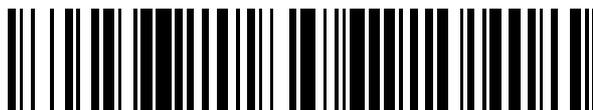


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 888**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
A61M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008** **E 12004762 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 2505220**

54 Título: **Método de proliferación de células derivadas de hepatocitos humanos**

30 Prioridad:

06.07.2007 GB 0713595

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

08.05.2018

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:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 666 888 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de proliferación de células derivadas de hepatocitos humanos

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al campo de la perfusión hepática extracorpórea y, más particularmente, a las etapas metodológicas asociadas con el desarrollo de un hígado bioartificial.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad, el trasplante es la única cura para la hepatopatía aguda y crónica y la insuficiencia hepática. No obstante, este tratamiento está limitado por la ausencia de órganos de donantes. Tan solo en Estados Unidos, se encuentran 17.000 pacientes en la lista de espera de trasplantes. Muchos de ellos 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 morirá mientras que su propio hígado recupera suficiente funcionalidad para la supervivencia del paciente.

20 Existen dos tipos principales de máquinas hepáticas:

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

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

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

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

- Desintoxicación,
- Biotransformación,
- 35 - 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.

40

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

45 En cambio, los hígados bioartificiales (BAL) contienen un componente biológico, es decir, hepatocitos, en solitario o junto 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, desintoxicación y metabólicas, que los dispositivos únicamente mecánicos siempre serán inadecuados para reemplazar la gama 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 determinadas ocasiones, cortes de hígado, y los sistemas han usado tanto células humanas como animales (más a menudo porcinas).

50

55 La mayoría de los primeros BAL usaban cartuchos de fibra hueca en los que las células se separaban o la sangre entera con una membrana. El tamaño de los poros de la membrana difería de un sistema a otro, algunos se limitaban a la transferencia de moléculas <10.000 Da, algunos con un tamaño de poro de hasta 2 micrómetros.

Más recientemente han surgido otras configuraciones que abordan mejor las limitaciones de la transferencia de

masa. Incluyen:

- 5 - Un AMC-BAL que contiene células adheridas a una matriz de poliéster que está expuesta directamente al plasma oxigenado, (Flendrig LM, LaSoe JW, Joming 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).
- 10 - Un biorreactor de tejido sin tejer, (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
- 15 - 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 of porcine hepatocyte aggregates under simulated microgravity. Artif.Organs 2005; 29: 58-66).

Los ejemplos anteriores usan hepatocitos de animales.

20 Los ejemplos de reactores con células humanas incluyen los que usan:

- 25 - 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).
- Cartuchos de fibra hueca que usan líneas celulares derivadas de tumores bien diferenciados, 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
- 30 - Un biorreactor de lecho fluido con células C3A humanas encapsuladas a gran densidad (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 en todo el mundo están trabajando con diferentes componentes biológicos, incluyendo:

- El uso de cultivos primarios de hepatocitos humanos;
- El uso de cultivos primarios de hepatocitos de cerdo; y
- 40 - El uso de células C3A, una línea celular proliferativa derivada inicialmente de un tumor bien desarrollado de hepatocitos humanos.

Hay diferencias fundamentales entre los sistemas que usan líneas celulares proliferativas y los que usan células primarias. Las líneas celulares proliferativas se pueden sembrar de forma individual y múltiple *in situ*, para formar esferoides cohesivos durante un periodo de tiempo, que depende del tiempo de suplicación de un tipo celular específico. En cambio, las células primarias, incluso si se siembran 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 regulación ascendente de la función, ya que imita la situación *in vivo*.

50 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 usado previamente en:

- 55 - Una "configuración de cultivo de cartuchos de fibras huecas", o
- "Sin cultivar", en un lecho fluido en perlas de alginato de baja ocupación.

Esto contrasta con la metodología usada por el solicitante, que usa una matriz de alginato sin revestir en una

configuración de biorreactor de lecho fluido con precultivo de células encapsuladas para que tengan buena calidad.

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 en una base por célula, que se acerca a la observada *in vivo* para varias de las funciones clave del hígado, incluyendo:

- Síntesis de factores de coagulación;
- 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, de los que es pionero el solicitante:

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

- Las células que proliferan en este medio mantienen una arquitectura celular casi cuboide;
- Tienen una estrecha organización intercelular y celulomátricial; y
- Secretan proteínas de la matriz extracelular y un gran repertorio de proteínas secretadas específicas del hígado, como se ilustra mediante:
- Albúmina,
- Protrombina,
- Fibrinógeno,
- Alfa 1-antitripsina, y
- Glucoproteína alfa 1 de ácido.

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

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, incluyendo 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. Por lo tanto, sin modificar, es poco probable que dichas células sean beneficiosas para el tratamiento de la encefalopatía dependiente del amonio debida a insuficiencia hepática. Usando transferencia génica para reemplazar dos enzimas ausentes, han demostrado que se restaura la producción de urea a partir de amonio en sus clones de 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).

También las han caracterizado extensamente con respecto a una función hepática específica, como se describe en:

- 5 - (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
 10 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)

15 (Referencia a todo lo anterior) y

- 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
 20 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 demostrado que muestran 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
 30 xenogeneic model. *Artif.Organs* 2004; 28: 476-482; y
 - Rahman TM, Selden AC, Hodgson HJ. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J Surg.Res.* 2002; 106: 264-272.

35 Además, han demostrado un mejor rendimiento por perla por cultivo en un sistema de cultivo celular rotativo (RCCS) en condiciones de microgravedad simulada:

- 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
 40 (Referencia a lo anterior); 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. Presentado en el World Congress of Biomechanics, 29 de julio-4 de agosto de 2006 en Munich, Alemania.

45 También han analizado el rendimiento de este sistema en el plasma humano normal y en el plasma recogido 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.

