



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 983 230**

⑫ Int. Cl.:

**A61K 35/407** (2015.01)  
**A61K 9/10** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2015.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 41/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2020 PCT/US2020/027783**

⑧7 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2020 WO20210710**

⑨6 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2020 E 20788083 (2)**

⑨7 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 3952895**

---

⑤4 Título: **Procedimiento de trasplante de células mínimamente invasivo para inducir el desarrollo de organogénesis *in vivo***

⑩3 Prioridad:

**11.04.2019 US 201962832492 P**

④5 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.10.2024**

⑦3 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE  
COMMONWEALTHSYSTEM OF HIGHER  
EDUCATION (100.0%)  
1st Floor Gardner Steel Conference Center 130,  
Thackeray Avenue  
Pittsburgh, PA 15260, US**

⑦2 Inventor/es:

**LAGASSE, ERIC y  
FONTES, PAULO ARTUR, CHAVES**

⑦4 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 983 230 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

Procedimiento de trasplante de células mínimamente invasivo para inducir el desarrollo de organogénesis *in vivo*

- 5 La presente divulgación se refiere a métodos mínimamente invasivos para trasplantar células en un ganglio linfático de un sujeto para generar tejidos y órganos ectópicos funcionales.

**Antecedentes**

- 10 Existe una gran demanda de trasplante y/o regeneración de órganos. Sin embargo, la escasez de órganos disponibles para trasplantes a pacientes con enfermedades terminales representa un importante reto médico, social y económico a escala mundial. Además, el trasplante de órganos completos puede tener requisitos estrictos en cuanto al estado de salud del propio receptor. Por ejemplo, actualmente hay alrededor de 30.000 pacientes al año con hepatopatía terminal (HPT) en EE. UU. que no cumplen los requisitos para un trasplante de hígado convencional.

- 15 Un enfoque alternativo al trasplante de órganos completos puede implicar el trasplante de células para regenerar órganos defectuosos. Por ejemplo, el trasplante de hepatocitos (TH) puede prolongar y mejorar la calidad de vida de los pacientes con HPT que se considerarían inadecuados para el trasplante de hígado convencional y no disponen de ninguna opción terapéutica adicional. Sin embargo, la terapia basada en células ortotópicas dirigida a un órgano enfermo puede no ser factible por muchas razones, que van desde una posible falta de un entorno adecuado en el hígado cirrótico y fibrótico durante la fase terminal de la enfermedad hasta la falta de timo en el síndrome de DiGeorge completo.

- 20 Para los pacientes que padecen HPT, puede haber un reto importante: la mayoría de las terapias celulares se han dirigido a promover el injerto celular en el hígado enfermo nativo. Las células hepáticas transplantadas generalmente se inyectan en el bazo (arteria esplénica en pacientes o parénquima esplénico en roedores) o por vía intrahepática a través de la vena porta. Las células hepáticas transplantadas a la arteria esplénica pueden migrar rápidamente, de manera activa o pasiva, al hígado enfermo después de la inyección esplénica inicial, donde se espera que se produzca la regeneración hepática mediante los hepatocitos transplantados. Sin embargo, este enfoque tiene limitaciones 25 importantes debido al sitio anatómico del trasplante. La mayoría de estos pacientes con HPT (Takahashi *et al.*, 2014) tienen esplenomegalia e hiperesplenismo, donde la captura celular agresiva seguida de fagocitosis y destrucción celular puede tener lugar en el bazo con respecto a todas las células (por ejemplo, glóbulos rojos), leucocitos y plaquetas) que entran en el parénquima esplénico a través de la circulación de la arteria esplénica. Además, los hepatocitos transplantados pueden dirigirse al hígado a través de la vena esplénica como componente principal del 30 suministro de la vena porta al parénquima hepático. Estas células pueden circular desde los espacios porta hacia los sinusoides hepáticos, donde la oclusión parcial de las pequeñas ramas de la vena porta y los sinusoides hepáticos por los hepatocitos conduce a una hipertensión portal transitoria, isquemia inicial y muerte de muchas de las células transplantadas (da Fonseca *et al.*, 2008). Los hepatocitos transplantados pueden tener una capacidad muy limitada para 35 superar la barrera de células endoteliales sinusoidales e injertarse dentro del parénquima hepático. Asimismo, los pacientes con HPT pueden tener grados significativos de fibrosis hepática y cirrosis, que pueden ser factores limitantes 40 importantes para el crecimiento celular posterior dentro del lóbulo hepático ya restringido por el desorden progresivo de la citoarquitectura.

- 45 Por tanto, sigue existiendo una necesidad de nuevos métodos de regeneración de órganos basados en células capaces de generar órganos funcionales con características anatómicas razonables. También sigue existiendo una necesidad de nuevos tratamientos para la HPT, enfermedades metabólicas del hígado e insuficiencia hepática aguda.

- 50 El documento WO 2018/152488 se refiere al injerto y la proliferación de células de órganos en grupos linfoides asociados a grasas para generar tejido ectópico que puede utilizarse para complementar o reemplazar la función de los órganos en un sujeto.

**Breve sumario de la invención**

- 55 La invención está definida por las reivindicaciones y, en particular, la invención proporciona una o más células para su uso en un método de tratamiento, en donde el método es para trasplantar la una o más células y hacer crecer un tejido ectópico en un sujeto, comprendiendo el método:

- 60 (a) hacer avanzar un endoscopio a través de un abordaje endoluminal en el tubo gastrointestinal, las vías respiratorias o las vías urinarias del sujeto,
- (b) utilizar un abordaje transluminal para insertar una aguja unida al endoscopio a través de una pared visceral en un ganglio linfático del sujeto y
- 65 (c) administrar la una o más células al ganglio linfático a través de la aguja, permitiendo así que la una o más células se injerten y produzcan el tejido ectópico en el ganglio linfático.

La invención proporciona además un sistema para trasplantar hepatocitos y hacer crecer un hígado ectópico en un ganglio linfático de un sujeto, que comprende un endoscopio y un inyector, en donde el endoscopio comprende una sonda de ultrasonido configurada para detectar el ganglio linfático del sujeto, en donde el inyector comprende una aguja y una población de células en una solución en suspensión contenida en el mismo, en donde la solución en suspensión comprende de 25 millones a 100 millones de hepatocitos viables por ml, en donde el endoscopio y la aguja están configurados para avanzar juntos a lo largo del tubo gastrointestinal, las vías respiratorias o las vías urinarias del sujeto, opcionalmente en donde la aguja es de calibre 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27, o la aguja tiene un diámetro interior de como máximo 700 µm.

10 **Divulgación adicional**

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método mínimamente invasivo (no reivindicado) para trasplantar una o más células y hacer crecer un tejido ectópico en un sujeto. En determinados aspectos, el método comprende hacer avanzar un endoscopio a través de un abordaje endoluminal, por ejemplo, en el tubo gastrointestinal, las vías respiratorias o las vías urinarias del sujeto, utilizar un abordaje transluminal para insertar una aguja unida al endoscopio a través de una pared visceral en un ganglio linfático del sujeto, y administrar una o más células al ganglio linfático a través de la aguja, permitiendo así que la una o más células se injerten y produzcan el tejido ectópico en el ganglio linfático.

20 En determinados aspectos, el avance del endoscopio, la inserción de la aguja, o ambos, se realizan con la ayuda de radiografías o ecografías. En determinados aspectos, las radiografías comprenden radiografías dinámicas, tomografía computarizada (TC), imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) o ambas. En determinados aspectos, el ganglio linfático se encuentra en la cavidad abdominal o torácica del sujeto. En determinados aspectos, el ganglio linfático se encuentra en la región mediastínica o retroperitoneal del sujeto.

25 En determinados aspectos, un método mínimamente invasivo (método no reivindicado) de trasplantar una o más células y hacer crecer un tejido ectópico en un sujeto de la presente divulgación incluye insertar una aguja en los ganglios linfáticos en la cavidad abdominal o torácica del sujeto con la ayuda de ecografía o radiografía, y administrar una o más células al ganglio linfático a través de la aguja, permitiendo así que la una o más células se injerten, expandan y diferencien en un tejido ectópico en el ganglio linfático. En determinados aspectos, el método comprende además hacer avanzar un endoscopio a través del tubo gastrointestinal, las vías respiratorias o las vías urinarias del sujeto, y utilizar un abordaje transluminal para insertar la aguja a través de una pared visceral para alcanzar el ganglio linfático del sujeto, en donde la aguja está unida al endoscopio. En determinados aspectos, el avance del endoscopio, la inserción de la aguja o ambas se realiza con la ayuda de una ecografía del ganglio linfático. En determinados aspectos, la radiografía comprende radiografía dinámica, tomografía computarizada (TC), imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) o ambas. En determinados aspectos, el endoscopio comprende una sonda de ultrasonido configurada para detectar el ganglio linfático.

