, en una exposición posterior, dar lugar a otro aumento.

35 Las células encapsuladas en alginato (100) se pueden retirar de la cámara (10) durante la proliferación y típicamente se mantienen durante 8 a 12 días para que las células encapsuladas alcancen la buena calidad.

7.0 Crioconservación

7.1 A escala de laboratorio

40 El solicitante ha mostrado a pequeña escala que se pueden crioconservar las líneas de hepatocitos encapsulados en alginato, que recuperan su funcionamiento con rapidez al descongelarlas y que mantienen su funcionamiento estable durante un periodo de tiempo adecuado para el uso (Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, Hodgson H, Selden C. «Human hepatocyt cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function». *Journal of Hepatology* 2001; 34: 68-77).

7.2 A gran escala

45 La transferencia térmica durante la crioconservación se conseguirá con vapor de nitrógeno líquido bien mediante congelación a una velocidad controlada o mediante vitrificación. La descongelación se conseguirá de igual forma con gas caliente estéril y además líquido caliente bombeado por el recipiente.

Crioconservación a -160 °C

50 Como la adición de crioprotector a las células es un proceso exotérmico, hay que enfriar la masa con anterioridad a la adición del crioprotector; sin embargo, una vez que el crioprotector ha sustituido a los componentes acuosos, todo

el sistema se debe enfriar rápidamente bien a una velocidad controlada de -1 a -4 °C/min, o bien mediante inmersión en nitrógeno líquido a -190 °C; después de un tiempo para el equilibrio, se debe transferir a una fase de vapor de nitrógeno líquido a -160 °C.

- 5 Las perlas que contienen los esferoides funcionales se enfriarán a 0 °C, se expondrán a los crioprotectores, luego se enfriarán mediante una combinación de líquido enfriado y nitrógeno líquido para conseguir una congelación con una velocidad controlada hasta aproximadamente -160 °C, en la que se conservarán hasta que se las necesite. La primera etapa se realizará en posición vertical, y la última etapa en posición horizontal.

- 10 El crioprotector enfriado con anterioridad sustituirá (en la posición vertical, figura 3A) a los componentes acuosos del sistema completo antes del enfriamiento rápido a una velocidad controlada (de -1 a -4 °C/min) hasta -160 °C. Tras un periodo de equilibrado, se transferirá a una fase de vapor de nitrógeno líquido para la congelación rápida. Esto se efectúa con la cámara en la posición horizontal (figura 3B). Esto permitirá la distribución de las perlas (100) a lo largo (h) de toda la cámara, lo que reduce la longitud del recorrido a través del cual se produce el descenso de la temperatura. El nitrógeno líquido para enfriamiento se distribuirá a través de tubos de titanio/aleación (38) dispuestos a un lado de la cámara.

- 15 Descongelación rápida y reestablecimiento de 37 °C y recuperación del funcionamiento completo

El flujo de aire caliente y luego de líquido caliente (\pm calentamiento en microondas) hará subir inicialmente la temperatura a -7 °C, después a 1 °C cuando los crioprotectores se retiren mediante el reemplazo del medio de perlas por el medio de cultivo. A continuación, el calentamiento lento a 37 °C, seguido de la perfusión con un medio rico en oxígeno y nutrientes, restaurará la actividad completa durante 24-48 horas.

- 20 El procedimiento de descongelación debe devolver las perlas a 37 °C sin la formación de cristales de hielo y debe permitir la retirada rápida del crioprotector a <4 °C, y su reemplazo por un medio de cultivo nuevo inicialmente a 4 °C, antes de la posterior adición de medio nuevo a 37 °C que calentará la cámara a 37 °C con rapidez.

- 25 Al igual que será necesario retirar el crioprotector, se hará necesaria una reoxigenación rápida; para conseguir esto se utilizarán tubos permeables al gas (30) (los mismos tubos pueden permitir la expansión de los líquidos a medida que se congelan). Además, se dispersará una solución de perfluorocarburo saturada con oxígeno por toda la cámara.