55 Sin embargo, el uso del componente biológico a gran escala, a partir de un tamaño a escala de laboratorio, que implica un volumen de no más de 70 ml de perlas de alginato, proporciona retos significativos, algunos de los cuales se abordan en el presente documento, cuyas soluciones pueden formar la base de reivindicaciones independientes. Por lo tanto, por ejemplo, el componente biológico del sistema extracorpóreo debe:

- Estar preparado para las normas de buenas prácticas de fabricación (GMP),
- Ser fácilmente transportable a los centros donde se hospitalizarán los pacientes,

- Tener un envase cómodo para el almacenamiento, transporte y carga en un sistema de perfusión;
- Poderse mover desde la "fábrica de células" a la "hospital" para su uso en la circulación extracorpórea.

El documento US 6.218.182 muestra un biorreactor de ingeniería tisular para hacer crecer el tejido en tres dimensiones, en el cual las células se siembran 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.

Un objetivo de la presente descripción fue desarrollar una cámara, dimensionada para uso humano, en la que el solicitante puede incorporar su componente biológico, u otro, para formar un hígado bioartificial que pueda proporcionar beneficio a los pacientes, pero que pueda usarse también para imitar un hígado en los estudios de metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. En el último caso, no necesariamente habría necesidad de crioconservar las células.

El 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:

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

20 PRESENTE INVENCION

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

También se describe en el presente documento una cámara para el componente biológico de un hígado bioartificial que comprende un soporte de lecho fluido, 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*, y
- 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, mucho más preferiblemente células Hep G2;
- Un agente formador de matriz, mucho más preferiblemente perlas de alginato; y
- Un agente de control de densidad, mucho más preferiblemente perlas de vidrio.

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

La encapsulación proporciona varias funciones:

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

El solicitante ha descrito que tales células encapsuladas de alginato pueden ser adecuadas para la extensión a escala - Coward et al Poster abstract Dec 4-5 2006

La cámara sirve de reactor de lecho fluido y comprende:

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

El concepto general de usar un lecho fluido para la perfusión se ha descrito también previamente - Legallais et al, Artificial Organs 24(7): 519-525. Sin embargo, no se ha sugerido previamente que un lecho fluido se pueda usar

beneficiosamente en la fase de proliferación ni con esferoides celulares, solo con suspensiones de células individuales encapsuladas.

5 El soporte del lecho fluido comprende preferiblemente una placa que está dotada de una pluralidad de orificios 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, por ejemplo, un anillo de alambre. La placa se sella dentro de la cámara mediante, por ejemplo, una junta tórica.

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 significativo por dos razones:

10

En su posición derecha (vertical), tal relación de aspecto proporciona un entorno óptimo (características de la relación de masa/volumen) para la proliferación celular inicial y para su uso, es decir, para la transferencia de oxígeno y nutrientes a las células y para la transferencia de proteínas desde las células a, por ejemplo, el plasma o medio de cultivo. También facilita el intercambio del medio antes de la crioconservación. (Congelación/descongelación rápida de las células).

15

En su posición horizontal (en particular cuando la relación 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 un calentamiento/enfriamiento mejor (con una alteración mínima de la fluidización) debido a la posición desplazada lateralmente de los elementos de intercambio térmico respecto al volumen de la cámara principal.

20

Para abordar adicionalmente el problema de obtener suficiente oxígeno para las células, en un dispositivo a escala para uso humano (típicamente uno de un tamaño de un volumen de 1 - 10 litros capaz de contener 0,5 - 5 l de un componente biológico y que debe ser capaz de permitir una expansión de hasta el doble del volumen en la fluidificación), comprendiendo adicionalmente la cámara un sistema de transporte de fluido dispuesto en la misma. El sistema de transporte de fluido tiene una función principal de transportar gas al componente biológico, pero puede tener adicionalmente una función secundaria de transporte de un líquido de calentamiento o enfriamiento. Para facilitar su función principal, está fabricado de un material permeable a los gases y se dispone dentro de la cámara de una manera que garantiza que no se acumule un gradiente perjudicial de oxígeno, durante el uso, desde la entrada a la salida.

30

En una realización favorita, el sistema de transporte de fluido se dispone helicoidalmente alrededor de las paredes internas de 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 "amortiguador" durante la crioconservación, proporciona adicionalmente de este modo un grado de protección al componente biológico encapsulado.

40

También se describen en el presente documento un dispositivo de hígado bioartificial que comprende una cámara llena de un componente biológico.

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

45

También se describe en el presente documento un método de perfusión de plasma que comprende introducir plasma o sangre en un dispositivo de hígado bioartificial de tal forma que entre en la cámara a través de la salida y salga por la salida.

50

También se describe en el presente documento 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:

55

- i. Preparar el agente formador de matriz;
- ii. Sembrar el agente formador de matriz con una pluralidad de células;
- iii. 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 conformada 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 siembra con $0,5 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^6$ células por ml de alginato, el modificador de densidad son partículas de vidrio, la boquilla conformada tiene una sección transversal circular y tiene un diámetro de 250-450 μm , y la corriente se corta con discos de alambre a una velocidad de 3000 a 4000 rpm.

También se describe en el presente documento un método escalable para la proliferación de las células sembradas en un agente formador de matriz que comprende:

1. Colocar las células sembradas en el agente formador de matriz en una cámara que tiene un lecho fluido, y
2. Dejarlas crecer para que el rendimiento sea el idóneo.

También se describe en el presente documento un método para crioconservar las células proliferadas en una cámara que comprende un lecho fluido y uno o una pluralidad de elementos de intercambio dispuestos en la misma:

1. Intercambiar el crioprotector con las células proliferadas en la cámara;
2. Poner la cámara horizontalmente para permitir la distribución de las células proliferadas a lo largo de la longitud (h) de la cámara; y
3. Enfriar rápidamente las células proliferadas al hacer pasar un refrigerante a través de los elementos de intercambio térmico.

