

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 732**

51 Int. Cl.:

A61M 1/34 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2009 PCT/GB2009/051724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010 WO10070342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009 E 09795527 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2376627**

54 Título: **Mejoras en o relacionadas con células en crecimiento**

30 Prioridad:

17.12.2008 GB 0822961

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

31.07.2017

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC (100.0%)
The Network Building
97 Tottenham Court Road London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**SELDEN, CLARE y
ERRO, ELOY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 627 732 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

Mejoras en o relacionadas con células en crecimiento

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de células en crecimiento y más particularmente a células en crecimiento, a la competencia de rendimiento en una matriz, tales como perlas de alginato. Tiene aplicación particular en el campo de la perfusión extracorpórea del hígado y en el desarrollo de un hígado bioartificial.

Antecedentes de la invención

10 La solicitante, en su solicitud de patente anterior GB 0713595.7, aún no publicada, describe un sistema en el que una línea celular proliferante (en contraste con las células primarias) se siembra en una matriz, opcionalmente con uno o más modificadores de la densidad celular, donde las células proliferan en una masa tridimensional. Las células, cuando alcanzan competencia de rendimiento, son capaces de funcionar como un hígado ya que forman un cuerpo estructural en asociación con la matriz.

15 Un problema con la metodología descrita en la solicitud anterior, es que no ha sido posible cultivar las células, de una manera escalable, para conseguir una densidad de células con un orden de magnitud mayor que un orden de 10^6 células por ml de perlas. Esto significa que se requieren volúmenes relativamente grandes (varios litros) del componente biológico para conseguir el número deseable de células para la función requerida. Esto a su vez plantea dificultades para obtener nutrientes y oxígeno a la masa tridimensional de las células con perlas (debido al volumen).

20 El solicitante ha descubierto sorprendentemente que, al complementar un medio de cultivo, con plasma humano, en forma de plasma congelado fresco empobrecido con leucocitos, en oposición al suero fetal de ternera, han sido capaces de conseguir una densidad celular considerablemente mayor por perla de lo que ha sido hasta ahora posible.

Esto tiene implicaciones significativas en el desarrollo de órganos bioartificiales ya que cualquier reducción en el volumen global del componente biológico hace avanzar la perspectiva de una comercialización exitosa.

25 Actualmente, el único tratamiento para la enfermedad hepática aguda y crónica y la insuficiencia hepática es el trasplante. Sin embargo, este tratamiento está restringido por la falta de órganos donantes. Sólo en los Estados Unidos, 17.000 pacientes están en la lista de espera de trasplante. Muchos de ellos mueren mientras esperan un trasplante. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de un dispositivo que pueda realizar temporalmente la función del hígado del paciente, manteniéndolo vivo mientras se encuentre un órgano donante adecuado o que proporcione un entorno que asegure que el paciente no muera mientras el propio hígado del paciente recupera suficiente funcionalidad para la supervivencia del paciente.

30 Existen dos tipos principales de máquinas de hígado:

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

Ambos se basan en la perfusión de plasma o sangre de un paciente en un circuito extracorpóreo durante un período de 6 horas o más.

35 Existen sistemas puramente artificiales y están en desarrollo varios sistemas bioartificiales.

Sin embargo, los sistemas puramente artificiales, tales como la diálisis de albúmina, no pueden reemplazar todas las funciones hepáticas, incluyendo:

- Desintoxicación,
- Biotransformación,
- 40 • Síntesis, y
- Almacenamiento

y aunque han demostrado ser relativamente seguros en ensayos clínicos, no han dado lugar a una mejora significativa en la supervivencia del paciente.

45 Los sistemas puramente artificiales son únicamente de naturaleza física/química, y proporcionan una función de detoxificación por adsorción/intercambio sobre por ejemplo resina, carbón vegetal, columnas de intercambio iónico o albúmina, o combinaciones de éstos.

En contraste, los hígados bioartificiales (BAL) contienen un componente biológico, es decir, células del hígado, ya sea solo o en conjunción con un dispositivo artificial como sistema híbrido. La hipótesis subyacente a la incorporación de las

- células hepáticas es que la función hepática es tan compleja, que comprende múltiples vías sintéticas, de desintoxicación y metabólicas, que los dispositivos mecánicos en bruto siempre serán inadecuados para reemplazar el rango de función deseado; además, las funciones críticas para gastar tiempo para que la función hepática se recupere, no se han definido completamente y el uso de células hepáticas permite sustituir funciones definidas y no definidas.
- 5 Para el componente biológico, se utilizan células hepáticas aisladas o, ocasionalmente, secciones de hígado, y los sistemas han usado células humanas o animales (más frecuentemente porcinas).
- La mayoría de los BAL tempranos usaron cartuchos de fibra hueca en los que las células eran separadas del plasma o sangre entera por una membrana. Los tamaños de los poros de la membrana diferían entre los sistemas, algunos limitados a la transferencia de moléculas <10.000 daltons, algunos con tamaños de poro tan grandes como 2 micrones.
- 10 Más recientemente han surgido otras configuraciones que abordan mejor las limitaciones de transferencia de masa. Incluyen:
- Un AMC-BAL que contiene células unidas a una matriz de poliéster la cual es expuesta directamente a plasma oxigenado (Flendrig LM, LaSoe JW, Jorning GGA, Steenbeek A, Karlsen OT, Bovee WMMJ, Ladiges NCJJ, TeVelde AA, Chamuleau RAFM. 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.)
 - 15 • Un biorreactor en textil no tejido, (Li LJ, Du WB, Zhang YM, Li J, Pan XP, Chen JJ, Cao HC, Chen Y, Chen YM. 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 AC. Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artif.Organs* 2001; 25: 740-748.) y
 - 20 • El hígado bioartificial Innsbruck que contiene agregados de hepatocitos. (Hochleitner B, Hengster P, Duo L, Bucher H, Klima G, Margreiter R. A novel bioartificial liver with culture of porcine hepatocyte aggregates under simulated microgravity. *Artif.Organs* 2005; 29: 58-66.)
- 25 Los ejemplos anteriores usan hepatocitos animales.
- Ejemplos de reactores con células humanas incluyen aquellos que utilizan:
- Hepatocitos primarios, (Gerlach JC, Mutig K, Sauer IM, 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.)
 - 30 • Cartuchos de fibra hueca que utilizan diferentes líneas celulares derivadas de tumores bien diferenciadas tales como células C3A, (Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24: 1446-1451.) y
 - Un biorreactor de lecho fluidizado con células C3A humanas a una densidad alta (aproximadamente 1 millón de células/ml) en alginato. (David B, Dufresne M, Nagel MD, Legallais C. In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidized bed bioreactor. *Biotechnol.Prog.* 2004; 20: 1204-1212.)
- 35 Diversos grupos alrededor del mundo están trabajando con diferentes componentes biológicos, incluyendo:
- El uso de cultivos primarios de hepatocitos humanos;
 - El uso de cultivos primarios de hepatocitos porcinos; y
 - 40 • El uso de células C3A -una línea celular proliferante derivada inicialmente de un tumor de células de hígado humano bien desarrollado-.
- Existen diferencias fundamentales entre cualquier sistema que use líneas de células proliferantes y las que utilicen células primarias. Las líneas de células proliferantes del solicitante pueden sembrarse individualmente y multiplicarse, in situ, para formar esferoides cohesivos durante un período de tiempo, dependiendo del tiempo de duplicación de un tipo celular específico. Por el contrario, las células primarias, incluso si se siembran a una densidad celular muy alta, no necesariamente formarán contactos cercanos de célula a célula y por lo tanto no necesariamente darán lugar a un verdadero entorno tridimensional, que está asociado con la regulación de la función, ya que imita la situación in vivo.
- 45 El enfoque del solicitante ha consistido en utilizar una línea celular y tiene similitudes con el enfoque C3A que aún no ha demostrado ser eficaz en 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.
- 50

Anteriormente, las células C3A se han utilizado ya sea en:

- "Configuración de cultivo de cartucho de fibra hueca", o
- "Sin cultivar", en un lecho fluidizado en perlas de alginato de baja ocupación.

5 Esto contrasta con la metodología utilizada por el solicitante, que utiliza una matriz de alginato sin recubrir en una configuración de biorreactor de lecho fluidizado con precultivo de células encapsuladas para competencia de rendimiento.

10 El componente biológico de los solicitantes, que comprende líneas celulares de hepatocitos humanos cultivadas en una configuración tridimensional, se ha demostrado, a escala de laboratorio, para proporcionar capacidad hepática funcional sobre una base por célula, que se aproxima a la observada in vivo para varias de las funciones clave del hígado que incluyen:

- Síntesis del factor de coagulación;
- Metabolismo de los esteroides; y
- Funciones de desintoxicación especificadas.