8.0 Resumen de una estrategia funcionalmente modular

Hay una serie de etapas diferentes implicadas en que se llegue a un producto final; siendo éste una cámara de células a la cual se puede unir la circulación del paciente, y que tal cámara se pueda colocar al lado de la cama del paciente enfermo. Estas etapas son:

- 30
- La preparación de las células (de 10^{10} a 5×10^{10} para un BAL completo que puede contener más de una cámara) mediante un cultivo en monocapa a gran escala;
 - Recogida en suspensión de las células del cultivo en monocapa;
 - Mezcla de las células con el alginato;
- 35
- «Encapsulación de cada una de las células» (aproximadamente de 60 a 100 por perla) en gotículas de alginato (aproximadamente de 100 a 200 millones por cámara);
 - Mantenimiento de las gotículas de alginato en cultivo, durante ocho a doce días, tiempo durante el cual los hepatocitos proliferan como esferoides cohesionados para proporcionar una biomasa de buena calidad;
- 40
- Crioconservación de la biomasa de esferoides: las células de buena calidad en las perlas deben estar disponibles para el uso en un paciente en menos de 48 horas desde la hospitalización. Por lo tanto, la biomasa se debe crioconservar y almacenar a -160 °C hasta que se las necesite;
 - Descongelación de la biomasa de esferoides: la biomasa se debe descongelar y regenerar rápidamente para ofrecer el funcionamiento completo a las 24 o 48 h de una petición.

La estrategia secuencial e integrada descrita puede dar lugar a un dispositivo y a una metodología que pueden beneficiar a los pacientes.

REIVINDICACIONES

1. Cámara (10) para el componente biológico (100) de un hígado bioartificial (200), caracterizado por que comprende un soporte de lecho fluidizado (20) que comprende una placa que está dotada de una gran cantidad de agujeros espaciados que permiten la fluidización controlada del lecho, una entrada de fluidización (16) y una salida de fluidización (18) y que está configurada para permitir:
 - 5 • La proliferación del componente biológico, *in situ*, mediante la entrada de fluidización (16) y la salida de fluidización (18)
 - La criopreservación del componente biológico, *in situ*, gracias a uno de una gran cantidad de elementos de intercambio térmico (38) dispuestos en la cámara y
 - 10 • La perfusión del componente biológico, *in situ*, mediante la entrada de fluidización (16) y la salida de fluidización (18).
2. Cámara de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una unidad sellable de construcción tubular que comprende un alojamiento cilíndrico con pared (36) que se puede cerrar mediante las placas superior (12) e inferior (14).
- 15 3. Cámara de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene un volumen de trabajo (v) de 1 a 10 litros, y tiene una proporción de aspecto (a), $a = h/d$, en donde h = altura y d = diámetro, del orden de 10:1 a 1,3:1.
4. Cámara de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una malla filtrante (26).
5. Cámara de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un sistema de transporte de fluido (30) que tiene una entrada (32), una salida (34) y un tubo que es semipermeable a los gases.
- 20 6. Cámara de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el sistema de transporte de fluido (30) está dispuesto de forma helicoidal alrededor del interior de la cámara.
7. Cámara de acuerdo con la reivindicación 2, en donde uno o una gran cantidad de elementos de intercambio térmico (38) atraviesan la placa superior (12) y entran en la cámara justo encima del soporte del lecho fluidizado (20).
- 25 8. Cámara de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una o una gran cantidad de elementos de intercambio térmico (38) están dispuestos a lo largo de una longitud (h) de la cámara.
9. Cámara de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los elementos de intercambio térmico (38) están dispuestos esencialmente perpendiculares a las placas superior (12) e inferior (14).
10. Dispositivo de hígado bioartificial (200), que comprende una cámara (10) de acuerdo con cualquiera de las
- 30 reivindicaciones 1 a 9 rellena con un componente biológico (100).
11. Dispositivo de hígado bioartificial (200) de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el componente biológico (100) comprende un agente formador de matriz (120) que comprende una gran cantidad de células (110) y uno o más modificadores de la densidad (130).
12. Dispositivo de hígado bioartificial (200) de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el dispositivo
- 35 comprende entre 3×10^{10} y 1×10^{11} hepatocitos de buena calidad.
13. Dispositivo de hígado bioartificial (200) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en donde el agente formador de matriz comprende perlas de alginato con un diámetro de 300 a 1200 μm y el modificador de la densidad comprende perlas de vidrio con un diámetro medio de 10 a 50 μm .
14. Procedimiento de perfusión de sangre o plasma que imita un hígado en los estudios de metabolismo de fármacos y de hepatotoxicidad, que comprende la etapa de introducción de plasma o de sangre en un dispositivo de hígado bioartificial de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, de tal forma que penetra en la cámara (10) a través de la entrada (16) y la abandona a través de la salida (18).
- 40 15. Procedimiento para la criopreservación de células proliferadas en una cámara de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende:
 - 45 i. El intercambio del crioprotector con las células proliferadas en la cámara;
 - ii. La disposición en horizontal de la cámara para permitir la distribución de las células proliferadas a lo largo de la longitud (h) de la cámara; y
 - iii. El enfriamiento rápido de las células proliferadas al hacer pasar un refrigerante por los elementos de intercambio térmico.