También se describe en el presente documento un hígado bioartificial a escala para su uso en estudios de metabolismo de fármacos y/o toxicidad hepática que comprenden una cámara escalable llena de un componente biológico.

Los diversos aspectos de la descripción 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 en sección transversal de una realización de una cámara como se describe en el presente documento;
 las figuras 2A y 2B son imágenes de contraste de fases del componente biológico;
 la figura 3A es una vista en sección transversal de un BAL en la posición vertical (uso general);
 la figura 3B es una vista en sección transversal de un BAL en la posición horizontal (crioconservación); y
 la figura 4 muestra un BAL en un circuito para el uso en línea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción proporciona una cámara "funcionalmente modular" en la que se pueden alojar y manipular las células epiteliales, por ejemplo, hepatocitos, a través de diversas fases de "desarrollo/ciclo de vida". Por lo tanto, por ejemplo, los hepatocitos se pueden, de forma seriada:

- Cultivar para que tengan un buen rendimiento;
- Crioconservar; y
- Utilizar

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

Por lo tanto, 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 con buen rendimiento;
- 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 extracorpóreo unido al

paciente.

Por lo tanto, mientras que la cámara (Sección 1.0) es fundamental para la descripción, también se necesita un componente biológico (Sección 2.0) para formar un dispositivo de hígado bioartificial (Sección 3.0) que se puede usar para perfundir a un paciente (Sección 4.0).

Para realizar el sistema, era independientemente necesario desarrollar métodos escalables para:

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

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

Adicionalmente, y a una escala similar, el desarrollo de hepatocitos humanos encapsulados en alginato que expresan un alto nivel de enzimas que metabolizan fármacos específicas de los hepatocitos, opcionalmente preparadas en una forma transportable y crioconservada, ofrece una herramienta valiosa para los estudios del metabolismo de los fármacos y de la hepatotoxicidad.

1.0 CÁMARA VACÍA

En relación con la figura 1, la cámara (10) es generalmente 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 1-10 litros, más preferiblemente de 1-5 litros.

Está fabricada de un material que se puede esterilizar (por ejemplo, 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 estos materiales biológicos y soluciones que contendrán, por ejemplo, sangre, plasma, solución salina, crioconservantes, medio de cultivo, etc.

Es una unidad sellable que comprende un alojamiento con una pared cilíndrica (36) contenido por las placas superior e inferior (12, 14). Dado que, en al menos un modo de operación, funciona como un lecho fluido, 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 crioprotectores. Un soporte de lecho fluido (20) que comprende una pluralidad de orificios colocados en orden (22), que ayudan a controlar la fluidización, se mantiene en su sitio mediante una junta tórica (24) en el extremo más bajo de la cámara. Se dispone sobre el soporte de lecho fluido un filtro de malla (26) 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 fases de la fluidización y uso.

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 de lecho fluido (20) y sale de la cámara por la salida (34) hacia la placa superior (12). El sistema de transporte de fluido adopta la forma de un tubo que se dispone preferiblemente de forma helicoidal y, en un patrón regular, alrededor de la pared interna (36) del cilindro, aunque son posibles 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, por ejemplo, polímeros que son permeables a los gases, que no son tóxicos y que pueden resistir las temperaturas que se experimentarán durante la operación. El material también debe mostrar un 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 del mismo.

Finalmente, la cámara comprende una o una pluralidad de elementos de intercambio térmico (38) que en una realización descienden a través de la placa superior (12) hasta la cámara justo por encima del soporte de lecho fluido (20). Estos elementos se disponen 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, minimizando al mismo tiempo su efecto sobre la fluidización. Para este fin, en una realización preferida, los

elementos de intercambio térmico (que en una realización comprenden varillas huecas fabricadas hechas de, o revestidas con, titanio y aleaciones del mismo para maximizar 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/calentar con eficacia 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 se corroan, por ejemplo, por la solución salina.

En una organización alternativa, una o una pluralidad de elementos de intercambio térmico (38) pueden atravesar directamente las placas superior e inferior en una trayectoria recta. Tal disposición 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.

Como se ha insinuado anteriormente con referencia a los elementos de intercambio térmico (38) y el sistema de transporte de fluido (30), la "aplicación a gran escala" trae consigo el problema de garantizar el suministro de, por ejemplo, oxígeno y nutrientes, a las células y el intercambio de, por ejemplo, proteínas, desde las células a, por ejemplo, la sangre/plasma. Por consiguiente, para facilitar 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 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 la sección 2.0.

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

2.0 COMPONENTE BIOLÓGICO

Con referencia a las figuras 2A y 2B, el componente biológico (100) comprende una pluralidad 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 densidad (130) en forma de perlas de vidrio.

Las células individuales están encapsuladas para conseguir aproximadamente 18 a 25 millones de células por mililitro de perlas a buen rendimiento.

Este sistema de encapsulación tridimensional en alginato puede, por supuesto, usarse 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 BIO-ARTIFICIAL (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 usarse en un circuito de perfusión extracorpórea (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), por ejemplo, plasma, para funcionar esencialmente, pero de forma temporal, como un hígado (es decir, ajustarse al propósito). Para este fin, ya que la cámara funciona como un lecho fluido, el componente biológico se fluidizará y, por lo tanto, la capacidad de la cámara debe tener un volumen de aproximadamente 1,2 a 2 veces el volumen de perla añadido.

Obviamente, el volumen de perla 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).

Por lo tanto, deberá comprender esferoides de células de buen rendimiento en perlas de alginato al 1-2%, de una densidad que permitirá la fluidización en el plasma humano. Los esferoides de células de buen rendimiento tendrán

que cultivarse durante 8-12 días y contendrán cualquier valor de 18-60 millones de células por ml de perlas.