15 A continuación se dan detalles más completos sobre la expresión de la función específica de los hepatocitos, iniciada por el solicitante:

El solicitante ha sido pionero (a escala de laboratorio) el cultivo de líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos como colonias esferoides tridimensionales (3-D) en perlas de alginato, como se describe en:

20 • 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;

• McCloskey P, Edwards RJ, Tootle R, Selden C, Roberts E, Hodgson HJ. 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;

25 • 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 HJ. Modulation of hepatocyte function in an immortalized human hepatocyte cell line following exposure to liver-failure plasma. *Artif.Organs* 2002; 26: 340-348;

30 y

• Coward SM, Selden C, Mantalaris A, Hodgson HJ. 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:

35 • Las células que proliferan en este medio mantienen una arquitectura de células casi cuboidales;

• Tienen una organización cercana célula a célula y de matriz celular; y

• Secretan proteínas de la matriz extracelular y un amplio repertorio de proteínas específicas de hígado secretadas como se ejemplifica por:

• Albúmina,

• Protrombina,

40 • Fibrinógeno,

• Alfa-1-antitripsina, y

• Alfa-1-ácido glicoproteína.

Expresan muchas funciones a niveles equivalentes a los de hepatocitos in vivo, por ejemplo metabolismo de esteroides, síntesis de glucógeno, etc.

- El solicitante ha mostrado también que algunas funciones están mal expresadas o faltan, pero pueden ser suplementadas. Por ejemplo, han demostrado que aunque los clones HepG2, incluyendo el subclon C3A que es la base de un dispositivo bioartificial, producen urea, esto es a través de un mecanismo independiente de ciclo de urea que no detoxifica el amoníaco. Por lo tanto, no modificadas, tales células son poco probable que sean beneficiosas en el tratamiento de la encefalopatía dependiente del amoníaco de la insuficiencia hepática. Usando la transferencia génica para reemplazar a dos enzimas faltantes han demostrado la restauración de la producción de urea a partir de amoníaco en sus clones HepG2. (Mavri-Damelin D, Eaton S, Damelin LH, Rees M, Hodgson HJ, 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
- 10 También los han caracterizado ampliamente con respecto a la función específica del hígado 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;
 - 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
 - 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)
- (Todos los mencionados anteriormente) y
- 20
- LH Damelin, M Kirwan, S Coward, P Collins, IJ Cox, C Selden, HJF 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
 - 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.
- 25 Además, en un modelo animal de insuficiencia hepática fulminante, han mostrado que presentan una mejora en los parámetros clínicos y bioquímicos.
- Rahman TM, Selden C, Khalil M, Diakanov I, Hodgson HJ. 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
- 30
- Rahman TM, Selden AC, Hodgson HJ. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J Surg.Res.* 2002; 106: 264-272.
- Además, han demostrado rendimiento mejorado de perlas por cultivo en un sistema de cultivo celular giratorio (RCCS) bajo condiciones de microgravedad simuladas:
- 35
- Coward SM, Selden C, Mantalaris A, Hodgson HJ. Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures. *Artif.Organs* 2005; 29: 152-158
- (Citada previamente); y
- Human liver cells in a pilot scale fluidised bed bioreactor maintain performance in human liver failure plasma, making them suitable for a bioartificial liver. Presented at World Congress of Biomechanics, July 29-August 4 2006 in Munich, Germany.
- 40 También han probado el rendimiento de este sistema en plasma humanos normal y plasma recogidos de pacientes con insuficiencia hepática aguda estableciendo que se mantiene la viabilidad y el rendimiento funcional 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 [Suppl 2], S53. 2006.
- 45 Sin embargo, la ampliación del componente biológico, a partir de un tamaño de escala de laboratorio, que implica no más de un volumen de 70 ml de perlas de alginato, proporciona desafíos significativos.
- Así, por ejemplo, el componente biológico del sistema extracorpóreo debería ser:
- Preparado para adecuarse a las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP),
 - Fácilmente transportable a centros donde los pacientes serán hospitalizados,

- Convenientemente empaquetado para almacenar, transportar y cargar un sistema de perfusión;
- Movable desde la "fábrica celular" hasta la "clínica", para su uso en circulación extracorpórea.

5 El documento US 6.218.182 enseña un biorreactor de ingeniería de tejidos para el cultivo de tejido tridimensional en el que las células se siembran sobre una malla. Después de que el tejido ha crecido en el biorreactor, se sugiere que puede ser congelado y conservado en el recipiente del biorreactor en sí.

El documento GB 0713595.7 describe una cámara en la que se puede alojar un componente biológico para formar, por ejemplo, un hígado bioartificial (BAL), que es funcionalmente modular en el sentido de que puede retener el componente biológico de una manera que le permita:

- Hacer proliferar el componente biológico (in situ);
- 10 • Crioconservar (congelación y descongelación) el componente biológico (in situ); y
- Ser perfundido.

15 El uso de una alimentación suplementada con plasma humano para hacer crecer un componente biológico proporciona beneficios sustanciales sobre la metodología de la técnica anterior de los solicitantes en la que el número máximo de esferoides de células competentes para el rendimiento que podrían obtenerse por el método descrito fue de $2,5 \times 10^7$ células/ml.

El documento US2002/0168758 describe la circulación de un fluido a través de las fibras internas de un hígado bioartificial. Los fluidos adecuados incluyen plasma congelado fresco humano. Sin embargo, no enseña a las células en crecimiento la competencia de rendimiento utilizando dichos medios.

20 El documento US6294380 describe la ampliación de las células funcionales establecidas en los portadores macroporosos. Los hepatocitos se volvieron confluentes bajo condiciones de cultivo en perfusión. Tras la recolección de células, la densidad podría alcanzar 10^7 - 10^8 células/ml.

Presente invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un componente (100) biológico que comprende:

- 25 i. un agente (120) formador de matriz,
- ii. una pluralidad de celdas (110), y
- iii. uno o más modificadores (130) de densidad,

caracterizado porque, a nivel de rendimiento, las células están presentes en el agente formador de la matriz a una densidad $> 3 \times 10^7$ células/ml.

30 Aquí, la "competencia de rendimiento" se define como la consecución de un estado en el que las células actúan de una manera similar a la de las células funcionales (del hígado).

Preferiblemente, las células están presentes en el agente formador de la matriz a una densidad de al menos 3×10^7 células/ml, aun $3,5 \times 10^7$ células/ml, $4,0 \times 10^7$ células/ml, $4,5 \times 10^7$ células/ml, $5,0 \times 10^7$ células/ml, $5,5 \times 10^7$ células/ml, $6,0 \times 10^7$ células/ml, $6,5 \times 10^7$ células/ml y $7,0 \times 10^7$ células/ml.

35 Las células pueden alcanzar tal densidad de células en 8-13 días, momento en el que exhiben competencia de rendimiento.

Preferiblemente, las células son una línea celular humana proliferante que exhibe un fenotipo de hepatocitos.

Las células son preferiblemente una línea celular Hep G2 con o sin modificación genética.

40 Preferiblemente, el agente formador de la matriz es un alginato, más preferiblemente perlas de alginato. Las perlas pueden tener cualquier tamaño apropiado, pero se ha encontrado que un diámetro de 300-1200 mm es particularmente beneficioso.

El logro de una alta densidad de células competentes en el rendimiento en las perlas es una consecuencia de la metodología empleada y también del nivel de siembra.

45 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para hacer crecer una pluralidad de células (110) a una competencia de rendimiento en un agente (120) formador de matriz que contiene uno o más modificadores (130) de densidad, caracterizado porque las células se cultivan en un medio suplementado con 2-20% de plasma.

Más preferiblemente, el medio se suplementa a un nivel de 5-15%, lo más preferiblemente aproximadamente 10%.

Preferiblemente, el plasma es plasma humano congelado fresco empobrecido en leucocitos. Puede contener agentes anticoagulantes tales como heparina. Cuando el agente anticoagulante es heparina, puede estar presente en una cantidad de entre 40-120 unidades/ml de plasma.

5 Típicamente, la heparina se añade a niveles de 20 $\mu\text{l/ml}$ de plasma/día con un inóculo inicial de 40 $\mu\text{l/ml}$.

Utilizando el componente biológico de la invención, cultivado usando la metodología de la invención, es posible llenar una cámara, con volúmenes relativamente bajos del componente biológico (menos de 2 litros), del tipo descrito con referencia a GB0713595.7 para producir un hígado bioartificial.

10 El método permite una proliferación celular más rápida (competencia de crecimiento a rendimiento) y un empaquetado celular más denso dentro de la perla sin pérdida de la función celular, de tal manera que el rendimiento por célula permanece igual, pero el rendimiento por perla se incrementa significativamente. Típicamente, se consigue un empaquetamiento de gránulo > 25% con FFP que representa un aumento de 5 veces más que la suplementación de FCS.

15 Se apreciará que el método puede usarse para hacer crecer otras células epiteliales de mamíferos, tales como células madre o progenitoras u otras líneas celulares epiteliales humanas establecidas.