40 En determinados aspectos, la una o más células comprenden hepatocitos, células pancreáticas o islotes de Langerhans, células o fragmentos de riñón, células o fragmentos de timo, o células o fragmentos de pulmón. En determinados aspectos, la una o más células son autólogas, alogénicas o xenogénicas para el receptor. En determinados aspectos, la una o más células son singénicas para el sujeto.

45 En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento comprenden además aislar la una o más células de un tejido de un donante vivo. En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento comprenden además recuperar la una o más células de la crioconservación antes de la administración. En determinados aspectos, el método comprende además administrar un inmunodepresor al sujeto para reducir el rechazo inmunitario de la una o más células.

50 En determinados aspectos, el método comprende administrar la una o más células en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ganglios linfáticos en la cavidad abdominal o torácica.

55 En determinados aspectos, la una o más células comprenden células de un diámetro medio de aproximadamente 20 µm. En determinados aspectos, la una o más células comprenden al menos aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por administración en un solo ganglio linfático. En determinados aspectos, la aguja administra la una o más células en una solución en suspensión que tiene al menos aproximadamente 10 millones, 20 millones, 25 millones, 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml. En determinados aspectos, la aguja administra la una o más células en una solución en suspensión que tiene al menos aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones o 50 millones de células viables por ml. En determinados aspectos, la una o más células se administran al ganglio linfático en una población de células, y en donde la población de células tiene al menos aproximadamente un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 66 %, un 67 %, un 68 %, un 69 %, un 70 %, un 71 %, un 72 %, un 73 %, un 74 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o aproximadamente el 100 % de células viables. En determinados aspectos, la una o más células se administran al ganglio linfático en una población de células, y en donde la administración conduce a menos de aproximadamente un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 9 %, un 8,5 %, un 8 %, un 7,5 %, un 7 %, un 6,5 %, un 6 %, un

5,5 %, un 5 %, un 4,5 %, un 4 %, un 3,5 %, un 3 %, un 2,5 %, un 2 %, un 1,5 %, un 1 % o un 0,5 % de reducción en el porcentaje de viabilidad celular en la población de células cuando la una o más células pasan a través de la aguja.

- 5 En determinados aspectos, un diámetro interior de la aguja es como máximo de aproximadamente 700 µm, 600 µm, 500 µm, 450 µm, 400 µm, 300 µm, 260 µm, 250 µm o 200 µm. En determinados aspectos, el diámetro interior de la aguja es como máximo de aproximadamente 260 µm. En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es como máximo de aproximadamente 1 mm, 900 µm, 800 µm, 750 µm, 700 µm, 650 µm, 600 µm, 550 µm, 520 µm, 510 µm, 500 µm, 480 µm, 450 µm o 400 µm. En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es como máximo de aproximadamente 510 µm. En determinados aspectos, la aguja tiene como máximo un calibre de aproximadamente 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27. En determinados aspectos, la aguja tiene como máximo un calibre de 25. En determinados aspectos, la aguja tiene como máximo un calibre de aproximadamente 25, y la aguja administra la una o más células en una solución en suspensión que tiene al menos aproximadamente 50 millones de células viables por ml, y en donde la una o más células comprenden al menos aproximadamente un 65 % de células viables.
- 10 15 En determinados aspectos, la una o más células comprenden hepatocitos y el tejido ectópico es tejido hepático ectópico. En determinados aspectos, el método trata una enfermedad o afección hepática en el sujeto. En determinados aspectos, la enfermedad o afección hepática es una enfermedad hepática terminal o fibrosis hepática relacionada con el consumo de alcohol, infección por hepatitis A, B, C o D, esteatosis hepática no alcohólica, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, atresia biliar, fibrosis quística, síndrome de Alagille, sífilis, brucelosis, infecciones parasitarias, exposición química, enfermedades biliares crónicas, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad de Osler o insuficiencia cardíaca derecha. En determinados aspectos, la enfermedad o afección hepática está asociada con un trastorno metabólico que comprende tirosinemia, enfermedad de la orina con olor a sirope de arce, fenilcetonuria, síndrome de Crigler-Najjar, oxalosis, hiperoxaluria, hemocromatosis, deficiencia de antitripsina α-1, enfermedad de Wilson, síndromes de colestasis intrahepática familiar, galactosemia, enfermedad por almacenamiento de glucógeno o polineuropatía amiloide familiar. En determinados aspectos, el sujeto ha recibido un procedimiento quirúrgico de derivación portocava o derivación portosistémica intrahepática transyugular (DPIT) que reduce el suministro de sangre al hígado del sujeto e induce disfunción hepatocelular en el sujeto, y en donde el procedimiento quirúrgico de derivación portocava comprende una derivación portocava de extremo a lado, derivación portocava de lado a lado, derivación mesocava con interposición de injertos H o C, o derivación esplenorenal central o distal. En determinados aspectos, el método trata la hepatopatía terminal en el sujeto.
- 20 25 30 35 En determinados aspectos, la una o más células comprenden células de riñón o fragmentos de riñón y el tejido ectópico es tejido de riñón ectópico. En determinados aspectos, el método trata una enfermedad o afección renal en el sujeto. En determinados aspectos, la enfermedad o afección renal es una insuficiencia renal terminal.
- 40 En determinados aspectos, la una o más células comprenden células pancreáticas o islotes de Langerhans, y el tejido ectópico es tejido pancreático ectópico. En determinados aspectos, el método trata una enfermedad o afección pancreática endocrina que conduce a la reducción o ausencia de la secreción de insulina en el sujeto. En determinados aspectos, la enfermedad o afección pancreática es diabetes de tipo I, diabetes de tipo II o pancreatitis crónica que conduce a la reducción de la secreción de insulina en el sujeto.
- 45 50 En determinados aspectos, la una o más células comprenden células pulmonares o fragmentos de pulmón, y el tejido ectópico es tejido pulmonar ectópico. En determinados aspectos, el método trata una enfermedad o afección pulmonar en el sujeto. En determinados aspectos, la enfermedad o afección pulmonar es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En determinados aspectos, la EPOC está provocada por: tabaquismo, contaminación y humos, antitripsina α-1, fibrosis quística, asma crónica, enfisema, bronquitis crónica o fibrosis pulmonar idiopática.
- 55 En determinados aspectos, la una o más células comprenden células tímicas o fragmentos de timo, y el tejido ectópico es tejido de timo ectópico. En determinados aspectos, las células o fragmentos del timo se obtienen de un sujeto donante y el tejido de timo ectópico induce en el sujeto una tolerancia específica del donante al trasplante de células del sujeto donante. En determinados aspectos, la enfermedad o afección es un mal funcionamiento del sistema inmunitario relacionado con la edad y el tejido del timo ectópico modula la función inmunitaria del sujeto.
- 60 65 En determinados aspectos, el ganglio linfático está cerca del tubo gastrointestinal y el endoscopio avanza a lo largo del tubo gastrointestinal. En determinados aspectos, el ganglio linfático comprende uno o más ganglios linfáticos peridiudenciales, un ganglio linfático perigástrico, un ganglio linfático peripancreático, un ganglio linfático mesentérico, un ganglio linfático ileocálico, un ganglio linfático mesocálico, un ganglio linfático gástrico, un ganglio linfático hepático-esplénico, un ganglio linfático hilar esplénico, un ganglio linfático paraesofágico, un ganglio linfático paracardial, un ganglio linfático paraaórtico, un ganglio linfático retroaórtico, un ganglio linfático aórtico lateral, un ganglio linfático preaórtico, un ganglio linfático de menor curvatura, un ganglio linfático hepático común, un ganglio linfático de la arteria esplénica, un ganglio linfático del troncocelíaco, un ganglio linfático ilíaco o un ganglio linfático retroperitoneal. En determinados aspectos, el ganglio linfático comprende un ganglio linfático peridiudenal. En determinados aspectos, el ganglio linfático está cerca de las vías respiratorias y el endoscopio avanza a lo largo del tubo respiratorio. En determinados aspectos, el ganglio linfático comprende uno o más ganglios linfáticos en la región mediastínica. En determinados aspectos, el ganglio linfático comprende uno o más ganglios linfáticos paraesternales, un ganglio

linfático intercostal, un ganglio linfático diafragmático superior, un ganglio linfático traqueobronquial superior, un ganglio linfático traqueobronquial inferior, un ganglio linfático broncopulmonar, un ganglio linfático paratraqueal o un ganglio linfático intrapulmonar. En determinados aspectos, el ganglio linfático está cerca de las vías urinarias y el endoscopio avanza a lo largo de las vías urinarias. En determinados aspectos, el ganglio linfático comprende uno o más ganglios linfáticos en la región retroperitoneal. En determinados aspectos, el ganglio linfático comprende uno o más de un ganglio linfático ilíaco externo, un ganglio linfático ilíaco interno, un ganglio linfático lumbar cava, un ganglio linfático lumbar aórtico, un ganglio linfático inguinal superficial, un ganglio linfático inguinal profundo, un ganglio linfático perivesical interaortocava, un ganglio linfático perivesical obturador o un ganglio linfático perivesical presacro.