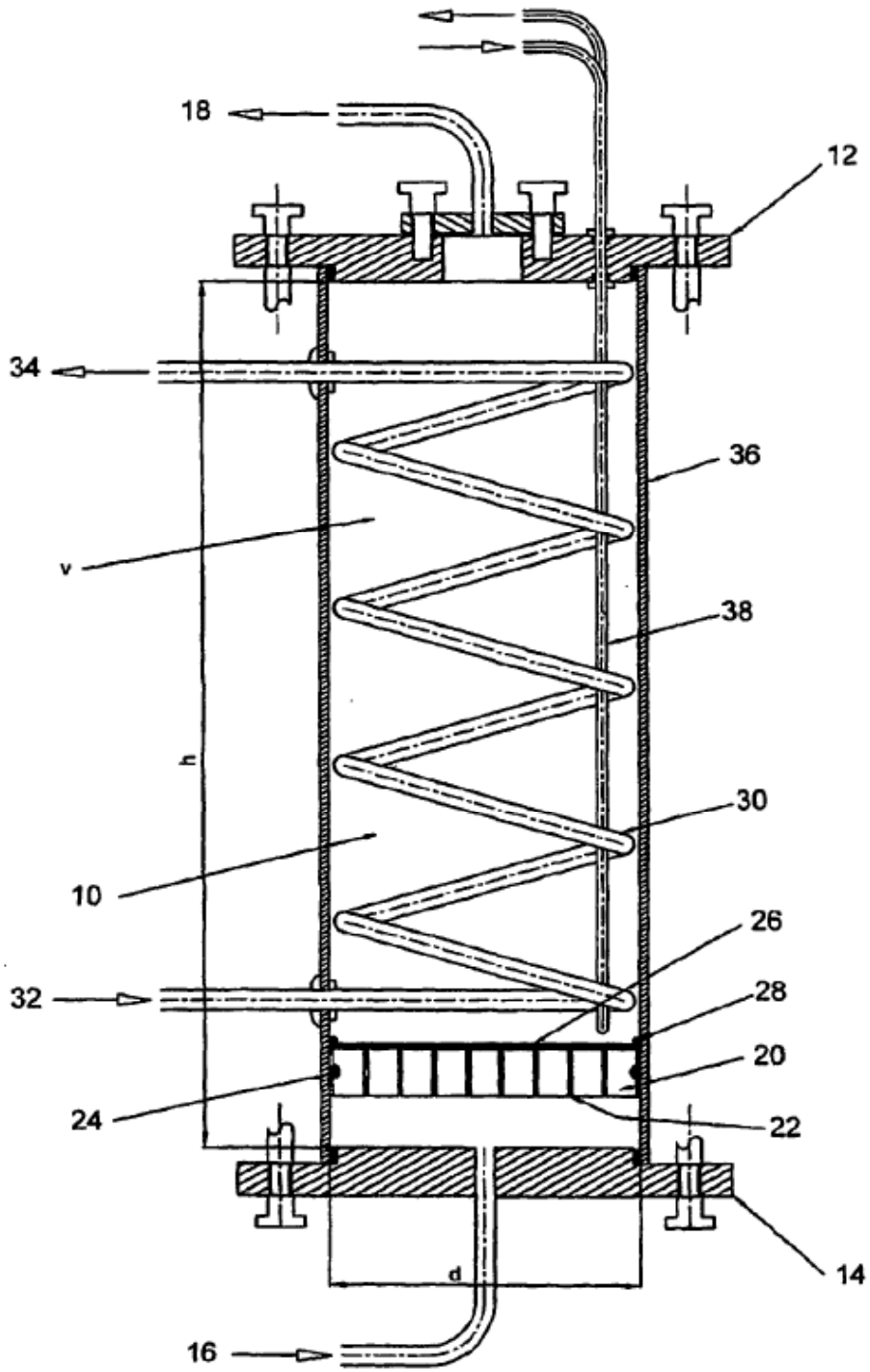


Fig. 1

FIG 2A