La invención también elimina componentes animales del sistema, eliminando así el riesgo de zoonosis. El uso de componentes humanos generalmente se considera beneficioso para el paciente y la mayor velocidad de crecimiento y volúmenes reducidos proporcionan un beneficio económico significativo. Sin embargo, el mayor beneficio se deriva de la reducción del volumen de material biológico necesario para llenar la cámara.

20 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un hígado (200) bioartificial que comprende una cámara (10) llena con un componente (100) biológico que comprende:

- i. un agente (120) formador de matriz,
- ii. una pluralidad de celdas (110), y
- iii. uno o más modificadores (130) de densidad,

25 caracterizado porque, a nivel de rendimiento, las células están presentes en el agente formador de la matriz a una densidad de al menos 3×10^7 células/ml.

El hígado (200) bioartificial puede comprender de 3×10^{10} a 1×10^{11} células competentes en un volumen de menos de 2 litros.

30 El hígado (200) bioartificial es preferiblemente uno tal como se describe en el documento GB0713595.7, en el que la cámara comprende un soporte (20) de lecho fluido, una entrada (16) de fluidización y una salida (18) de fluidización.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método escalable para hacer proliferar células sembradas en un agente formador de matriz que contiene uno o más modificadores de densidad que comprende:

- a. Colocar las células sembradas en el agente formador de matriz en una cámara que tiene un lecho fluidizado, y
- 35 b. hacerlas crecer hasta la competencia de rendimiento en un medio suplementado con 2-20% de plasma.

Preferiblemente, la cámara para el componente biológico del hígado bioartificial está configurada para permitir:

- Proliferación in situ del componente biológico;
- Crioconservación del componente biológico, in situ, y
- Perfusión del componente biológico, in situ.

40 Preferiblemente, la cámara también está diseñada de manera que pueda ser esterilizada antes de que el componente biológico se introduzca en la cámara.

Preferiblemente, el componente biológico comprende:

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

La línea celular se encapsula en el agente formador de la matriz junto con el agente de control de la densidad.

La encapsulación sirve para una serie de funciones:

- Protege las células durante la congelación/descongelación
- Facilita el manejo simple de la biomasa
- 5 • Permite la perfusión en una cámara o reactor de lecho fluidizado; y
- Proporciona una matriz que permite a las células formar una masa tridimensional.

El hecho de que tales células encapsuladas con alginato puedan ser adecuadas para aumentar la escala ha sido revelado por el solicitante -Coward et al, Poster abstract Dec 4-5 2006 (incorporado como referencia).

10 Preferentemente, el alginato se siembra con $0,5 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ células por ml de alginato, más particularmente todavía de $1,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6$ células/ml de alginato Si se usan muy pocas células, tomará mucho tiempo para su crecimiento, y si se usan demasiadas, no proliferarán.

La cámara sirve como reactor de lecho fluidizado y comprende:

- Una entrada y una salida que permiten el flujo de fluido a través de la cámara; y
- Un soporte de lecho fluido por encima del cual las células encapsuladas pueden ser suspendidas.

15 El concepto general de usar un lecho fluidizado para perfusión también ha sido previamente descrito -Legallais et al-, Artificial Organs 24 (7): 519-525. Sin embargo, no se ha sugerido previamente que un lecho fluidificado pudiera utilizarse beneficiosamente en la etapa de proliferación ni con esferoides de células, solo con suspensiones de células individuales encapsuladas.

20 El soporte de lecho fluido comprende preferiblemente una placa que está provista de una pluralidad de orificios espaciados, de no más de 200 μm , que permiten una fluidización controlada del lecho. El lecho tiene un filtro que lo cubre, que se mantiene en su sitio, por ejemplo, un anillo de alambre. La placa está sellada dentro de la cámara mediante, por ejemplo, un anillo-O.

25 La cámara es preferiblemente cilíndrica y tiene una relación de aspecto (a) = altura (h)/diámetro (d) de 10:1 a 1,3:1. Esto es importante por dos razones: En su posición erguida (vertical), dicha relación de aspecto proporciona un entorno óptimo (características de relación masa/volumen) para la proliferación celular inicial y para el uso, es decir, para la transferencia de oxígeno y nutrientes a las células y para transferencia de proteínas desde las células a, por ejemplo, plasma o medio de cultivo. También facilita el intercambio de medio antes de la criopreservación. (Congelación/descongelación rápida de las células). En su posición horizontal (en particular cuando la relación de aspecto se aproxima a 10:1), el componente biológico puede ser "esparcido", de manera que una mayor superficie de la misma pueda ponerse en contacto con la pared exterior de la cámara y de los elementos de intercambio de calor, facilitando así un mejor calentamiento/enfriamiento (con una interrupción mínima de la fluidización) debido a la posición desplazada lateralmente de los elementos de intercambio de calor con respecto al volumen de la cámara principal.

30 Para abordar adicionalmente el problema de conseguir suficiente oxígeno para las células, en un dispositivo escalado para uso humano (típicamente uno de un tamaño de 1-10 litros de volumen capaz de mantener 0,5-5l de un componente biológico y que debería ser capaz de permitir una expansión de volumen de hasta dos veces en la fluidización), la cámara comprende adicionalmente un sistema de transporte de fluido dispuesto en su interior. El sistema de transporte de fluido tiene una función primaria de transportar gas al componente biológico, pero puede tener adicionalmente una función secundaria de transportar un fluido de calentamiento o enfriamiento. Para facilitar su función primaria, está hecha de un material permeable al gas y está dispuesta dentro de la cámara de una manera que asegura que no se acumule un gradiente perjudicial de oxígeno, en uso, desde la entrada hasta la salida.

35 En una realización preferida, el sistema de transporte de fluido está dispuesto helicoidalmente alrededor de las paredes circunferenciales internas de la cámara.

40 En una realización preferida adicional, el sistema de transporte de fluido tiene un grado de compresibilidad, de tal manera que puede funcionar como un "amortiguador de choques" durante la criopreservación, proporcionando adicionalmente un grado de protección al componente biológico encapsulado.

45 Los diversos aspectos de la invención se describen adicionalmente, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las siguientes figuras en las que:

Las Figs. 1a y 1b son, respectivamente, una diapositiva que compara células cultivadas con FCS en alginato con células cultivadas FFP en alginato al día 5 en cultivo estático;

50 La Fig. 2 es un gráfico que muestra la densidad celular (millones de células/pozo) de células cultivadas con FCS en

alginato en comparación con las células cultivadas FFP en alginato al día 5 en cultivo estático de perlas de alginato;

La Fig. 3 es un gráfico que compara la producción de AFP (mic g AFP) para células cultivadas FFP y FCS en alginato al día 5 en cultivo estático

5 La Fig. 4 es un gráfico que compara la producción de AFP (millones de células/24h) para células cultivadas FFP y FCS en alginato al día 5 en cultivo estático

Las Figs. 5a y 5b son diapositivas que muestran células cultivadas FFP con una competencia de rendimiento (7 días) vivas y bajo contraste de fase respectivamente sembradas $0,5 \times 10^6$ /ml al día 0;

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el número total de células/ml de perlas cuando se cultivan con FFP al 10% y FCS al 10%, respectivamente;

10 La Fig. 7 es una vista en sección transversal de una realización de una cámara según la invención;

Las Figs. 8a y 8b son imágenes de contraste de fase del componente biológico,

La Fig. 9a es una vista en sección transversal de un BAL en la posición vertical (uso general);

La Fig. 9b es una vista en sección transversal de un BAL en la posición horizontal (crioconservación); y

La Fig. 10 muestra un BAL en un circuito para uso en línea.

15 Descripción detallada

El beneficio de usar un medio suplementado con 2-20% de plasma, particularmente plasma fresco congelado (FFP) en oposición al suero fetal de ternera (FCS) se ilustra con referencia a los Ejemplos siguientes: Las referencias numéricas al dispositivo están relacionadas con la descripción posterior.

Ejemplo 1.

20 Proliferación a la competencia de rendimiento

Metodología

1. El dispositivo (200) se llena con medio (40) de cultivo, por ejemplo alfa MEM, al nivel del filtro (26) utilizando una bomba peristáltica para suministrar el medio al mismo;

25 2. Se introducen células (100) encapsuladas en la cámara (10) a través de un orificio de llenado (no mostrado) en la placa (12) superior;

3. El volumen restante (v) de la cámara se llena completamente con medio (40) de cultivo;

4. El BAL (200) está conectado a un circuito separado (no mostrado) que suministra el medio (40) de cultivo a través de una bomba peristáltica desde el depósito de un bioreactor Celligen Plus (New Brunswick Scientific) y lo devuelve al mismo depósito a través de una sonda de oxígeno disuelto en línea;

30 5. El caudal utilizado es tal que se consigue una expansión de 1,2 a 2 veces del lecho (100) comprimido de perlas de alginato;

6. Un controlador de biorreactor automatizado monitorea y controla la temperatura, la velocidad de agitación, el pH y el oxígeno disuelto del depósito del medio de cultivo. Esto permite escoger puntos de ajuste que aseguren que el medio suministrado al biorreactor de lecho fluidizado es óptimo para el crecimiento celular encapsulado;

35 7. Aproximadamente el 50% del volumen del medio de cultivo en el circuito se reemplaza después de las primeras 48-72 horas de cultivo y a partir de entonces cada 24 a 48 horas. También está disponible un sistema de alimentación y purga para un control más sutil de reactivos específicos según sea necesario.