10 En determinados aspectos, el sujeto es un ser humano. En determinados aspectos, el sujeto es un animal no humano.

En determinados aspectos, el tejido ectópico se forma en aproximadamente 5 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días, 100 días, 110 días, 120 días, 130 días, 140 días, 150 días, 160 días, 170 días, 180 días, 190 días o aproximadamente 200 días después de administrar la una o más células a un ganglio linfático.

15 La presente divulgación proporciona además un método (no reivindicado) para tratar una enfermedad hepática en un sujeto que lo necesita. En determinados aspectos, el método comprende hacer avanzar un endoscopio a través de un abordaje endoluminal en el tubo gastrointestinal, vías respiratorias o urinarias del sujeto, utilizar un abordaje transluminal para insertar una aguja unida al endoscopio a través de una pared visceral en un ganglio linfático del sujeto con la ayuda de ecografías, y administrar la una o más células al ganglio linfático a través de la aguja, permitiendo así que la una o más células se injerten y produzcan un tejido hepático ectópico en el ganglio linfático. En aspectos no limitantes, el tejido ectópico se forma en aproximadamente 5 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días, 100 días, 110 días, 120 días, 130 días, 140 días, 150 días, 160 días, 170 días, 180 días, 190 días o aproximadamente 200 días después de administrar la una o más células a un ganglio linfático

20 La presente divulgación proporciona un sistema para trasplantar hepatocitos y hacer crecer un hígado ectópico en un sujeto, que comprende un endoscopio y un inyector que tiene una aguja y una población de células en una solución en suspensión contenida en el mismo, en donde la solución en suspensión tiene de aproximadamente 25 millones a aproximadamente 100 millones de hepatocitos viables por ml, y en donde la aguja tiene como máximo un calibre de aproximadamente 25. En determinados aspectos, el endoscopio y la aguja están configurados para avanzar juntos a lo largo del tubo gastrointestinal, vías respiratorias o vías urinarias del sujeto. En determinados aspectos, el inyector está configurado para administrar la una o más células a través de la aguja. En determinados aspectos, el endoscopio comprende una sonda de ultrasonido. En determinados aspectos, la sonda de ultrasonido está configurada para detectar un ganglio linfático en la cavidad abdominal del sujeto. En determinados aspectos, la solución de suspensión tiene al menos aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml. En determinados aspectos, la población de células en el inyector tiene al menos aproximadamente un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 66 %, un 67 %, un 68 %, un 69 %, un 70 %, un 71 %, un 72 %, un 73 %, un 74 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o aproximadamente el 100 % de células viables. En determinados aspectos, la población de células en el inyector tiene al menos aproximadamente un 65 % de células viables. En determinados aspectos, la población de células en el inyector comprende al menos aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células. En determinados aspectos, la población de células en el inyector comprende al menos aproximadamente 50 millones de células viables por ml, y la población de células comprende al menos aproximadamente un 65 % de células viables.

#### Breve descripción de los dibujos

30 50 Las nuevas características de la divulgación se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone aspectos ilustrativos, en la que se utilizan los principios de la divulgación y los dibujos adjuntos de los cuales:

55 La **figura 1A** es una imagen de un endoscopista realizando una endoscopia por ultrasonido en un animal de experimentación para la administración de células en los ganglios linfáticos guiada por EE.  
La **figura 1B** es una imagen de ecografía que muestra la imagen de ultrasonido de una aguja de aspiración con aguja fina que llega a un ganglio linfático (GL) cercano.  
60 En la **figura 2** se muestran imágenes de la inyección directa de hepatocitos en el ganglio linfático peridiuodenal de un animal de experimentación realizada por un cirujano.  
La **figura 3** es un gráfico de barras que resume el porcentaje de viabilidad celular de diferentes lotes de hepatocitos que se aislaron de animales donantes y se pasaron a través de agujas de diferentes calibres.  
En la **figura 4** se muestran imágenes de la cavidad abdominal abierta de un animal de experimentación antes y después de un procedimiento de derivación portocava, así como un diagrama (más a la derecha) del procedimiento de derivación portocava.  
65 La **figura 5** es un diagrama que muestra el diseño experimental de un estudio preclínico de acuerdo con la presente

divulgación.

En la **figura 6A** se muestra tinción positiva de CK-18, un marcador de hepatocitos, en el tejido hepático normal.

En la **figura 6B** se muestra la presencia de señal de inmunotinción de CK-18 en los ganglios linfáticos 6 días después de recibir una inyección de hepatocitos por ecoendoscópica (EE) en un estudio preclínico.

5 En la **figura 6C** se muestra la presencia de señal de inmunotinción de CK-18 en ganglios linfáticos 6 días después de recibir inyección directa de hepatocitos en un estudio preclínico.

En la **figura 7A** se muestra la presencia de tejido hepático en un ganglio linfático aproximadamente 90 días después del trasplante de hepatocitos autólogos en el ganglio linfático mediante inyección ecoendoscópica (EE).

10 En la **figura 7B** se muestra la presencia de tejido hepático en un ganglio linfático aproximadamente 90 días después del trasplante de hepatocitos alogénicos en el ganglio linfático mediante inyección ecoendoscópica (EE).

En la **figura 7C** se muestra la presencia de tejido hepático y hepatocitos positivos para fumarilacetatohidrolasa (FAH) en un ganglio linfático aproximadamente 60 días después del trasplante de hepatocitos autólogos en el ganglio linfático mediante inyección ecoendoscópica (EE).

15 En la **figura 7D** se muestra la presencia de tejido hepático y hepatocitos positivos para FAH en un ganglio linfático aproximadamente 150 días después del trasplante de hepatocitos alogénicos en el ganglio linfático mediante inyección ecoendoscópica (EE).

### Descripción detallada

20 Para una mayor claridad, aunque no de forma limitativa, la descripción detallada del tema actualmente divulgado se divide en las siguientes subsecciones:

1. Visión general;
2. Definiciones;
3. Procedimientos de administración de células;
4. Producción de tejido ectópico a partir de células trasplantadas;
5. Enfermedades y afecciones;
6. Sujetos;
7. Sistemas; y
8. Kits.

#### 1. Visión general

35 A modo de visión general, la presente divulgación se refiere a métodos y sistemas para procedimientos mínimamente invasivos para inducir el desarrollo de organogénesis *in vivo*. En el presente documento se proporcionan métodos y sistemas para trasplantar células y hacer crecer un tejido ectópico en un sujeto mediante la administración de células en un ganglio linfático del sujeto. El proceso de crecimiento del tejido ectópico a partir de células o fragmentos de tejido administrados dentro del ganglio linfático con características anatómicas y funcionales adecuadas se denomina organogénesis *in vivo*. Los procedimientos mínimamente invasivos permitidos por la presente divulgación pueden 40 conducir a la producción de tejido(s) ectópico(s) que pueden complementar o aumentar la función normal de uno o más órganos del sujeto.