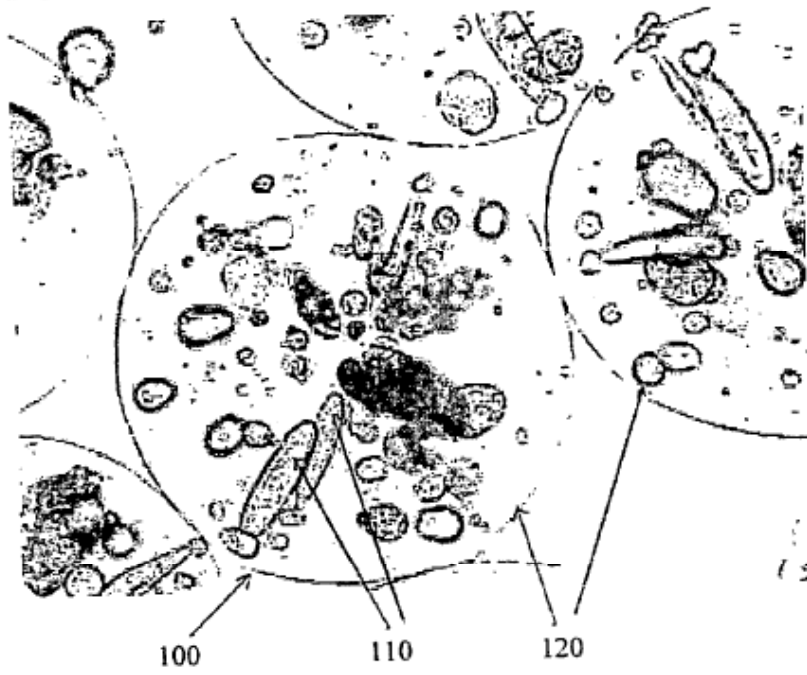
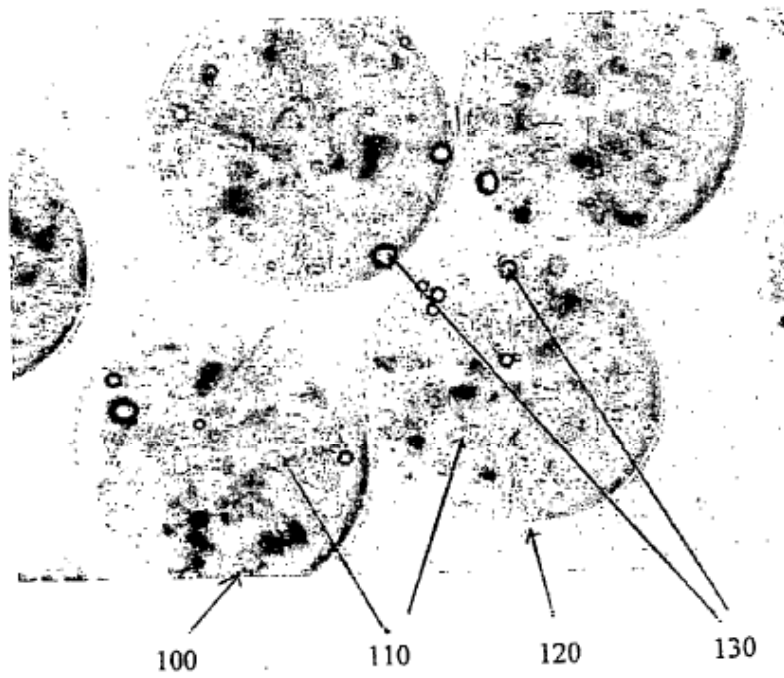