40 8. Se introducirá un casete de enzimas inmovilizadas, en contacto directo con la trayectoria de flujo, inmediatamente antes del medio de cultivo en contacto con perlas que reciclan lactato para proporcionar piruvato (una fuente de energía) y oxígeno a las perlas. Las enzimas a utilizar incluirán, pero no se limitarán a, lactato oxidasa y catalasa.

45 Durante la proliferación, la actividad del citocromo P450 puede potenciarse cultivando con un inductor, tal como, por ejemplo, dibenzantraceno (por ejemplo, $6 \mu\text{M}$) durante un periodo de tiempo de, por ejemplo, 24-72 horas. Esto puede elevar significativamente los niveles de citocromo P450 durante un periodo de días después de la inducción (que permanece sostenible una vez que se elimina el inductor) y puede además, en la exposición posterior, resultar en una elevación adicional.

ES 2 627 732 T3

Las células (100) encapsuladas con alginato se pueden retirar de la cámara (10) durante la proliferación y se mantienen típicamente durante 8 a 12 días con el fin de que las células encapsuladas alcancen la competencia de rendimiento.

El medio de cultivo era:

FCS mejorado

- 5 Medio alfa MEM completo con alto contenido de glucosa (100 μ l de CaCl_2 1 M) mejorado con 10% de FFP; o FFP mejorado

Medio alfa MEM completo con alto contenido de glucosa (220 μ l de 1 M CaCl_2) mejorado con 10% de FFP

En la tabla 1 a continuación se expone un resumen de las condiciones utilizadas:

Tabla 1

	FBB16	FBB20
Células	Hep G2	Hep G2
Perlas	200 ml	200 ml
Medio	Medio alfa MEM completo con alto contenido de glucosa (100 μ l de CaCl_2 1 M) mejorado con FCS al 10%.	Medio alfa MEM completo con alto contenido de glucosa (220 μ l de 1M CaCl_2) mejorado con FCS al 10%.
Duración del experimento	9 días	13 días
Cambios de medios en los días	2, 5, 7	2, 5, 7, 9, 11, 12
Volumen de medios en el circuito	5,5l	71
Volumen de medios modificados	2.75l	3.5l (1,75l día 12)
Cámara	10 cm día	15 cm día
Bicarbonato	Sí	Sí
Heparina añadida diariamente	no	200 U/ml (2.8 ml of 5000 U/ml solución madre)
Fluidización	1,5 veces	1,5 veces
Rata de flujo	90 ml/min	390 ml/min

10

Resultados

Puede verse por comparación de la Fig. 1a y la Fig. 1b que a los 5 días las células cultivadas de FFP están creciendo más rápido, y tienen una densidad celular mucho mayor que las cultivadas en FCS.

15

También, como es evidente a partir de la Figura 2, hay aproximadamente 2,5 millones de células/pozo en el medio de cultivo FFP en comparación con aproximadamente 0,25 millones en el medio de cultivo de FCS (una diferencia de 10 veces).

20

Además, como se ilustra en la Fig. 3, las células Alpha feto proteínas niveles (AFP). Que para las células Hep G2 en plasma son un buen indicador del metabolismo/rendimiento celular, son significativamente más altas para las células suplementadas con FFP (aproximadamente 4,0 micg/ml frente a 0,3 micg/ml de medio acondicionado, una vez más que una diferencia de 10 veces.

Incluso permitiendo el mismo número de células (Fig. 4) la producción de AFP se incrementó ligeramente después de 24 horas en medio suplementado con FFP.

25

La naturaleza densa de las células se ilustra mejor en las Figuras 5a y 5b que muestran células que contienen perlas de alginato después de 7 días de crecimiento con medios de cultivo suplementados con FFP en cultivo estático. En esta etapa, han alcanzado una densidad celular de $1,2 \times 10^7$ células/ml.

En el reactor biológico de lecho fluidizado, en contraste con el cultivo estático, se alcanzaron mayores densidades de células con medios suplementados con FCS y FFP. Sin embargo, hubo un aumento muy significativo en la densidad celular más alta lograda utilizando medios suplementados con FFP. Esto se ilustra en la Tabla 2 a continuación, cuyos resultados se muestran gráficamente en la Figura 6:

5

Tabla 2

	FBB13 células/ml perlas FCS	FBB20 célula/ml perlas FFP
0	1,26E+06	2,06E+06
5	4,44E+06	7,32E+06
7	8,08E+06	1,62E+07
9	1,37E+07	3,58E+07
12	2,14E+07	5,63E+07

El significado de estos datos será evidente cuando se extrapole la densidad celular con el tiempo de cultivo y se considere el volumen del componente biológico necesario para conseguir los rendimientos celulares que serían necesarios para proporcionar algo con la equivalencia funcional con un hígado parcialmente funcional (al menos 15% de función) de $1-2 \times 10^{11}$ células.

10

Por lo tanto, la Tabla 3 a continuación proporciona una indicación de los volúmenes del componente biológico necesarios para conseguir un número de células dado basado en un cultivo continuo:

Tabla 3

Uso clínico	Células/ml rendimiento requerido	2.4×10^7 día 9 de cultivo	4.8×10^7 día 11 de cultivo	6.0×10^7 día 12 de cultivo
Humano (estimado bajo 30%)	3×10^{10}	1250 ml	625 ml	500 ml
Humano (estimado alto)	7×10^{10}	2916 ml	1456 ml	1167 ml
Hígado humano	1×10^{11}	4167 ml	2083 ml	1666 ml

15

Dado que la nueva metodología también da lugar a un nuevo componente biológico que a su vez se utilizará en la cámara descrita en el documento GB 0713595.7 para detalles de completación, se describen a continuación:

- a) La cámara (sección 1.0);
- b) El componente biológico (sección 2.0)
- c) El dispositivo hepático bioartificial (sección 3.0) y
- d) Su uso para perfundir a un paciente (sección 4.0)

20

1.0 cámara vacía

Haciendo referencia a la figura 7, la cámara (10) tiene una forma en general cilíndrica que tiene un diámetro (d), altura (h) y una capacidad o volumen (v) apropiados para su función de perfusión hepática. Típicamente este volumen será de 1-10 litros, más preferiblemente de 1-5 litros.

25

Está hecho de un material que puede ser esterilizado (por ejemplo, por autoclave a 121°C a 1 bar), soportará temperaturas de criopreservación (-160°C) y también puede soportar el cambio rápido de temperatura asociado con estos procedimientos. Adicionalmente, el material debe ser compatible con la presencia de los materiales y soluciones biológicas que contendrá, por ejemplo sangre, plasma, solución salina, criopreservantes, medios de cultivo, etc.

30

Es una unidad sellable que comprende un alojamiento (36) cilíndrico emparedado encerrado por placas (12, 14) superior e inferior. Dado que en al menos un modo de funcionamiento funciona como un lecho fluidizado, comprende una entrada (16) de fluidización en la placa (14) inferior y una salida (18) de fluidización en la placa (12) superior. Estas entradas/salidas pueden utilizarse para introducir soluciones que incluyen: medios de cultivo, plasma y crioprotectores. Un soporte (20) de lecho fluido que comprende una pluralidad de orificios (22) posicionados ordenadamente, que ayudan a controlar la fluidización, se mantiene en su sitio mediante un anillo (24) en O en el extremo más inferior de la

cámara. Sobre el soporte de lecho fluido se dispone un filtro (26) de malla que se sujeta mediante un anillo (28) de alambre.

El filtro sirve para atrapar perlas de alginato (120-Fig. 8) dentro de la cámara durante todas las etapas de fluidización y uso.

5 La cámara comprende además un sistema (30) de transporte de fluido que entra en la cámara en la entrada (32) justo encima del soporte (20) de lecho fluido y sale de la cámara en la salida (34) hacia la placa (12) superior. El sistema de transporte de fluido adopta la forma de un tubo que está dispuesto preferiblemente helicoidalmente y en un patrón regular alrededor de la pared (36) interior del cilindro, aunque son posibles otras configuraciones. El tubo, que es semipermeable a los gases, facilitará el intercambio gaseoso (su función primaria) al componente (100) biológico fluidizado (no mostrado para mayor claridad). Puede hacerse de silicona o cualquier otro material adecuado, por ejemplo polímeros que son permeables a los gases, no tóxicos y pueden resistir las temperaturas que se experimentarán en el funcionamiento. El material también debe presentar un grado de flexión tal que el tubo pueda absorber la expansión que se produce cuando el contenido de la cámara está congelado. El sistema de transporte de fluido puede actuar adicionalmente como un intercambio de calor cuando fluidos (líquidos o gases) son bombeados allí a través.