Para conseguirlo, se usará una producción de ~1 billón de células (1×10^9) para sembrar cada 500-666 ml de perlas de alginato, y múltiplos de las mismas, de tal manera que la cámara contendrá entre 3×10^{10} a 1×10^{11} células de buen rendimiento.

Las perlas de alginato (120) tendrán un diámetro medio de entre 300 - 1200 μm , preferiblemente 400 μm , y contendrá adicionalmente perlas de vidrio (130) con un diámetro medio de entre 10 - 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), ya sea medio de cultivo (durante la proliferación), fluido isotónico (antes del uso), plasma (antes y durante la perfusión) o crioprotector (después de la proliferación, al almacenarse) dependiendo de la fase de uso.

Durante el uso, la cámara inicialmente se fluidizará a caudales de entre 50 ml/min y 1200 ml/min para conseguir una expansión del 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 retos, incluyendo la necesidad de desarrollar métodos escalables y un entendimiento de cómo funcionarán los materiales biológicos en los volúmenes necesarios para su uso en 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.

De forma significativa, el solicitante ha podido demostrar ahora, a una escala de hasta 200 ml, que este diseño de cámara de lecho fluido de un dispositivo BAL, que utiliza esferoides tridimensionales de líneas celulares derivadas de hígado humano, puede conseguir un rendimiento metabólico comparable al encontrado *in vivo* y en los hepatocitos primarios.

Por ejemplo, la toma de muestras del depósito 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);
- secreción de albúmina que demuestra valores del mismo orden de magnitud que los encontrados *in vivo*, es decir, $12 \text{ g}/10^{12}$ hepatocitos/día; y (utilizando sondas de oxígeno que miden el oxígeno disuelto)
- un consumo de oxígeno de aproximadamente 19 μmoles de $\text{O}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas.

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

El solicitante ha desarrollado adicionalmente un medio para almacenar perlas de buen rendimiento durante hasta 3 días a temperatura y presión a una relación de perlas por medio de alta a media mediante el uso de perfluorodecalina saturada con oxígeno (un vehículo de oxígeno con una saturación mucho más elevada que la solución acuosa).

Esto es importante ya que permitirá que los fabricantes "descongelen" un dispositivo que contiene células con buen rendimiento y enviarlo directamente a un usuario (que no necesitará descongelar el dispositivo en el momento de usarlo), lo que facilita su uso y lo hace menos propenso a errores de uso.

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

4.0 MODIFICACIÓN PARA EL USO DEL PACIENTE EN LÍNEA

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).

Por lo tanto, durante el uso, el BAL (200) se conectará a un paciente de tal manera que el plasma (40) entra en la cámara (10), por ejemplo, por la entrada (16) y sale, por ejemplo, por la salida (18).

Con referencia a la figura 4, se perfunde la 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 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 esencialmente, la sangre pasará a través de un monitor de tensión arterial (52), se separará el plasma y se impulsará por bombeo (54) al BAL (200) a través de una bomba de heparina (56) y un monitor de presión del flujo de entrada de perfusión (58). 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 abandonar el BAL, el plasma pasa a través de un cartucho de retirada de ADN (60), se vuelve a introducir 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 regresar al paciente.

10

Preferiblemente, el cartucho de retirada de ADN comprende fibras huecas microporosas con poros de 1 μm para conseguir un corte de peso molecular de 2 millones de Dalton.

El cartucho también deberá contener un casete de unión a ADN compuesto por la enzima desoxirribonucleasa I
15 inmovilizada para escindir el ADN en di- y trinucleótidos.

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

20 Un hígado normal contiene aproximadamente $\sim 1 - 2 \times 10^{11}$ hepatocitos y se necesita aproximadamente $\sim 15\%$ de la masa de un hígado normal para mantener vivos a los individuos que, por lo demás, están bien ($1,5 - 3,0 \times 10^{10}$).

Por consiguiente, el sistema del solicitante se ha desarrollado con el objetivo 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
25 parámetros de difusión que permitan, por ejemplo, el acceso adecuado del oxígeno y de los nutrientes durante la fase de proliferación inicial, y que permita la salida de toxinas, y metabolitos, en productos desintoxicados, y de proteínas de las células para regresar 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 sin revestir que minimizan las barreras de la difusión. También comprende una geometría adecuada para su uso en una circulación extracorpórea
30 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.

El flujo de sangre 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 un caudal equiparable a la de las condiciones *in vivo* para el régimen del
35 tratamiento. El trabajo anterior ha indicado que, para esta etapa, puede ser adecuado un caudal de 400 ml/min, por lo que se puede usar cualquier caudal que varíe de 50-1200 ml/min.

5.0 FABRICACIÓN DEL COMPONENTE BIOLÓGICO

40 5.1 ESCALA DE LABORATORIO

A escala de laboratorio, el solicitante empleó una técnica que usaba la vibración para causar la formación de gotículas de la suspensión de células y alginato. Teóricamente, podría haberse utilizado una máquina con varias boquillas basada en el mismo principio para conseguir la aplicación necesaria a gran escala, pero tal método
45 también amplificaría los problemas inherentes de esta tecnología, incluyendo el bloqueo de la boquilla y una corriente inestable.

Para superar estos problemas, el solicitante ha desarrollado una metodología escalable que se describe a continuación:

50

5.2 GRAN ESCALA

El solicitante ha realizado pruebas 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 de
55 300-5000 μm , y, sorprendentemente, la presión requerida (2-25 psi) no ha resultado ser perjudicial para la viabilidad celular.