45 Como se ha indicado anteriormente, un problema asociado con las terapias de trasplante actuales, en particular, el trasplante de órganos ortotópicos, puede ser que muchos pacientes con enfermedades en etapa terminal, tales como enfermedades hepáticas o renales en etapa terminal, ya no son adecuados para cirugías mayores que pueden ser necesarias para un trasplante de órganos ortotópicos u otros tipos de trasplantes de células. Puede haber riesgos importantes asociados con las cirugías mayores y el pronóstico en estos pacientes puede ser malo dado su deteriorado estado de salud. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento mínimamente invasivo (por ejemplo, ecoendoscopia (EE)) para resolver este problema. Los métodos y sistemas pueden generar órganos anatómicamente intactos y total o al menos parcialmente funcionales en lugares ectópicos utilizando los ganglios linfáticos como biorreactores naturales. Los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento pueden minimizar la morbilidad y la mortalidad de los pacientes con enfermedades de órganos terminales que a menudo pueden asociarse con procedimientos quirúrgicos adicionales. La presente divulgación también puede permitir que al menos algunos de los procedimientos quirúrgicos descritos en el presente documento se realicen de forma ambulatoria, por lo tanto, pueden disminuir los costes del procedimiento inicial.

55 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "tejido ectópico" puede referirse a un tejido que existe en una ubicación ectópica (no nativa) de un cuerpo y que tiene una o más propiedades morfológicas y/o funcionales similares o iguales a un órgano o tejido sano que normalmente se puede encontrar en una ubicación nativa del cuerpo. La expresión "tejido ectópico funcional" puede referirse a un tejido ectópico que tiene una o más de las funciones de un órgano o tejido sano que normalmente se puede encontrar en una ubicación nativa del cuerpo. La expresión "ubicación ectópica" se puede utilizar para describir una ubicación relativa a una ubicación nativa del sujeto, por ejemplo, una ubicación ectópica puede referirse a una ubicación que es diferente de la ubicación nativa en el cuerpo del sujeto. Por ejemplo, un hígado en un ganglio linfático es ectópico, es decir, un hígado ectópico, en el cuerpo de un mamífero normal y sano porque el tejido hepático normalmente no se encuentra en un ganglio linfático. De acuerdo con algunos aspectos de la presente divulgación, en un ganglio linfático puede crecer tejido ectópico que contiene una población

de células que morfológicamente se parecen a los hepatocitos y que, en conjunto, pueden realizar una o más funciones de un hígado nativo sano.

- 5 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) incluyen hacer avanzar un endoscopio dentro de una luz corporal o una cavidad corporal cerrada de un sujeto. En determinados aspectos, los métodos incluyen hacer avanzar un endoscopio en el tubo gastrointestinal (GI), vías respiratorias o vías urinarias del sujeto.
- 10 En determinados aspectos, el endoscopio se hace avanzar hacia el interior de una luz corporal del sujeto mediante un abordaje endoluminal. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "abordaje endoluminal" se refiere a cualquier enfoque, por ejemplo, métodos y dispositivos, conocido en la materia para insertar un endoscopio en una luz corporal del sujeto. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los métodos incluyen hacer avanzar un endoscopio a través de un abordaje endoluminal en el tubo gastrointestinal (GI), vías respiratorias o vías urinarias del sujeto.
- 15 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) pueden incluir además insertar una aguja en un ganglio linfático del sujeto, donde la aguja está unida al endoscopio. En determinados aspectos, la aguja unida al endoscopio se introduce a través de la pared visceral hasta un ganglio linfático. Ejemplos no limitantes de paredes viscerales incluyen estructuras anatómicas que encierran una víscera hueca y/o un órgano a lo largo del tubo, por ejemplo, estómago, duodeno, tráquea, bronquios o vejiga. En determinados aspectos, los métodos incluyen además insertar la aguja a través de un abordaje transluminal. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "abordaje transluminal" se refiere a cualquier enfoque, por ejemplo, métodos y dispositivos, conocido en la materia para insertar un instrumento de trabajo (por ejemplo, una aguja) a través de una luz mediante el uso de un endoscopio.
- 20 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) incluyen además administrar una o más células al ganglio linfático a través de la aguja. En determinados aspectos, los métodos incluyen la administración de una sola célula al ganglio linfático. En determinados aspectos, los métodos incluyen la administración de una población de células al ganglio linfático. En determinados aspectos, la población de células incluye un tipo de célula. En determinados aspectos, la población de células incluye al menos dos tipos de células. En determinados aspectos, las una o más células administradas al ganglio linfático pueden injertarse y producir tejido ectópico en el ganglio linfático.
- 25 En determinados aspectos, el avance del endoscopio, la inserción de la aguja, o ambas, se realizan mediante un método mínimamente invasivo o no invasivo. Por ejemplo, se pueden aplicar imágenes mediadas por ultrasonido u otros métodos de detección en los métodos proporcionados en el presente documento para la ubicación del ganglio linfático diana. Durante el proceso, se pueden aplicar ecografías u otros métodos, por ejemplo, enfoques de detección mínimamente invasivos o no invasivos, para cualquiera de hacer avanzar el endoscopio, localizar el ganglio linfático diana adecuado o controlar la inserción de la aguja a través de la pared visceral o en el ganglio linfático diana.
- 30 En determinados aspectos, el presente divulgación proporciona métodos (no reivindicados) que incluyen insertar una aguja en un ganglio linfático en la cavidad abdominal, pélvica o torácica del sujeto con la ayuda de ultrasonidos. Los métodos pueden incluir además la administración de una o más células al ganglio linfático mediante una aguja. La localización de un ganglio linfático guiada por ecografía se puede realizar mediante cualquier tecnología disponible. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, se pueden utilizar ecografías para identificar y localizar un ganglio linfático adecuado para la inyección de células. En determinados aspectos, la espectrometría de ultrasonido se puede utilizar para detectar el ganglio linfático. En determinados aspectos, la ecografía o la espectrometría se pueden utilizar junto con otros métodos de detección para la localización del ganglio linfático.
- 35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos (no reivindicados) que incluyen administrar una población de células en un ganglio linfático del sujeto, donde la población de hepatocitos se injerta y produce un hígado ectópico en el ganglio linfático. En determinados aspectos, los métodos incluyen además reducir el suministro de sangre al hígado del sujeto. Se ha descubierto mediante la presente divulgación que una reducción en el suministro de sangre al hígado del sujeto beneficia el crecimiento del hígado ectópico en el ganglio linfático.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 2. Definiciones**
- En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. Cabe señalar que, como se usa en la memoria descriptiva, las formas singulares "un/uno", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Las expresiones "y/o" y "cualquier combinación de los mismos" y sus equivalentes gramaticales, como se utilizan en el presente documento, se pueden utilizar de manera indistinta. Estas expresiones pueden transmitir que se contempla específicamente cualquier combinación. Únicamente con fines ilustrativos, las siguientes expresiones "A, B y/o C" o "A, B, C o cualquier combinación de los mismos" puede significar "A individualmente; B individualmente; C individualmente; A y B; B y C; A y C; y A, B y C". El término "o" se puede utilizar de forma conjuntiva o disyuntiva, a menos que el contexto se refiera específicamente a un uso disyuntivo.
- Además, el uso de la expresión "que incluye", así como otras formas, tales como "incluyen", "incluye", e "incluido/a",

no es limitante.

La referencia en la memoria descriptiva a "algunos aspectos", "determinados aspectos", "un aspecto" u "otros aspectos" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con el aspecto se incluye en al menos algunos aspectos, pero no necesariamente en todos los aspectos, de las presentes divulgaciones.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en la(s) reivindicación(es), las palabras "comprendiendo" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "teniendo" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "incluyendo" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluye" e "incluyen") o "conteniendo" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas de métodos adicionales que no se hayan mencionado. Se contempla que cualquier aspecto tratado en la presente memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la presente divulgación, y viceversa. Además, las composiciones de la presente divulgación se pueden utilizar para lograr los métodos de la presente divulgación.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico de referencia y sus equivalentes gramaticales, como se utiliza en el presente documento, puede incluir el valor numérico en sí y un intervalo de valores más o menos un 10 % de ese valor numérico.