20 Finalmente, la cámara comprende uno o una pluralidad de elementos (38) de intercambio de calor que en una realización se extienden hacia abajo a través de la placa (12) superior dentro de la cámara justamente por encima del soporte (20) de lecho fluido. Estos elementos están dispuestos para ser sustancialmente perpendiculares a las placas (12, 14) y están dispuestos en un patrón regular (que está distribuido sustancialmente uniformemente) dentro de al menos una parte del volumen de la cámara para maximizar una congelación y descongelación uniformes y eficientes minimizando su efecto sobre la fluidización. Con este fin, en una realización preferida, los elementos de intercambio de calor (que en una realización comprenden varillas huecas hechas de o recubiertas con titanio y sus aleaciones para maximizar el intercambio de calor) están dispuestas a lo largo de una longitud (h) de la cámara, de manera que cuando la cámara se coloca horizontalmente (figura 9b) (en contraste con su posición de fluidización vertical (figura 9a)) es capaz de enfriar/calentar eficientemente el componente biológico que se distribuye favorablemente desde una perspectiva de transferencia de masa. Es importante que los materiales no sean tóxicos para el componente biológico y no estén corroídos, por ejemplo, por solución salina.

30 En una disposición alternativa, uno o una pluralidad de elementos (38) de intercambio de calor pueden pasar directamente a través de la placa superior e inferior en una trayectoria recta. Tal disposición puede simplificar el bombeo o el arrastre de un fluido refrigerante a través de los tubos. De hecho, en una realización de este tipo, los tubos pueden tener extremos en forma de embudo.

35 Como se ha sugerido anteriormente con referencia a los elementos (38) de intercambio de calor y al sistema (30) de transporte de fluido, el "aumento de escala" trae consigo los problemas de asegurar el suministro de, por ejemplo, oxígeno y nutrientes a las células y el intercambio de, por ejemplo proteínas de las células a, por ejemplo plasma sanguíneo. Por consiguiente, para ayudar en el intercambio, se prefiere que el cilindro tenga una relación de aspecto (a), $a = h/d$, de 10: 1 a 1,3: 1 y una capacidad (v) de entre 1 y 10 litros.

Aunque está dirigido a líneas de células hepáticas humanas en este caso, este diseño es genérico para varias células proliferantes epiteliales de mamíferos y sería aplicable a otros requerimientos de biomasa. Para más detalles sobre el componente biológico favorecido, véase la sección 2.0.

40 La oxigenación puede proporcionarse de varias maneras incluyendo intercambio simple de gas a través de membranas permeables a los gases, oxigenadores de fibra hueca y/o utilización de mezclas de perfluorocarbono con altas capacidades de saturación de oxígeno

2.0 Componente biológico

45 Haciendo referencia a las figuras 8a y 8b, el componente (100) biológico comprende una pluralidad de células (110) encapsuladas en perlas (120) de alginato de aproximadamente 400 μm de diámetro. Las perlas de alginato también comprenden una pluralidad de modificadores (130) de densidad en forma de perlas de vidrio.

Las células individuales se encapsulan para conseguir aproximadamente 22 a > 50 millones de células por mililitro de perlas con una competencia de rendimiento.

50 Este sistema de encapsulación de alginato 3-D puede usarse, por supuesto, para cualquier línea de células epiteliales en proliferación, por lo que si surgen líneas celulares funcionalmente mejores, la tecnología será igualmente eficaz. El desarrollo de líneas celulares humanas proliferativas alternativas que exhiben un fenotipo de hepatocitos incluyen líneas celulares de hepatocitos diferenciadas de células madre embrionarias humanas o de células de cordón umbilical.

3.0 dispositivo de hígado bioartificial (BAL)

55 El dispositivo BAL se ilustra con más detalle en las figuras 9a y 9b. Cuando la cámara (10) se llena con el componente (100) biológico, se convierte en, o al menos tiene el potencial para convertirse en, un hígado (200) bioartificial que

puede usarse en un circuito (50) de perfusión extracorpóreo.

Para funcionar como un hígado (200) bioartificial, la cámara (10) debe comprender un volumen (v) que se llena con suficiente componente (100) biológico y una solución (40) apropiada, por ejemplo plasma, para funcionar sustancialmente, pero temporalmente, como un hígado. (Es decir, ser aptos para el propósito). Para este fin, debido a que la cámara funciona como un lecho fluidizado, el componente biológico se fluidizará y por lo tanto la capacidad de la cámara debería ser de aproximadamente 1,2 a 2 veces el volumen del volumen de perlas añadido.

Obviamente, el volumen del cordón dependerá de la funcionalidad de las células hepáticas encapsuladas dentro de las perlas. Un hígado humano puede funcionar en aproximadamente el 15%, y el BAL se ha modelado para proporcionar una función del 30% (dos veces el requisito mínimo).

Por lo tanto, debe comprender esferoides de células competentes en el rendimiento en perlas de alginato al 1-2%, de una densidad que permita la fluidización en plasma humano. Los esferoides de células competentes de rendimiento se habrán cultivado durante 8-12 días y contendrán de 22 a > 60 millones de células por ml de perlas.

Para conseguir esto, se utilizará un rendimiento de ~ mil millones de células (1×10^9) para sembrar cada 500-666 ml de perlas de alginato y sus múltiplos, de tal manera que la cámara contendrá entre 3×10^{10} a 1×10^{11} células.

Las perlas (120) de alginato tendrán un diámetro medio entre 300-1200 μm , preferiblemente 400 μm , y contendrán adicionalmente perlas (130) de vidrio con un diámetro medio entre 10-50 μm en número suficiente para controlar la densidad para fluidización hasta dos veces el volumen del lecho. El componente (100) biológico se proporcionará en una solución (40) apropiada, ya sea medio de cultivo (durante la proliferación), fluido isotónico (preuso), plasma (pre y durante la perfusión) o crioprotector (después de la proliferación cuando se almacena) dependiendo de la fase de uso.

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

Sin embargo, pasar del uso de líneas celulares a una escala de laboratorio (70 ml o menos) al desarrollo de un hígado bioartificial trae consigo nuevos desafíos incluyendo la necesidad de desarrollar métodos escalables y una comprensión de cómo los materiales biológicos funcionan en los volúmenes necesarios para su uso en perfusión hepática en sujetos humanos. Requiere la experiencia multidisciplinar de ingeniería mecánica, modelado matemático, ingeniería bioquímica, ciencia de materiales, física teórica, así como experiencia médica.

Significativamente, el solicitante ha sido capaz ahora de demostrar, en escalas de hasta 200 ml, que este diseño de cámara de lecho fluidizado de un dispositivo BAL, utilizando esferoides 3-d de líneas celulares derivadas de hígado humano, puede lograr un rendimiento metabólico similar al encontrado in vivo y en hepatocitos primarios.

Por ejemplo, el muestreo del depósito de medio de cultivo recolectando muestras de 1 ml y analizándolas ha demostrado:

- un consumo de glucosa de 4,98 μmoles de glucosa/millones de células/día;
- similarmente síntesis de proteínas (a un hígado humano);
- secreción de albúmina que demuestra valores en el mismo orden de magnitud que los hallados in vivo, es decir, 12 g/ 10^{12} células hepáticas/día; y (utilizando sondas de oxígeno que miden oxígeno disuelto)
- consumo de oxígeno de aproximadamente 19 μmoles de O/min/mg de proteína.

Manifiestamente, cualquier hígado artificial debe ser capaz de ser fabricado y distribuido de manera eficiente y segura, usando procesos que cumplan con los requisitos GMP.

El solicitante ha desarrollado adicionalmente un medio para almacenar las perlas competentes de rendimiento durante hasta 3 días a temperatura y presión ambiente a una relación de perlas a medio alta utilizando perfluorodecalina saturada de oxígeno (un portador de oxígeno con una saturación mucho mayor que la solución acuosa).

Esto es importante ya que permitiría a un fabricante "descongelar" un dispositivo que contenga células competentes para el rendimiento y enviarlo directamente a un usuario (que no necesitaría descongelar el dispositivo en el punto de uso) lo que simplifica su uso lo hace menos propenso a errores del usuario.

4.0 Modificación para el uso del paciente en línea

La fase de tratamiento final comprenderá la conexión del dispositivo (200) hepático bioartificial (cámara (10) que contiene células (100) en proliferación) en un circuito (50) de manera que se perfunda con plasma (40) humano.

De este modo, durante el uso, el BAL (200) estará conectado a un paciente de manera que el plasma (40) entre en la cámara (10), por ejemplo, por la entrada (16) y salga por ejemplo por la salida (18).