Para optimizar un productor de gotículas Jetcutter construido a medida para la escala necesaria para uso clínico (se estima basándose en una función hepática del 30% - 1,5-5 l de perlas de alginato), se determinó que las siguientes

condiciones eran las preferidas:

- Velocidad de agitación: 50 - 200 rpm,
- Administración de presión/corriente: 2-15 psi;
- 5 - Caudal: 15 - 30 ml/min;
- Velocidad de corte: 3000 - 4000 rpm usando 60 - 100 discos de alambre; y
- Tamaño de la boquilla: 350 μm (intervalo de 250 μm - 450 μm) y de forma circular.

10 El alginato se sembró con 0,5 - 3 millones/células por ml de medio con alginato y se densificó con partículas de vidrio de un diámetro de 10 - 50 μm en una cantidad del 1-5% p/v que conseguirá que estén en suspensión continua cuando se perfunden en el plasma humano.

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

Además, se estableció un método para mantener una concentración de cloruro de calcio de 0,17 M 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 0,15 M) para 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 en el baño permanece constante.

25 Se usó medio de cultivo para equilibrar las perlas antes de introducirlas en la cámara del biorreactor multifuncional.

A continuación se presentan más detalles de la metodología:

30 5.2.1 Encapsulación de células HepG2 en alginato usando un sistema GeniaLab JetCutter

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

35 El material puede fabricarse como se indica a continuación:

- 40 1) En un vaso de precipitados de vidrio o de propileno de 1-5 l, con un agitador magnético, las células HepG2 u otras células adecuadas se añaden a una mezcla 1:1 de medio de cultivo α -MEM y el 2% de alginato a la densidad de siembra necesaria (0,5 - 3,0 x 10⁶ células/ml);
- 2) se añaden al 2-5% p/v de perlas de vidrio de 10-50 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;
- 45 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 pueden usar velocidades de 50-200 rpm;
- 5) Para aplicar presión se usa una tubería de aire comprimido (comienza a aproximadamente 0,25 bar). El grifo sobre la salida del recipiente de presión se abre para que comience a fluir a través del encapsulador;
- 50 6) La corriente resultante se recoge en un cilindro de 25 ml durante 45 s para medir el caudal.
- 7) La presión del aire de entrada se ajusta hasta el caudal = 0,33-0,35 ml/s;
- 8) El JetCutter se ajusta para cortar la corriente. Los parámetros de funcionamiento típicos incluirán: caudal = 0,33 ml/s, tamaño de la boquilla = 350 μm , número de alambres = 60, diámetro del alambre = 100 μm , velocidad del motor = 3600 rpm;
- 55 9) El software 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 sobresalga por encima del borde 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 entrada en una botella que contiene una solución concentrada de cloruro de calcio en NaCl 0,15 M (la concentración recomendada de CaCl₂ es del 70%). La velocidad de la bomba se fija de acuerdo con el caudal usado en el JetCutter.

11) Se recogen las perlas en el tampón de polimerización.

5.2.2 Recogida y lavado de las perlas acabadas

1) Transferir el filtro a un recipiente estéril de 1-5 l,

2) Aclarar 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) Usar una cuchara de pesada para transferir las perlas a un recipiente graduado y estéril, resuspender en 40 el medio de cultivo α -MEM y dejar que sedimenten las perlas;

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 DE PROLIFERACIÓN CELULAR (ESCALA HASTA 250 ml)

6.1 ESCALA DE LABORATORIO

El solicitante ha demostrado previamente que el valor de un "sistema de cultivo de células en rotación con microgravedad" es ventajoso para la fase de proliferación.

Ahora han determinado que un biorreactor de lecho fluido, en el que 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 descrito previamente.

6.2 GRAN ESCALA

El solicitante ha mostrado un método escalable con 400 ml de perlas, que es compatible con el sistema "modular" descrito en el presente documento. Esto se describe con más detalle a continuación:

6.2.1 Etapas de proliferación inicial para un buen rendimiento

1. El dispositivo (200) se llena con el medio de cultivo (40) hasta el nivel del filtro (26) usando una bomba peristáltica que administra el medio al mismo;

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 depósito de, por ejemplo, un biorreactor Celligen Plus (New Brunswick Scientific) y se devuelve al mismo depósito a través de una sonda de oxígeno disuelto en línea;

5. El caudal usado es tal que se consigue una expansión de 1,2 a 2 veces del lecho empaquetado 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 depósito del medio de cultivo. Esto permite escoger los puntos que garantizarán que el medio introducido al biorreactor de lecho fluido sea óptimo para el crecimiento de las células encapsuladas;

7. Aproximadamente el 50% del volumen del medio de cultivo en el circuito se reemplaza tras las primeras 48-72 horas del cultivo dependiendo de 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.

8. Un casete de enzimas inmovilizadas en contacto directo con la ruta de flujo se introducirá inmediatamente antes que el medio en contacto con perlas que reciclan lactato para proporcionar piruvato

(una fuente de energía) y oxígeno a las perlas. Las enzimas a usar incluirán, pero sin limitación, lactato oxidasa y catalasa.

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

10 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 un buen rendimiento.

7.0 CRIOCONSERVACIÓN

15 7.1 ESCALA DE LABORATORIO

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 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).

7.2 GRAN ESCALA

25

La transferencia térmica durante la crioconservación se conseguirá usando vapor de nitrógeno líquido mediante congelación a una velocidad controlada o mediante vitrificación. La descongelación se conseguirá de forma similar con gas caliente estéril y además líquido caliente bombeado a través del recipiente.

30 Crioconservación a -160 °C

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 se ha intercambiado con los componentes acuosos, todo el sistema se debe enfriar rápidamente a una velocidad controlada de $\sim 1 - 4$ °C/min, o mediante inmersión en nitrógeno líquido a -190 °C; después de un periodo de equilibrio, se debe transferir a una fase de vapor de nitrógeno líquido a -160 °C.