Las expresiones "aproximadamente" o "de manera aproximada" significan dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar más/menos 1 o más de 1 desviación típica, según la práctica en la materia. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %, hasta el 10 %, hasta el 5 % o hasta el 1 % de un valor dado. En otro ejemplo, la cantidad "aproximadamente 10" incluye 10 y cualquier cantidad del 9 al 11. En otro ejemplo más, el término "aproximadamente" en relación con un valor numérico de referencia puede incluir también un intervalo de valores más o menos un 10 %, un 9 %, un 8 %, un 7 %, un 6 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 % o un 1 % de ese valor. Como alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término "aproximadamente" puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente entre 5 veces, y más preferentemente entre 2 veces, de un valor. Cuando se describan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, debe asumirse el término "aproximadamente" dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

### **3. Procedimientos de administración de células**

En determinados aspectos, los métodos y sistemas de la presente divulgación hacen uso de un endoscopio para la administración transluminal de células en un ganglio linfático de un sujeto. En determinados aspectos, el ganglio linfático está ubicado cerca o dentro de una luz corporal o una cavidad corporal cerrada a la que se puede llegar mediante el uso del endoscopio. En determinados aspectos, el ganglio linfático se ubica en la cavidad abdominal, pélvica o torácica de un sujeto.

Como se utiliza en el presente documento, el término "endoscopio" puede referirse a cualquier instrumento que se puede introducir en el cuerpo de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano o un sujeto mamífero no humano, por ejemplo, perro, cerdo, caballo, burro, conejo, buey, ratón o rata, y que proporciona una vista de las partes internas del sujeto. En ocasiones, la vista proporciona inspección visual, por ejemplo, cuando el endoscopio esté equipado con óptica iluminada o ayudado de otro modo con iluminación. En determinados aspectos, un endoscopio de la presente divulgación incluye, está unido o asociado con una o más sondas de detección y ofrece diferentes modos de detección para examinar las partes internas del sujeto. Por ejemplo, el endoscopio puede tener ópticas iluminadas para inspección visual, sonda de ultrasonido para detección mediada por ultrasonido (por ejemplo, ecografía) o detectores de radiación, señal infrarroja, señal de radiofrecuencia o señal de fluorescencia.

Un endoscopio descrito en el presente documento puede incluir una o más de las siguientes partes: un tubo rígido o flexible para recorrer el tubo luminal del sujeto (por ejemplo, el tubo GI, las vías respiratorias o las vías urinarias); un sistema de emisión de luz para iluminar el órgano u objeto bajo inspección; un sistema de lentes que transmite la imagen desde la lente objetivo a un espectador, un ocular o un sistema de video que muestra las imágenes captadas por el endoscopio en el interior del cuerpo; uno o más canales para permitir la entrada de instrumentos médicos o manipuladores. La fuente de luz puede estar fuera del cuerpo o ser de minitamaño y estar equipada dentro del endoscopio. Cuando la fuente de luz está fuera del cuerpo, la luz se puede transmitir a través de un sistema de fibra óptica. Puede haber un sistema óptico, por ejemplo, fibra óptica, para transmitir las imágenes de luz capturadas dentro del cuerpo. De manera adicional o como alternativa, un endoscopio proporcionado en el presente documento se puede equipar con (por ejemplo, puede incluir como parte o unido a) otro instrumento de detección para diferentes propósitos.

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden incluir hacer avanzar el endoscopio en una luz corporal o una cavidad corporal cerrada de un sujeto. Ejemplos no limitantes de luces corporales incluyen el tubo gastrointestinal (GI) (por ejemplo, esófago, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, colon, conducto biliar, recto y ano), vías respiratorias (por ejemplo, nariz, vías respiratorias inferiores), oído, vías urinarias, cuello del

útero, útero y trompas de Falopio. Ejemplos no limitantes de cavidades corporales cerradas incluyen la cavidad abdominal y la cavidad pélvica. En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen hacer avanzar el endoscopio en el tubo gastrointestinal, vías respiratorias o vías urinarias del sujeto.

- 5 En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen hacer avanzar el endoscopio a lo largo de una luz corporal o en una cavidad corporal cerrada de un sujeto para administrar células en al menos un ganglio linfático que está ubicado cerca o en la luz corporal o la cavidad corporal cerrada. En determinados aspectos, la ubicación del ganglio linfático se elige según el propósito del trasplante de células. En determinados aspectos, la luz y/o la cavidad corporal cerrada se eligen en función del ganglio linfático que es adecuado para el trasplante de células.

En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen hacer avanzar el endoscopio a lo largo del tubo gastrointestinal para administrar células en uno o más ganglios linfáticos próximos al tubo GI. Un endoscopio (por ejemplo, un esofagoscopio o un gastroscopio) se puede utilizar para administrar células a los ganglios linfáticos cercanos a la parte superior o inferior del tubo GI. Por ejemplo, se puede utilizar un esofagoscopio para administrar células a los ganglios linfáticos cercanos al esófago, y se puede utilizar un gastroscopio para administrar células a los ganglios linfáticos perigástricos y/o peridiudonales. Los ejemplos no limitantes de ganglios linfáticos próximos al tubo GI en los que se pueden administrar células mediante los métodos proporcionados en el presente documento incluyen ganglio linfático peridiudodenal, ganglio linfático perigástrico, ganglio linfático peripancreático, ganglio linfático mesentérico, ganglio linfático ileocólico, ganglio linfático mesocólico, ganglio linfático gástrico, ganglio linfático hepático-esplénico, ganglio linfático hiliar esplénico, ganglio linfático paraesofágico, ganglio linfático paracardial, ganglio linfático paraaórtico, ganglio linfático retroaórtico, ganglio linfático aórtico lateral, ganglio linfático preaórtico, ganglio linfático de menor curvatura, ganglio linfático hepático común, ganglio linfático de la arteria esplénica, ganglio linfático del tronco cefálico, ganglio linfático ilíaco y ganglio linfático retroperitoneal. El endoscopio se puede introducir desde la boca del sujeto, o en determinados aspectos, desde la nariz del sujeto. Como alternativa, el endoscopio se puede introducir desde el ano del sujeto, por ejemplo, se puede utilizar un proctoscopio, un sigmoidoscopio o colonoscopio para administrar células a los ganglios linfáticos cercanos al recto o al colon. En determinados aspectos, el endoscopio es flexible para recorrer el tubo GI y se realiza un examen de investigación para localizar el ganglio linfático adecuado para el trasplante de células.

30 En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen hacer avanzar el endoscopio a lo largo de las vías respiratorias del sujeto para administrar células en uno o más ganglios linfáticos próximos a las vías respiratorias. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, se utiliza un broncoscopio o un laringoscopio para dirigirse a los ganglios linfáticos cercanos a la tráquea o los bronquios de los pulmones, o a la laringe del sujeto. Los ejemplos no limitantes de ganglios linfáticos próximos a las vías respiratorias en los que se pueden administrar células mediante los métodos proporcionados en el presente documento incluyen ganglio linfático paraesternal, un ganglio linfático intercostal, ganglio linfático diafragmático superior, ganglio linfático traqueobronquial superior, ganglio linfático traqueobronquial inferior, ganglio linfático broncopulmonar, ganglio linfático paratraqueal y ganglio linfático intrapulmonar. El broncoscopio o laringoscopio se puede introducir desde la boca del sujeto, o en determinados aspectos, desde la nariz del sujeto.

45 En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen hacer avanzar el endoscopio a lo largo de las vías urinarias del sujeto para administrar células en uno o más ganglios linfáticos cerca de las vías urinarias. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, se utiliza un cistoscopio para dirigirse a los ganglios linfáticos cercanos a la uretra o la vejiga. El cistoscopio se puede introducir desde la uretra del sujeto. Los ejemplos no limitantes de ganglios linfáticos próximos a las vías urinarias en los que se pueden administrar células mediante los métodos proporcionados en el presente documento incluyen uno o más de un ganglio linfático ilíaco externo, un ganglio linfático ilíaco interno, un ganglio linfático lumbar cava, un ganglio linfático lumbar aórtico, un ganglio linfático inguinal superficial, un ganglio linfático inguinal profundo, un ganglio linfático perivesical interaortocava, un ganglio linfático perivesical obturador o un ganglio linfático perivesical presacro.