5 Haciendo referencia a la figura 10, se perfunde sangre entera en un circuito (50) o se extrae sangre de un paciente (68) y el plasma (40) se separa de las células sanguíneas y pasa a través de un circuito (50), ya través del BAL (200) antes de ser reintroducido en las células sanguíneas y devuelto al paciente. Normalmente, pero no esencialmente, la sangre pasará a través de un monitor (52) de presión arterial, el plasma se separará y será accionado por una bomba (54) al BAL (200) a través de una (56) bomba de heparina y una presión de entrada al monitor (58) de perfusión. En el BAL, el plasma se trata permitiendo el intercambio de, por ejemplo toxinas del plasma a las células (110) y proteínas de las células al plasma. Al salir del BAL, el plasma pasa a través de un cartucho (60) de eliminación de ADN, se reintroduce en las células sanguíneas a través de un monitor (62) de presión venosa, un purgador (64) de aire y un detector (66) de aire antes de ser devuelto al paciente. Preferiblemente, el cartucho de eliminación de ADN comprende una matriz microporosa con poros para conseguir un corte de peso molecular de 2 millones de Daltons.

10 El cartucho debe contener también un casete de unión al ADN compuesto por una enzima desoxirribonucleasa I inmovilizada para escindir el ADN en di- y trinucleótidos.

En uso, el dispositivo se fluidiza hasta una altura de dos veces el lecho en presencia de plasma humano como parte del circuito (50) extracorpóreo que permitirá que la cámara funcione como una biomasa útil desde el punto de vista clínico.

15 Un hígado normal contiene ~ $1-2 \times 10^{11}$ hepatocitos y ~ 15% de la masa hepática normal se requiere para sostener la vida en individuos de otra manera bien ($1.5-3.0 \times 10^{10}$).

20 En consecuencia, el sistema del solicitante se ha desarrollado con el objetivo de proporcionar el 30% de una masa de células hepáticas normales. Esta masa celular debe estar contenida en un sistema de perfusión práctico con parámetros de difusión que permitan, por ejemplo acceso adecuado de oxígeno y nutrientes durante la fase de proliferación inicial, y que permite la transferencia de toxinas y metabolitos, productos destoxificados y proteínas fuera de las células para el retorno a un paciente durante el uso en línea en la perfusión extracorpórea. A este respecto, el sistema del solicitante, se beneficia del uso de perlas de gel de alginato no recubiertas que minimizan las barreras de difusión. También comprende una geometría adecuada para ser utilizada en una circulación extracorpórea humana, permitiendo que un número adecuado de células se contenga en un volumen que pueda ser perfundido factiblemente en un dispositivo para uso humano. Si es necesario, se puede utilizar más de una cámara en paralelo.

25 El flujo sanguíneo a través de la vena porta es de 1200 ml/min en el hombre y, por lo tanto, idealmente el plasma debe circular a través de la cámara a un caudal proporcional a las condiciones in vivo para el régimen de tratamiento. Trabajos previos han indicado que un caudal de 400 ml/min puede ser adecuado para esta etapa, por lo que pueden utilizarse índices de flujo de 50-1200 ml/min.

30

REIVINDICACIONES

1. Un componente (100) biológico para un hígado bioartificial, que comprende:
 - i. un agente formador de matriz que comprende perlas de alginato,
 - 5 ii. una pluralidad de células encapsuladas en las perlas de alginato, comprendiendo las células una línea celular humana proliferante que exhibe un fenotipo de hepatocitos y
 - iii. uno o más modificadores de la densidad encapsulados en las perlas de alginato, para controlar la densidad para la fluidización,

10 caracterizado porque las células se hicieron crecer en un reactor de lecho fluidizado en un medio de cultivo suplementado con 2-20% de plasma humano y que, las células están presentes en el agente formador de la matriz a una densidad de más de 3×10^7 células/ml, mantienen una arquitectura de células casi cuboidales, tienen una organización célula a célula y célula a matriz cerrada y excretan proteínas de matriz extracelular y un amplio repertorio de proteínas secretadas específicas del hígado.
2. Un componente (100) biológico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde las células son una línea celular Hep G2 con o sin modificación genética.
- 15 3. Un componente (100) biológico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde las perlas de alginato tienen un diámetro de 300-1200 μm .
4. Un método de cultivo de una pluralidad de células que comprende una línea celular humana proliferante que exhibe un fenotipo de hepatocitos con una competencia de rendimiento en un agente formador de matriz que comprende perlas de alginato que contienen uno o más modificadores de densidad para controlar la densidad de fluidización, tienen una organización célula a célula y célula a matriz cerrada y excretan proteínas de matriz extracelular y un amplio repertorio de proteínas secretadas específicas de hígado, caracterizado porque las células se hacen crecer en un reactor de lecho fluidizado en un medio de cultivo suplementado con 2 -20% de plasma humano.
- 20 5. Un método como se reivindica en la reivindicación 4, en donde en el plasma humano hay plasma humano congelado fresco empobrecido de leucocitos.
- 25 6. Un método como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el plasma humano congelado fresco contiene heparina.
7. Un método como se reivindica en la reivindicación 6, en donde la heparina está presente en una cantidad de -40 unidades/ml.
- 30 8. Un hígado (200) bioartificial que comprende una cámara (10) llena con un componente (100) biológico que comprende:
 - i. un agente formador de matriz que comprende perlas de alginato,
 - ii. una pluralidad de células encapsuladas en las perlas de alginato, comprendiendo las células una línea celular humana proliferante que exhibe un fenotipo de hepatocitos y
 - 35 iii. uno o más modificadores de la densidad encapsulados en las perlas de alginato, para controlar la densidad para la fluidización,

40 caracterizado porque las células se hicieron crecer en un reactor de lecho fluidizado en un medio de cultivo suplementado con 2-20% de plasma humano y que, las células están presentes en el agente formador de la matriz a una densidad de al menos 3×10^7 células/ml, mantienen una arquitectura de células casi cuboidales, tienen una organización célula a célula y célula a matriz cerrada y excretan proteínas de matriz extracelular y un amplio repertorio de proteínas secretadas específicas del hígado.
9. Un hígado (200) bioartificial como se reivindica en la reivindicación 8, que comprende de 3×10^{10} a 1×10^{11} células competentes en un volumen de menos de 2 litros.
10. Un hígado (200) bioartificial como se reivindica en la reivindicación 9, que comprende 3×10^{10} células competentes en un volumen de menos de 1 litro.
- 45 11. Un hígado (200) bioartificial como se reivindica en la reivindicación 9, en donde la cámara comprende un soporte (2) de lecho fluido, una entrada (16) de fluidización y una salida (18) de fluidización.
12. Un método escalable para hacer proliferar células que comprende una línea celular humana proliferante que exhibe un fenotipo de hepatocito sembrado en un agente formador de matriz que comprende perlas de alginato que contienen uno o más modificadores de densidad para controlar la densidad para fluidización, que comprende:

a. colocar las células sembradas en el agente formador de matriz en una cámara que tiene un lecho fluidizado, y

b. hacerlas crecer hasta la competencia de rendimiento de tal manera que mantienen una arquitectura de células casi cuboidal, tengan una organización célula a célula y célula a matriz cerrada y excreten las proteínas de la matriz extracelular y un gran repertorio de proteínas secretadas específicas del hígado, en un medio de cultivo suplementado con 2- 20% de plasma humano.

5

13. Un componente biológico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el uno o más modificadores de densidad están en forma de perlas de vidrio.

14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el uno o más modificadores de densidad están en forma de perlas de vidrio.

10

15. Un hígado bioartificial de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el uno o más modificadores de densidad están en forma de perlas de vidrio.

16. Un método escalable de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el uno o más modificadores de densidad están en forma de perlas de vidrio.

Fig 1a

FCS (Día 5)

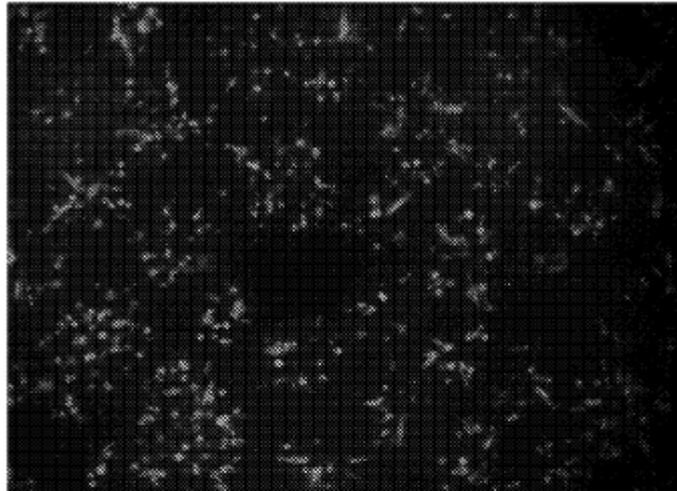


Fig 1b

FFP (Día 5)