Las perlas que contienen los esferoides funcionales se enfriarán a 0 °C, se expondrán a los crioprotectores, se enfriarán adicionalmente mediante una combinación de líquido enfriado, y nitrógeno líquido para conseguir una congelación de velocidad controlada a ~ -160 °C, donde se almacenarán hasta que se necesiten. La primera etapa se realizará en posición vertical, y la última etapa en posición horizontal.

El crioprotector enfriado previamente se intercambiará (en la posición vertical, figura 3A) con los componentes acuosos de todo el sistema antes del enfriamiento rápido a una velocidad controlada ($\sim -1 - 4$ °C/min) hasta -160 °C. Después de un periodo de equilibrio, se transferirá a una fase de vapor de nitrógeno líquido para la congelación rápida. Esto se hace 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 enfriamiento de nitrógeno líquido se distribuirá a través de tubos de titanio/aleación (38) dispuestos a un lado de la cámara.

50

Descongelación rápida y reestablecimiento de 37 °C y recuperación de la función completa

El aire caliente seguido de líquido caliente (+/- calentamiento en microondas) elevará inicialmente la temperatura a -7 °C, después a 1 °C cuando los crioprotectores se eliminarán mediante el reemplazo del medio de perlas por el medio de cultivo. Posteriormente, 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.

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 recién preparado

inicialmente a 4 °C, antes de la posterior adición de medio nuevo a 37 °C que calentará la cámara a 37 °C con rapidez.

Al igual que será necesario retirar el crioprotector, se hará necesaria una reoxigenación rápida; para conseguir esto, se usarán 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

10

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

15

- La preparación de las células (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 de las células del cultivo en monocapa en suspensión;

- Mezcla de las células con el alginato;

20

- "Encapsulación de células individuales" (aproximadamente de 60-100 por perla) en gotículas de alginato (aproximadamente de 100 - 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;

- Crioconservación de la biomasa de esferoides: Las células de buen rendimiento en las perlas deben estar disponibles para su 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 requiera;

25

- Descongelación de la biomasa de esferoides: la biomasa se debe descongelar y regenerar rápidamente a pleno rendimiento a las 24 - 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.

30

REIVINDICACIONES

1. Un método escalable para la proliferación de células de una línea celular de hepatocitos humanos, que comprende:
- 5
- a) Sembrar células de una línea celular de hepatocitos humanos en un agente formador de matriz de alginato y formar perlas de alginato que comprenden células encapsuladas en matriz; y
- b) Cultivar previamente las células encapsuladas en matriz, en un medio de cultivo en una cámara que tiene un lecho fluido, de manera que formen esferoides cohesivos en una fase de proliferación celular en la que las células encapsuladas en matriz se mantienen en suspensión continua en el medio de cultivo durante 8 a 12 días, y hagan crecer hasta un buen rendimiento de tal manera que mantengan una arquitectura celular casi cuboide, tengan una estrecha organización de célula a célula y de célula a matriz y secreten proteínas de matriz extracelular y un repertorio de proteínas secretadas específicas del hígado.
- 10
2. Un método escalable según la reivindicación 1, en el que la línea celular de hepatocitos humanos comprende células Hep G2.
- 15
3. Un método escalable según la reivindicación 1, en el que las perlas de alginato están polimerizadas.
- 20
4. Un método escalable según la reivindicación 3, en el que las perlas de alginato se polimerizan durante 10-60 minutos en una solución de cloruro cálcico que contiene uno o más tensioactivos.
5. Un método escalable según la reivindicación 1, en el que las perlas de alginato comprenden un alginato no revestido.
- 25
6. Un método escalable según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que las perlas de alginato tienen un diámetro medio de entre 300-1200 μm .
7. Un método escalable según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las celdas encapsuladas comprenden un agente de control de la densidad.
- 30
8. Un método escalable según la reivindicación 7, en el que el agente de control de la densidad son perlas de vidrio.
- 35
9. Un método escalable según la reivindicación 8, en el que las perlas de vidrio tienen un diámetro medio de entre 10-50 μm .
10. Un método escalable según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se usan aproximadamente 1×10^9 células de hepatocitos humanos para sembrar de 500-666 ml de perlas de alginato.
- 40
11. Un método escalable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las células encapsuladas se preparan mediante un método que comprende:
- i. Preparación del agente formador de matriz de alginato;
- 45 ii. Sembrar el agente formador de matriz de alginato con una pluralidad de células de una línea celular de hepatocitos humanos;
- iii. Densificar el agente formador de matriz de alginato con un modificador de densidad de tal forma que las perlas de las células encapsuladas en matriz lograrán una suspensión continua al perfundirse en el medio de cultivo o en plasma humano;
- 50 iv. Pasar las células derivadas de hepatocitos humanos a través de una boquilla conformada para formar una corriente;
- v. Cortar la corriente en perlas; y
- vi. Polimerizar las perlas.
- 55
12. Un método según la reivindicación 11, que comprende de $0,5 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^6$ células por ml de alginato.
13. Un método según la reivindicación 11, en el que la boquilla conformada es circular en sección transversal y tiene un diámetro de 250-450 μm y la corriente se corta con discos de alambre a una velocidad de 3000 a 4000 rpm.