FIG 2B



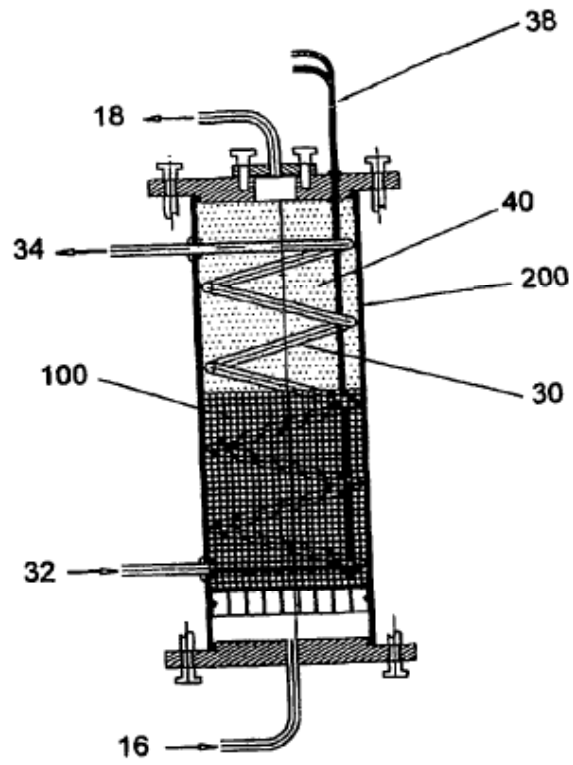


Fig. 3a