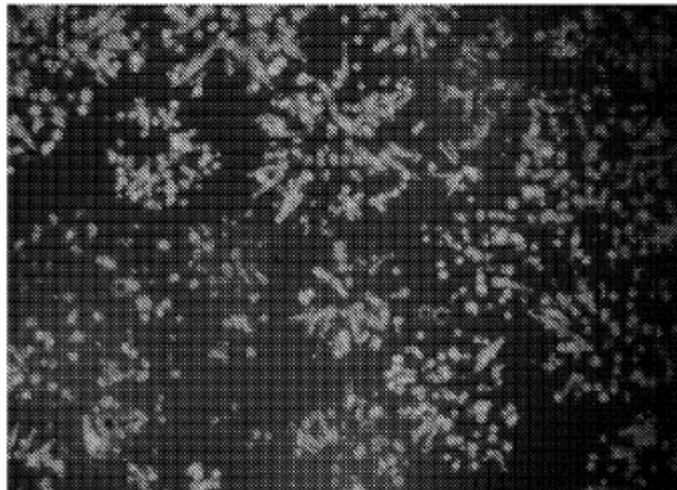


Fig 2

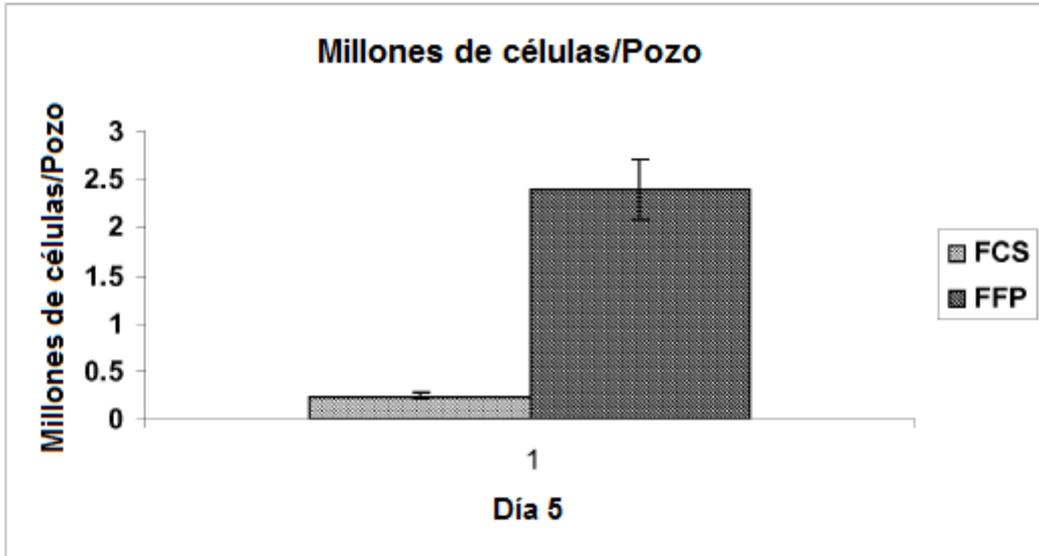


Fig 3

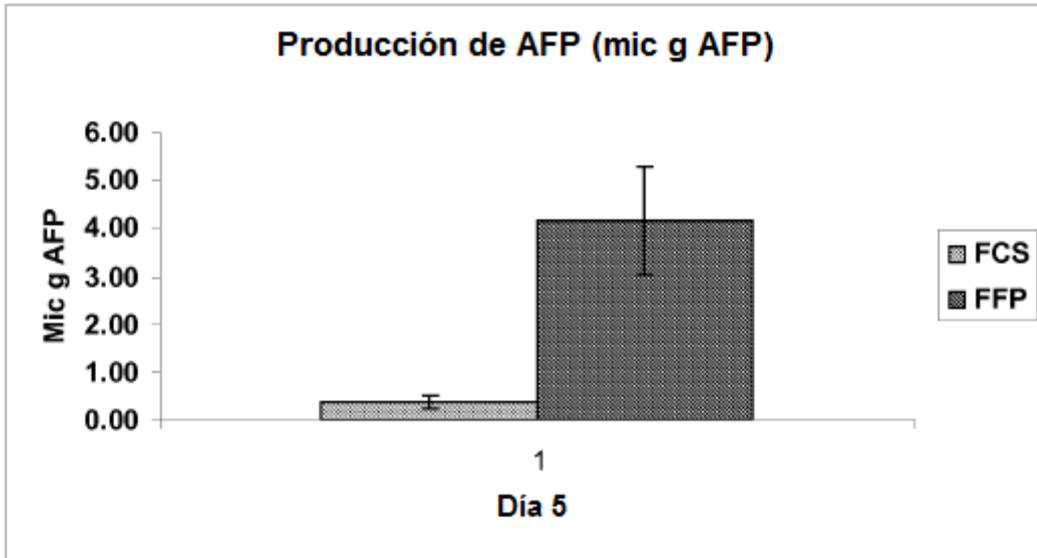


Fig 4

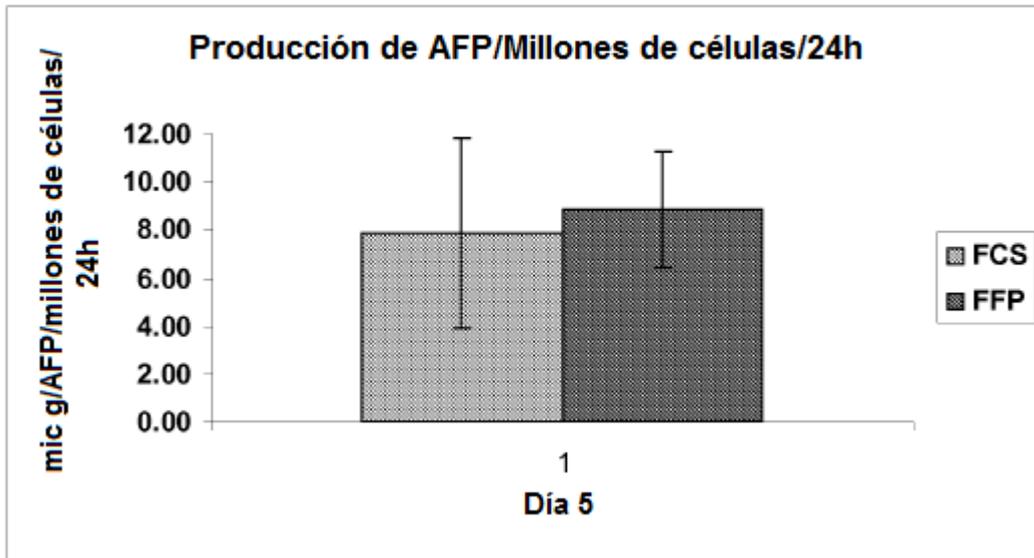


FIG 5a

Con vida (Día 7) 1.2×10^7 células/ml

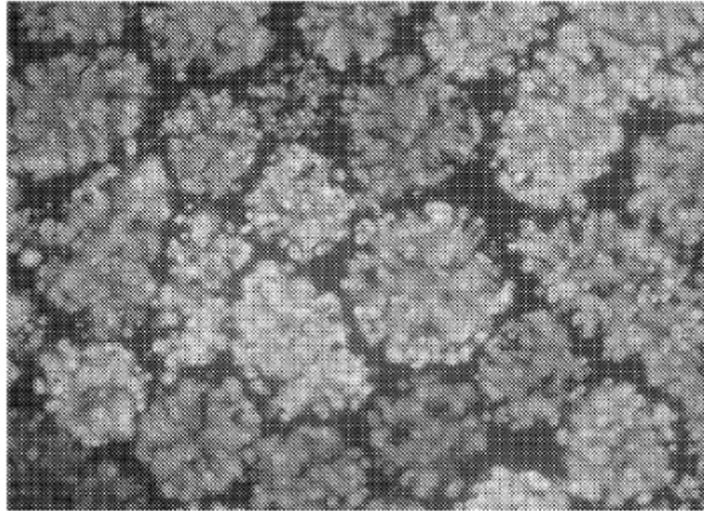


FIG 5b

Contraste de fase (Día 7) 1.2×10^7 células/ml