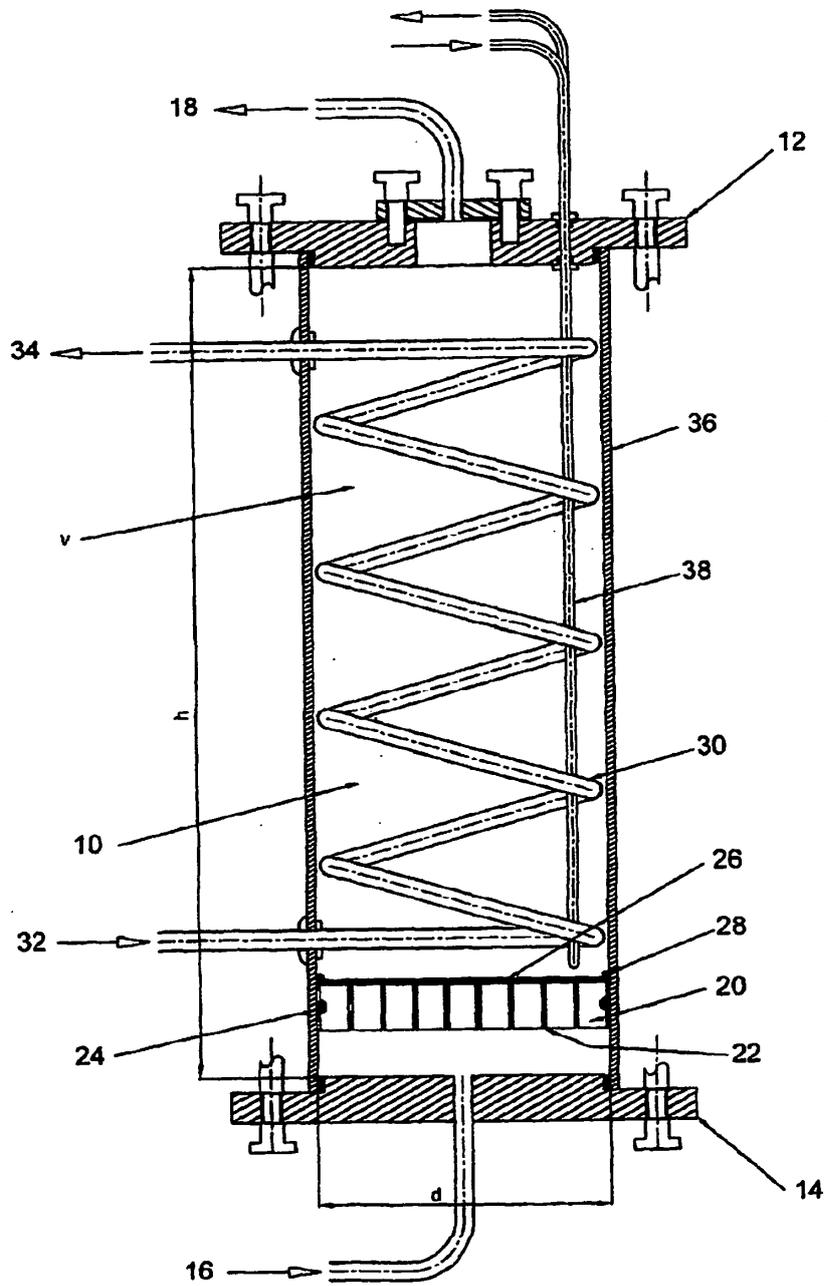


Fig. 1

FIG 2A

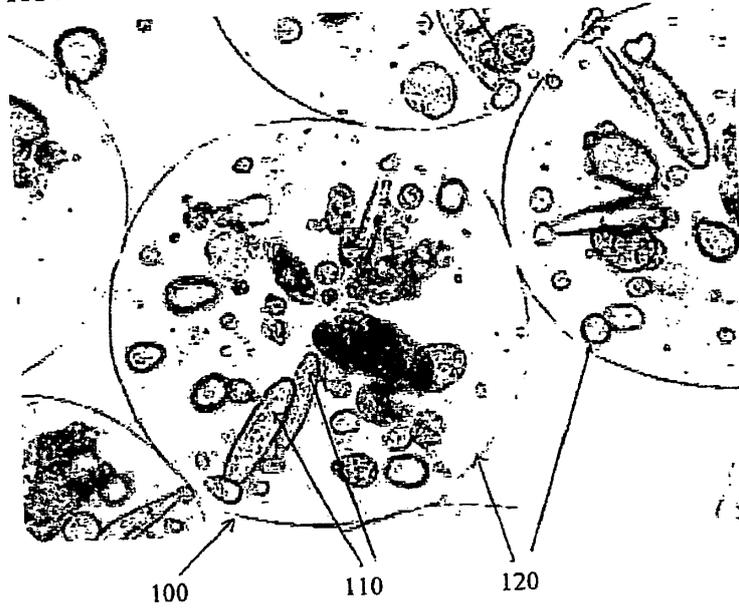
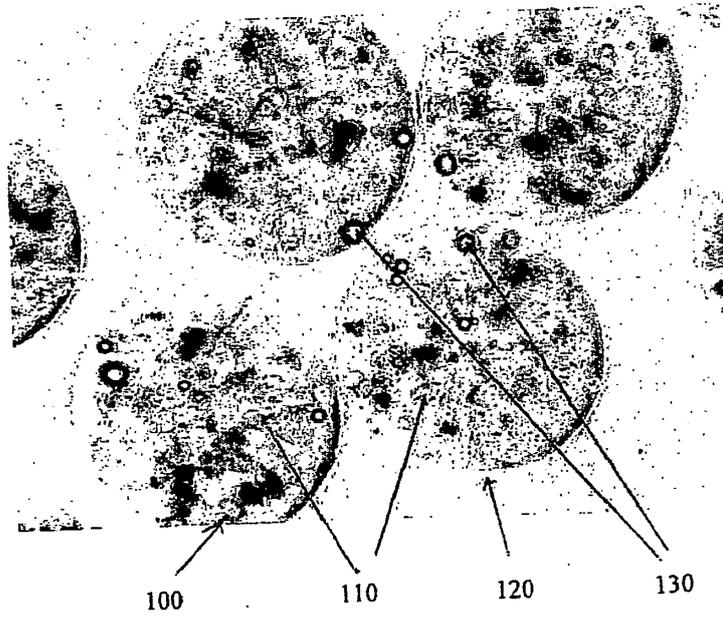