55 En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen hacer avanzar el endoscopio en una cavidad corporal cerrada (por ejemplo, cavidad abdominal, cavidad pélvica) para administrar células en al menos un ganglio linfático dentro o cerca de la cavidad corporal cerrada. En determinados aspectos, el endoscopio se introduce en la cavidad corporal cerrada a través de una pequeña incisión, por ejemplo, una pequeña incisión en la superficie del abdomen. En determinados aspectos, la cavidad corporal cerrada es una cavidad abdominal o una cavidad pélvica. Ejemplos no limitantes de ganglios linfáticos dentro o cerca de la cavidad abdominal o la cavidad pélvica incluyen ganglios linfáticos esplénicos, ganglios linfáticos hepáticos, ganglios linfáticos quísticos, ganglios linfáticos foraminales, ganglios linfáticos gástricos derecho/izquierdo, ganglios linfáticos pilóricos, ganglios linfáticos suprapilóricos, ganglios linfáticos subpilóricos, ganglios linfáticos retropilóricos, ganglios linfáticos pancreáticos superiores, ganglios linfáticos inferiores, ganglios linfáticos pancreaticoduodenales superiores/inferiores, ganglios linfáticos mesentéricos inferiores, ganglios linfáticos sigmoideos, ganglios linfáticos rectales superiores, ganglios linfáticos mesocálicos, ganglios linfáticos cólicos izquierdos, ganglios linfáticos cólicos derechos, ganglios linfáticos cólicos medios, ganglios linfáticos apendiculares, ganglios linfáticos ileocálicos, ganglios linfáticos retrocecales, ganglios linfáticos prerectales, ganglios linfáticos mesentéricos superiores, ganglios linfáticos lumbares izquierdos, ganglios linfáticos aórticos laterales y ganglios linfáticos preaórticos.

- En determinados aspectos, los métodos y sistemas divulgados en el presente documento utilizan ultrasonido para localizar un ganglio linfático en el que se trasplantarán células y/o para guiar las etapas de hacer avanzar el endoscopio a través de la luz corporal o la cavidad corporal cerrada, insertar la aguja o cualquier combinación de los mismos. El 5 ultrasonido son ondas sonoras con frecuencias superiores al límite audible superior del oído humano, que pueden ser de más de 20 kHz a varios gigahercios. La obtención de imágenes por ultrasonido (o ecografía) se puede realizar de diversas formas dependiendo del propósito previsto de aplicar los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento. Ejemplos no limitantes de ecografía pueden incluir ecografía Doppler, ecografía de contraste, ecografía 10 molecular, elastografía, ecografía intervencionista y ecografía de compresión. En determinados aspectos, la tecnología de imágenes por ultrasonido utilizada en el presente documento tiene una alta resolución espacial y/o temporal con el fin de localizar el ganglio linfático adecuado para la inyección, utilizando tecnologías como las descritas en las publicaciones de patente internacional n.º WO2018222724A1 y WO2018134729A1.
- En determinados aspectos de la presente divulgación, los métodos divulgados en el presente documento utilizan 15 endoscopia en combinación con ecografía, donde el endoscopio está conectado a una sonda de ultrasonido (por ejemplo, como parte del endoscopio o como pieza separada). La expresión "endoscopia por ultrasonido", "ecoendoscopia" o "EE", utilizados de manera intercambiable en el presente documento, pueden referirse a un procedimiento médico en el que la endoscopia se combina con ultrasonido para detectar (por ejemplo, para obtener imágenes de) y/o manipular los órganos internos del tórax, abdomen y pelvis, o cualquier otra estructura interna de un 20 cuerpo. El instrumento y la tecnología de EE utilizados en los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento pueden ser los disponibles comercialmente actualmente y/o los descritos en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º US20060106306A1 y US20070237373A1, y en la publicación de patente internacional n.º WO1998009247A1.
- 25 En determinados aspectos, la ecografía del ganglio linfático diana (por ejemplo, el ganglio linfático en el que se van a administrar una o más células) se realiza con la ayuda de otras tecnologías de imágenes, tal como radiografías. Las radiografías pueden incluir imágenes radiológicas dinámicas (fluoroscopia), tomografía computarizada (TC) o imágenes por resonancia magnética (RM). Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la tomografía computarizada (TC) se realiza para obtener información anatómica de todo el cuerpo o de algunos órganos o tejidos locales del sujeto.
- 30 En determinados aspectos, la resonancia magnética o cualquier otra técnica médica disponible se utiliza junto con o en lugar de la ecografía para localizar el ganglio linfático diana en la cavidad abdominal, pélvica o torácica del sujeto.
- Los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento pueden incluir el uso de una aguja para administrar 35 la una o más células en un ganglio linfático. La aguja puede ser parte de un inyector, que se puede configurar para recibir las células que se van a administrar y empujarlas hacia afuera a través de la aguja para su administración. La aguja proporcionada en el presente documento se puede configurar para que tenga cierto grado de agudeza y rigidez. Por ejemplo, la aguja se insertará en el ganglio linfático. En determinados aspectos, la aguja también está configurada para penetrar la pared del tubo GI (por ejemplo, la pared del esófago, estómago, intestino o colon), de las vías respiratorias o las vías urinarias (por ejemplo, la pared de la uretra o la vejiga), para que la aguja pueda llegar al 40 ganglio linfático fuera del tubo o vía. Se puede utilizar cualquier aguja adecuada conocida en la materia con los métodos divulgados en el presente documento.
- En determinados aspectos, la aguja está unida al endoscopio, por ejemplo, como parte del endoscopio o como 45 instrumento separado. La aguja puede ser las que se utilizan en los procedimientos de aspiración con aguja fina (AAF). Las agujas para AAF pueden estar disponibles comercialmente o diseñarse específicamente con el fin de aplicar las enseñanzas de la presente divulgación. Las agujas para AAF se utilizan normalmente para realizar biopsias, por ejemplo, realizar un corte en el tejido y aspirar el fragmento de tejido con fines de diagnóstico. En los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento, se pueden utilizar agujas para AAF para la administración de células. En determinados aspectos, la aguja para AAF se maneja a través de un equipo de ecoendoscopio para 50 EE/AAF de matriz lineal. Se puede configurar un equipo EE/AAF ilustrativo para el avance controlado y medido de la aguja para AAF (por ejemplo, una aguja hueca con un estilete sólido extraíble) dentro de una camisa protectora semirrígida. El equipo de EE/AAF también puede tener un mango con un puerto para la inserción o extracción del estilete y para conectar una jeringa desde donde se pueden insertar células vivas. En determinados aspectos, la aguja se inserta dentro de la camisa protectora en el ganglio linfático identificado acústicamente con la sonda de EE del 55 equipo de ecoendoscopio. A continuación, la aguja puede sacarse de la camisa e insertarse transluminalmente en el ganglio linfático diana con guía ecográfica directa. Una llave de paso unida a la punta de la jeringa puede ayudar a crear y mantener el vacío dentro del cuerpo de la aguja. Una vez que la punta de la aguja esté en el ganglio linfático diana y se retire el estilete, al mango de la aguja se le puede conectar una jeringa que contiene células vivas en un medio de cultivo. Una vez abierta la llave de paso, la aguja colocada dentro del parénquima de los ganglios linfáticos 60 permite que las células se infundan rápidamente y con visión directa. Las agujas pueden tener espaciadores/deslizadores ajustables en la porción distal del mango para permitir la modificación de la longitud de la camisa que sale del endoscopio, lo que puede garantizar un nivel adicional de seguridad y precisión cuando se inyectan los ganglios linfáticos cercanos.
- 65 En determinados aspectos, la aguja está configurada, por ejemplo, el tamaño de la aguja está configurado, para facilitar la inyección de células en el ganglio linfático. En determinados aspectos, el tamaño (por ejemplo, el calibre) de la aguja

se selecciona en función de la ubicación del ganglio linfático diana, el tipo de células que se administran y la cantidad de células que se administrarán. En determinados aspectos, cuanto más pequeña es la aguja, más flexible será para alcanzar un ganglio linfático diana e introducirla en él. En determinados aspectos, es más fácil insertar una aguja relativamente pequeña en un ganglio linfático diana pequeño, que de otro modo podría enrollarse alrededor de una aguja relativamente grande. En determinados aspectos, el tamaño de la aguja, por ejemplo, el diámetro interno de la aguja, está configurado para permitir que las células sean expulsadas sin obstruir la aguja. Como se describe en el presente documento, el tamaño de la aguja se refiere al tamaño de la punta de la aguja, no el cono de la aguja donde la aguja se une con otra parte del inyector. Como se divulga en el presente documento, el diámetro exterior de la aguja, se refiere al primer diámetro completo fuera de la pared de la aguja desde la punta, y el diámetro interior de la aguja se refiere al primer diámetro completo dentro de la pared de la aguja desde la punta.