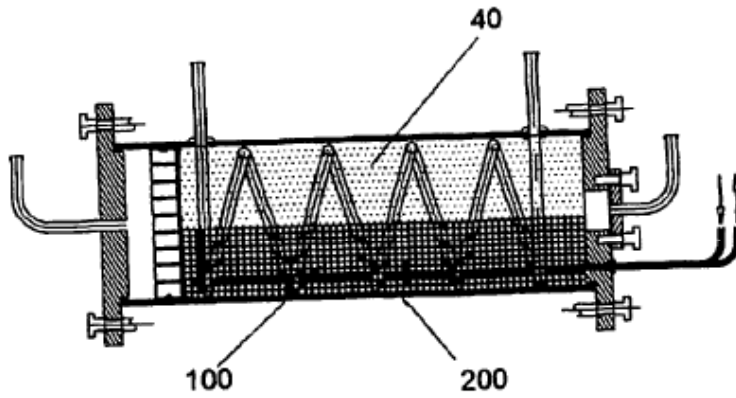


Fig. 3b

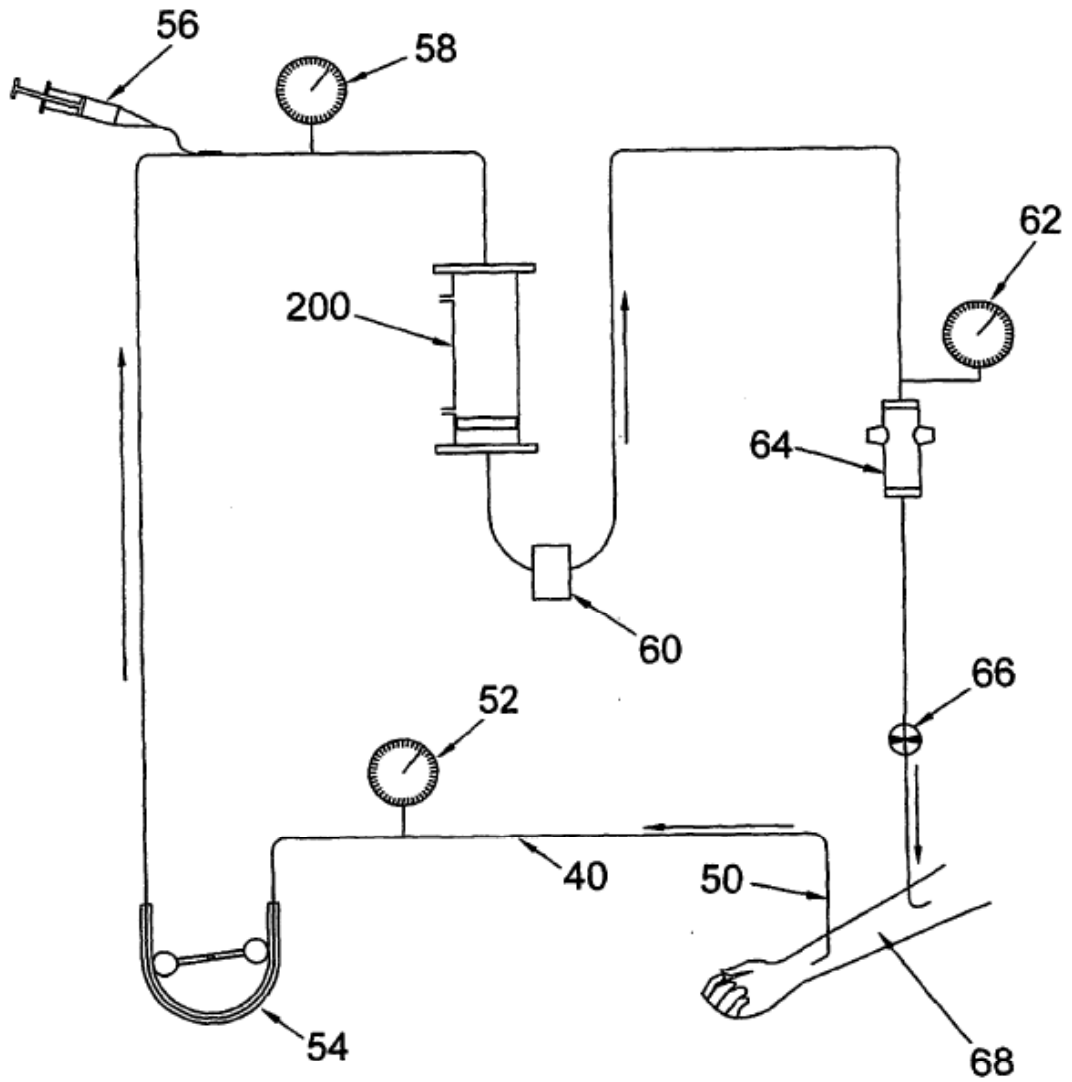


Fig. 4