FIG 2B



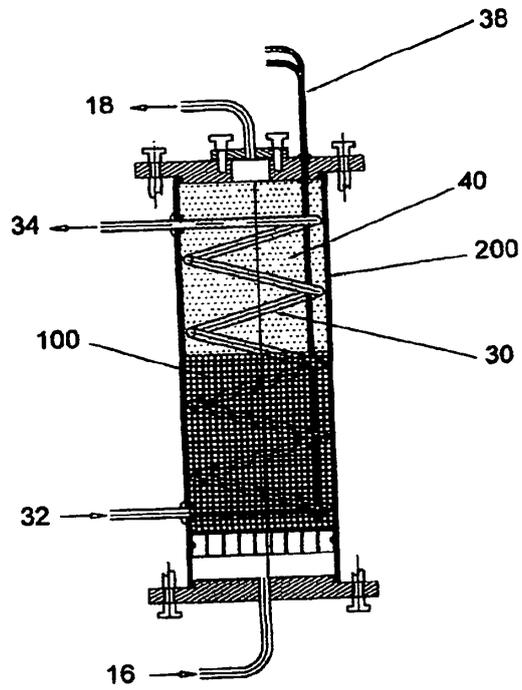


Fig. 3a

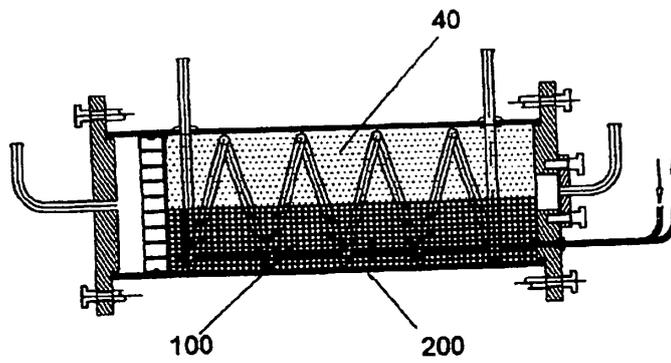


Fig. 3b

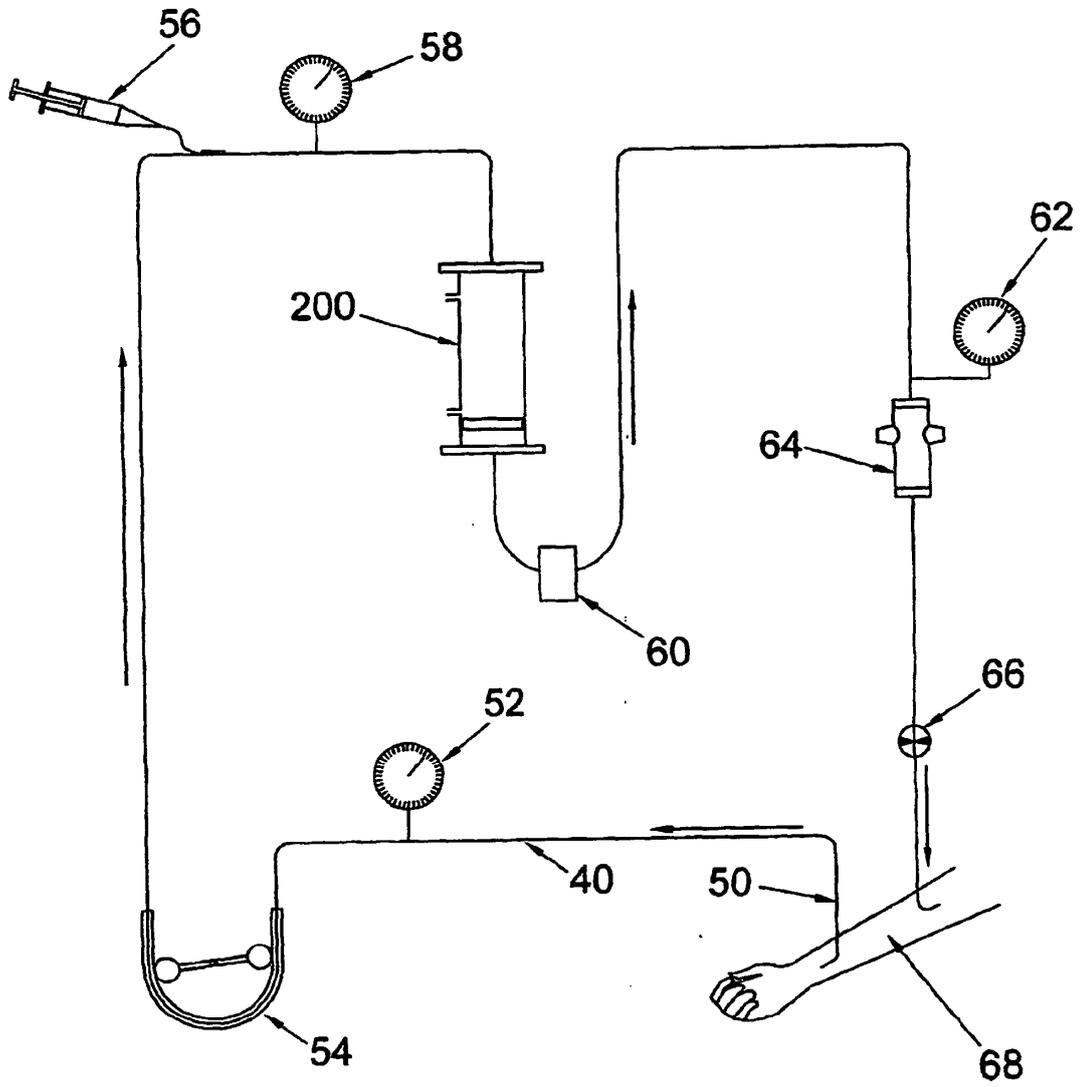


Fig. 4