En determinados aspectos, la aguja tiene un diámetro interior de como máximo aproximadamente 700 µm, 600 µm, 500 µm, 450 µm, 400 µm, 300 µm, 260 µm, 250 µm o 200 µm. En determinados aspectos, la aguja tiene un diámetro interior de como máximo aproximadamente 260 µm. En determinados aspectos, el diámetro interior de la aguja puede ser de aproximadamente 700 µm, 600 µm, 500 µm, 450 µm, 400 µm, 300 µm, 260 µm, 250 µm o 200 µm. En determinados aspectos, el diámetro interior de la aguja es de aproximadamente 260 µm. La aguja puede tener un diámetro exterior de como máximo aproximadamente 1 mm, 900 µm, 800 µm, 750 µm, 700 µm, 650 µm, 600 µm, 550 µm, 520 µm, 510 µm, 500 µm, 480 µm, 450 µm o 400 µm. En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es como máximo de aproximadamente 510 µm. En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es de aproximadamente 1 mm, 900 µm, 800 µm, 750 µm, 700 µm, 650 µm, 600 µm, 550 µm, 520 µm, 510 µm, 500 µm, 480 µm, 450 µm o 400 µm. En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es de aproximadamente 510 µm. En determinados aspectos, la aguja es de un determinado calibre, como se prescribe de acuerdo con la norma ISO 7864:2016. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la aguja tiene aproximadamente un calibre de 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27 (ga). En determinados aspectos, la aguja tiene como máximo un calibre de aproximadamente 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27. La aguja puede tener como máximo un calibre de aproximadamente 25. Como se describe en el presente documento, cuando se hace una comparación para el tamaño de la aguja en relación con un tamaño de calibre particular, la comparación se realiza entre el diámetro exterior de la aguja y el diámetro exterior de una aguja hipodérmica estandarizada de ese calibre particular según lo prescrito por la norma ISO 7864:2016. En otros determinados aspectos, la aguja tiene un diámetro exterior relativamente pequeño y un diámetro interior relativamente grande. En determinados aspectos, la aguja tiene un tamaño no convencional, por ejemplo, que tiene una pared delgada manteniendo al mismo tiempo un diámetro interior grande y un diámetro exterior pequeño.

El número total de células y la concentración de células dentro del inyector de la aguja se seleccionan en función de una serie de factores, por ejemplo, el tamaño de las células a inyectar, el tipo de tejido ectópico a producir, la capacidad de proliferación de las células, la masa diana del tejido ectópico, el tamaño de la aguja para la inyección y el tamaño del ganglio linfático diana.

En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, recibe al menos aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones, 10 mil millones, 20 mil millones, 50 mil millones o 100 mil millones de células para inyección. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones, 10 mil millones, 20 mil millones, 50 mil millones o 100 mil millones de células para inyección. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene como máximo aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones, 10 mil millones, 20 mil millones, 50 mil millones o 100 mil millones de células para inyección. En determinados aspectos, el inyector recibe de aproximadamente 50 millones a aproximadamente 200 millones de células para inyección.

En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, recibe al menos aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de hepatocitos para la producción de un hígado ectópico. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de hepatocitos para la producción de un hígado ectópico. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene como máximo aproximadamente 10 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 50 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de hepatocitos para la producción de un hígado ectópico. En determinados aspectos, el inyector recibe de aproximadamente 50 millones a aproximadamente 200 millones de células para la producción de un hígado ectópico.

En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión

- de células que tiene al menos aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones o 10 mil millones de células por ml. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento,
- 5 tiene una solución en suspensión de células que tiene aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones o 10 mil millones de células por ml. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión de células que tiene como máximo aproximadamente 30
- 10 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones o 10 mil millones de células por ml.
- 15 En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, recibe una solución en suspensión de hepatocitos que tiene al menos aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml para la producción de un hígado ectópico. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, recibe una solución en suspensión de hepatocitos que tiene aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml para la producción de
- 20 un hígado ectópico. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, recibe una solución en suspensión de hepatocitos que tiene como máximo aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml para la producción de un hígado ectópico.
- 25 En determinados aspectos, la aguja para la inyección de hepatocitos se selecciona para que tenga como máximo un calibre de aproximadamente 25, y la aguja administra las células, incluidos los hepatocitos, en una solución en suspensión que tiene al menos aproximadamente 50 millones de células viables por ml. En determinados aspectos, la población de células dentro del inyector tiene al menos aproximadamente un 65 % de células viables.
- 30 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría determinada, la viabilidad de las células administradas al ganglio linfático puede ser importante para la formación y función del tejido ectópico. En determinados aspectos, es necesario controlar el porcentaje de viabilidad en la población de células. El inyector, por ejemplo, la aguja, se puede configurar para mantener la viabilidad de las células durante el proceso de administración. Por ejemplo, el tamaño de la aguja y la concentración celular de la solución en suspensión se pueden configurar de modo que el porcentaje de viabilidad no
- 35 disminuya significativamente cuando las células pasen a través de la aguja durante el proceso de administración celular. En determinados aspectos, la administración de células conduce a menos de aproximadamente un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 9 %, un 8,5 %, un 8 %, un 7,5 %, un 7 %, un 6,5 %, un 6 %, un 5,5 %, un 5 %, un 4,5 %, un 4 %, un 3,5 %, un 3 %, un 2,5 %, un 2 %, un 1,5 %, un 1 % o un 0,5 % de reducción en el porcentaje de viabilidad celular en la población de células cuando las células pasan a través de la aguja. En determinados aspectos, la reducción del
- 40 porcentaje de viabilidad celular es inferior a aproximadamente un 10 % cuando las células pasan a través de la aguja durante la administración de células (por ejemplo, en comparación con la viabilidad de las células antes de la inyección).
- 45 En determinados aspectos, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen reducir el suministro de sangre al hígado del sujeto y administrar uno o más hepatocitos en un ganglio linfático del sujeto. La reducción del suministro de sangre al hígado del sujeto puede inducir disfunción hepatocelular, por ejemplo, mal funcionamiento o muerte de al menos algunas de las células del hígado y, en consecuencia, reducción o pérdida de la función del hígado. Sin desear quedar ligados a una teoría particular, la reducción o pérdida de la función del hígado en el sujeto después de la reducción del suministro de sangre al hígado puede tener un impacto compensatorio en el crecimiento del hígado ectópico en el ganglio linfático después del trasplante de hepatocitos al ganglio linfático. Dicho de otro modo, la etapa de reducir el suministro de sangre al hígado, en determinados aspectos, facilita la formación del hígado ectópico en el ganglio linfático, y/o, en determinados aspectos, mejora el rendimiento funcional del hígado ectópico en el ganglio linfático. En determinados aspectos de los métodos, la administración de células se lleva a cabo mediante inyección directa (por ejemplo, mediante cirugía mayor o inyección percutánea) de los hepatocitos o inyección de hepatocitos guiada por EE, cuando se realiza junto con la etapa de reducir el suministro de sangre al hígado.
- 55 Se puede utilizar un método quirúrgico para reducir el suministro de sangre al hígado, lo que puede implicar redirigir el flujo de sangre desde la vena porta. Por ejemplo, se realiza un procedimiento de derivación portosistémica intrahepática transyugular (DPIT) para establecer una comunicación directa entre la vena porta de entrada y la vena hepática de salida, por tanto, se puede reducir el flujo sanguíneo a través del hígado. La DPIT se refiere a un canal artificial dentro del hígado que establece comunicación entre la vena porta y la vena hepática. La DPIT se ha utilizado como terapia independiente para aliviar el impacto hemodinámico esplácnico y sistémico perjudicial de la hipertensión portal progresiva debido a una hepatopatía terminal. En determinados aspectos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen el uso de DPIT junto con un trasplante de hepatocitos en un ganglio linfático para producir un hígado ectópico en el ganglio linfático.