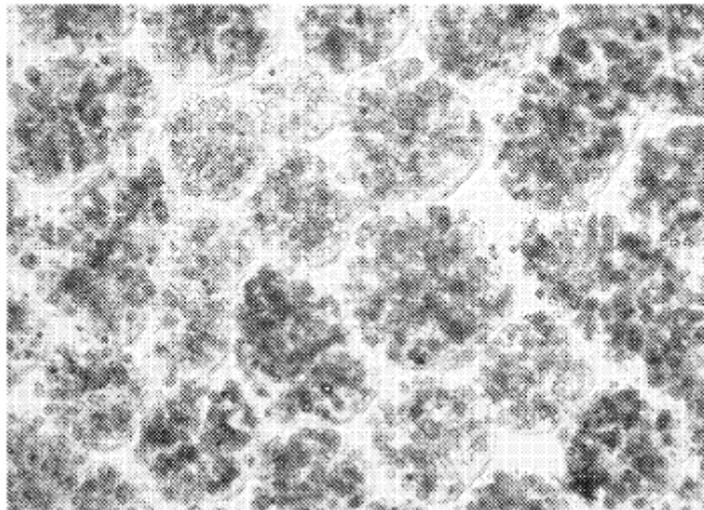


FIG 6

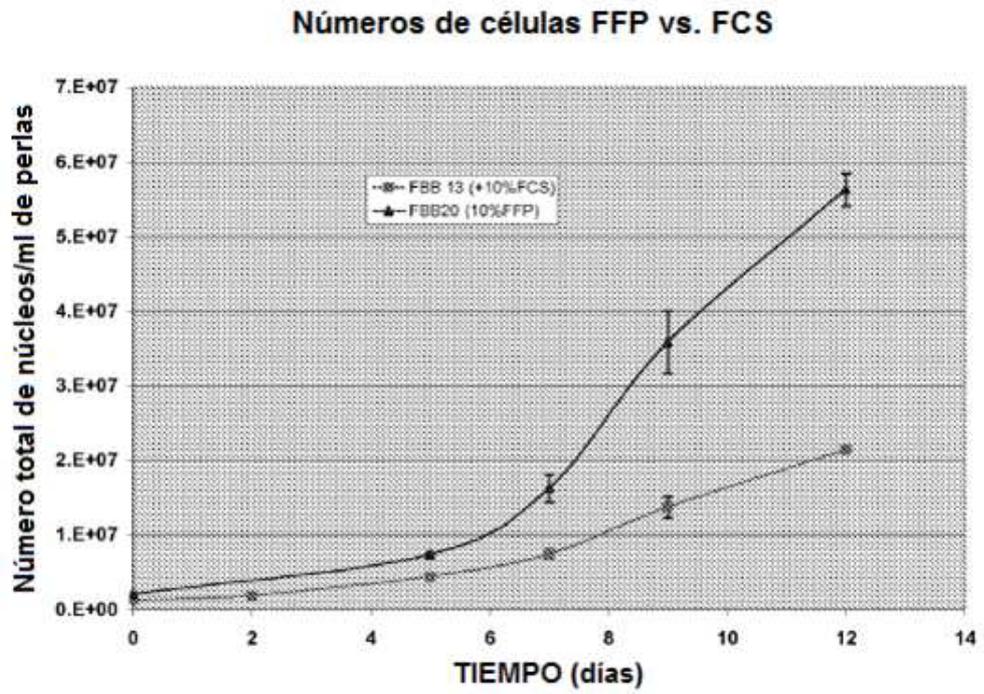


Fig 7

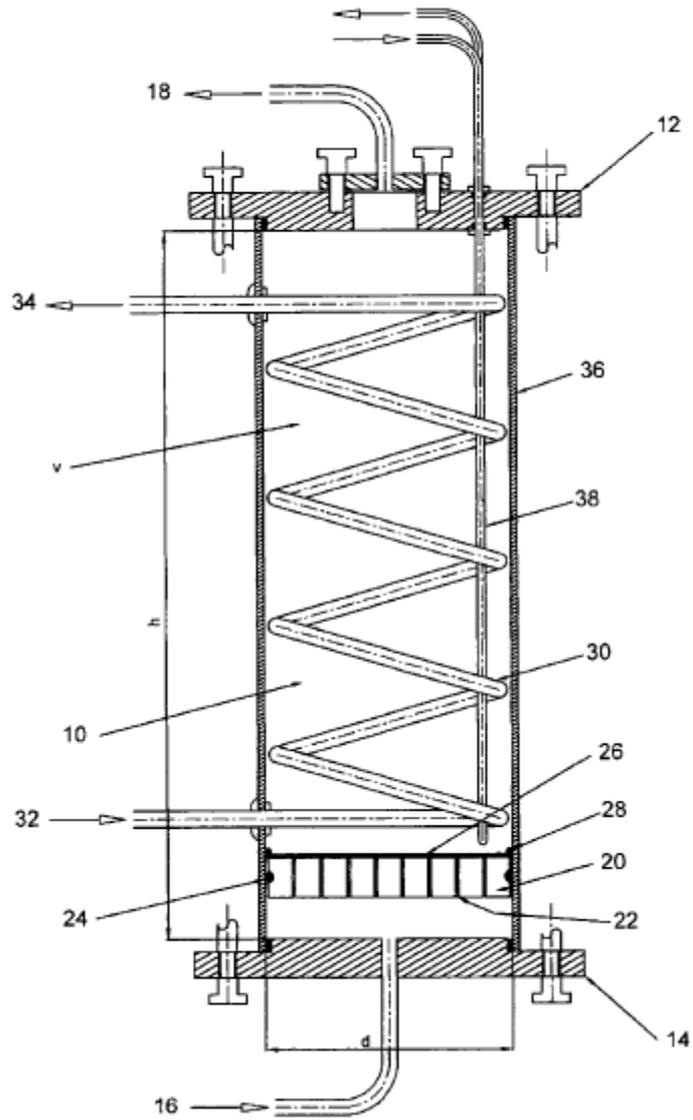


Fig 8a y 8b

Fig 8a

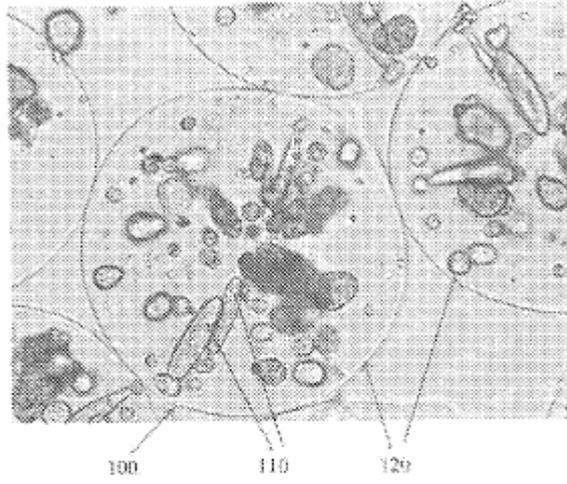


Fig 8b

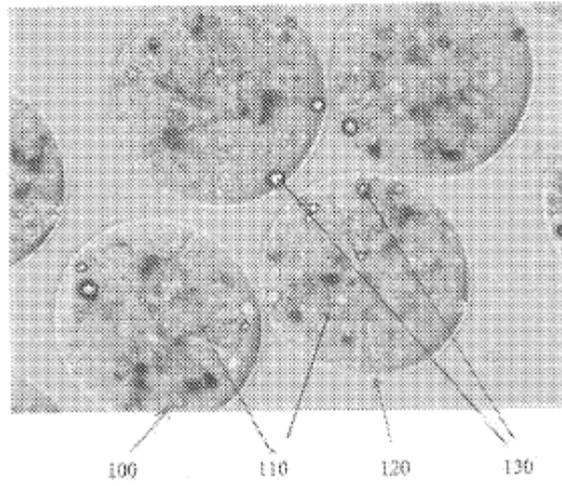


Fig 9a y b

Fig 9a

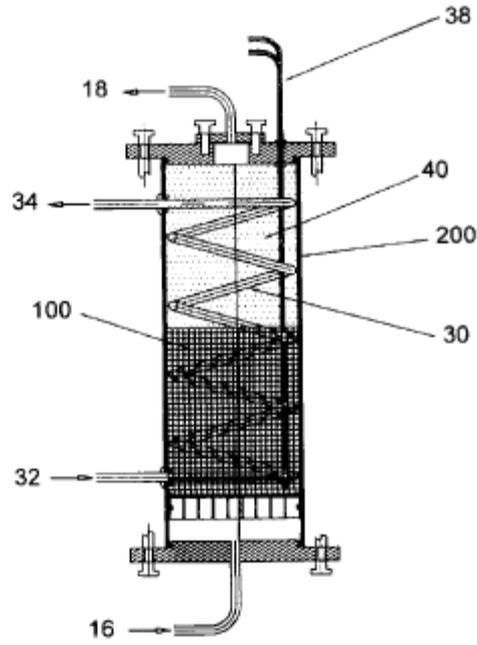


Fig 9b

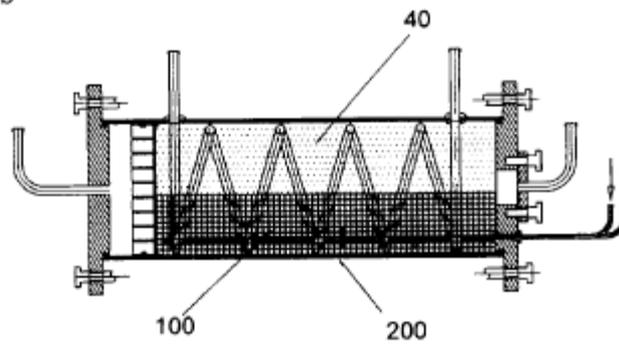


Fig 10