- Las derivaciones portosistémicas intrahepáticas transyugulares se pueden colocar quirúrgicamente en el hígado mediante una cirugía mayor que implica la apertura de la cavidad abdominal o un procedimiento mínimamente invasivo. En determinados aspectos, las derivaciones portosistémicas intrahepáticas transyugulares se colocan con guía fluoroscópica. El acceso al hígado se puede obtener a través de la vena yugular interna en el cuello. Una vez confirmado el acceso a la vena yugular, se puede colocar una guía y una camisa introductora para facilitar la colocación de la derivación. Esta etapa puede permitir el acceso a la vena hepática del paciente desde la vena cava superior hacia la vena cava inferior y finalmente a la vena hepática. Una vez que el catéter está en la vena hepática, se puede obtener una presión capilar para calcular el gradiente de presión en el hígado. Después de esto, se puede inyectar dióxido de carbono para localizar la vena porta. A continuación, se puede hacer avanzar una aguja especial conocida como Colapinto a través del parénquima hepático para conectar la vena hepática con la vena porta grande, cerca del centro del hígado. A continuación, se puede crear el canal para la derivación inflando un balón de angioplastia dentro del hígado a lo largo del tubo creado por la aguja. La derivación se puede completar mediante la colocación de un tubo de malla especial conocido como endoprótesis vascular o endoinjerto para mantener el tubo entre la vena porta de mayor presión y la vena hepática de menor presión. Después del procedimiento, se pueden tomar imágenes fluoroscópicas para mostrar la ubicación.
- En otros determinados aspectos, el procedimiento de derivación portocava se realiza para establecer comunicación entre la vena porta y la vena cava inferior, para reducir el suministro de sangre al hígado. La derivación portocava se puede realizar mediante métodos quirúrgicos, tales como, pero sin limitación, el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Otros procedimientos quirúrgicos que se pueden utilizar pueden incluir derivación portocava de extremo a lado o de lado a lado (DPCLL), derivaciones mesocavas (DMC) con interposición de injertos H o C y derivaciones esplenorenales (DEN) (centrales o distales).
- En determinados aspectos, los hepatocitos se administran a un ganglio linfático después de que se reduce el suministro de sangre al hígado. En determinados aspectos, el trasplante de hepatocitos se realiza inmediatamente después de la etapa de reducir el suministro de sangre al hígado. En determinados aspectos, el trasplante de hepatocitos se realiza un tiempo después de la etapa de reducir el suministro de sangre al hígado, por ejemplo, aproximadamente 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 10 días, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. En determinados aspectos, dicho intervalo no puede ser mayor que un determinado periodo de tiempo, para evitar una insuficiencia hepática completa, que puede ser potencialmente mortal. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, el intervalo es inferior a aproximadamente 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 10 días, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. Como alternativa, el trasplante de hepatocitos también se puede realizar poco antes de la etapa de reducir el suministro de sangre al hígado. En determinados aspectos, el intervalo puede ser inferior a aproximadamente 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 10 días, 2 semanas o 3 semanas. El intervalo entre las dos etapas puede depender del grado de reducción del suministro de sangre al hígado y del estado de salud del sujeto que recibe los procedimientos. Para determinar el intervalo entre las dos etapas descritas en el presente documento puede intervenir la evaluación médica de cada caso.
- El rechazo de un trasplante puede ser un problema asociado con cualquier procedimiento de trasplante que implique el implante de órganos o células no autólogos. Se puede aplicar inmunodepresión para prevenir o mejorar el rechazo de trasplante inducido por procedimientos de acuerdo con los métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, se pueden administrar fármacos inmunodepresores al sujeto poco antes o inmediatamente después de que se complete el trasplante de células, o aproximadamente 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 10 días, 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 2 años, 3 años, 4 años o incluso más después del procedimiento.
- En el presente documento se pueden aplicar diferentes enfoques de inmunodepresión. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, al sujeto se le administra un inmunodepresor para la inmunodepresión por inducción, que puede incluir todos los medicamentos administrados inmediatamente después del trasplante en dosis intensificadas con el fin de prevenir el rechazo agudo. Ejemplos no limitantes de medicamentos asociados pueden incluir metilprednisolona, Atgam, timoglobulina, OKT3, basiliximab, solumedrol y daclizumab. Al sujeto también se le puede administrar un inmunodepresor para el mantenimiento de la inmunodepresión, que puede incluir todos los medicamentos inmunodepresores administrados antes, durante o después del trasplante con la intención de mantenerlos a largo plazo. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, se puede utilizar prednisona, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato de mofetilo, azatioprina, Prograf o rapamicina para la inmunodepresión de mantenimiento como se describe en el presente documento. En determinados aspectos, al sujeto también se le puede administrar un inmunodepresor para la inmunodepresión antirrechazo, que puede incluir todos los medicamentos inmunodepresores administrados con el fin de tratar un episodio de rechazo agudo durante el período inicial posterior al trasplante o durante un período de seguimiento específico, por ejemplo, hasta 30 días después del diagnóstico de rechazo agudo. Ejemplos no limitantes de medicamentos asociados pueden incluir metilprednisolona, Atgam, OKT3, timoglobulina, basiliximab o daclizumab. Otros ejemplos de inmunodepresores que se pueden utilizar en los métodos en cuestión también pueden incluir otros esteroides (tales como corticoesteroides, dexametasona y prednisona), inhibidores de Cox-1 y Cox-2, antibióticos macrólidos (tales como rapamicina y tacrolimus) y otras sustancias que limitan, reducen o suprimen los linfocitos B, linfocitos T y/u otra actividad inmunitaria innata.

#### **4. Producción de tejido ectópico a partir de células trasplantadas**

Los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento se pueden aplicar para trasplantar varios tipos de células, incluidos, pero sin limitación, hepatocitos, células renales o fragmentos de tejido renal, células pancreáticas o islotes de Langerhans, células tímicas o fragmentos de timo, o células pulmonares o fragmentos de tejido pulmonar. Las células trasplantadas al ganglio linfático pueden injertarse y formar tejido ectópico que puede complementar o aumentar una o más funciones de un órgano normal de un sujeto.

Las células que se van a trasplantar en un ganglio linfático pueden ser una población de células homogénea o una población de células heterogénea, en función del propósito del trasplante de las células. Por ejemplo, en determinados aspectos, se administra una población de hepatocitos homogéneos a un ganglio linfático para producir un hígado ectópico. En determinados aspectos, cuando se cultiva un hígado ectópico, se administra a un ganglio linfático una población heterogénea de células, por ejemplo, hepatocitos con otras células parenquimatosas hepáticas adicionales. En determinados aspectos, se administra una población de células renales heterogéneas o fragmentos de riñón en un ganglio linfático con el fin de generar un riñón ectópico en el ganglio linfático. En determinados aspectos, un riñón embrionario de un sujeto donante o un organoide renal que se genera mediante métodos de diferenciación *in vitro* (tales como los descritos en las publicaciones de patentes internacionales números WO2014182885A2, WO2019006127A1 y WO2018227101A1) se obtiene y se procesa (por ejemplo, picado o triturado) en pequeños fragmentos y resuspendido en un líquido para formar una solución que se administrará en un ganglio linfático. La solución incluye diferentes tipos de células que constituyen el riñón embrionario o el organoide renal. En determinados aspectos, se administra una población de células pancreáticas heterogéneas al ganglio linfático para generar un páncreas ectópico.

Los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento pueden implicar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células en el ganglio linfático de un sujeto. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se utiliza en el presente documento cuando se refiere a una población de células que se van a trasplantar o administrar, puede significar la cantidad de células adecuada en la población de células, por ejemplo, las células a trasplantar, o la composición que incluye las células a trasplantar, que sea eficaz para producir un efecto terapéutico deseado en el sujeto que recibe el trasplante de células en el ganglio linfático con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la cantidad de una población de células trasplantadas a un sujeto es suficiente para producir un resultado estadísticamente significativo, cambio medible en uno o más síntomas de la enfermedad o afección que el trasplante pretende tratar, por ejemplo, enfermedad hepática o enfermedad renal terminal. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz depende del propósito médico previsto al aplicar los métodos o sistemas en cuestión. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la anamnesis, edad, afección, sexo del sujeto, así como por la gravedad y el tipo de afección médica en el sujeto, y la administración de otros principios farmacéuticamente activos.

Dependiendo del propósito previsto de aplicar los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento, se pueden administrar diferentes cantidades de células a un ganglio linfático para hacer crecer un tejido ectópico. Puede haber al menos aproximadamente 1 millón, 2 millones, 3 millones, 4 millones, 5 millones, 7 millones, 9 millones, 10 millones, 15 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 150 millones, 200 millones, 300 millones, 500 millones, 750 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 5 mil millones, 10 mil millones, 20 mil millones, 30 mil millones, 50 mil millones o incluso más células administradas por ganglio linfático. En determinados aspectos, aproximadamente 10 millones, 15 millones, 20 millones, 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células se pueden administrar en un solo ganglio linfático. En determinados aspectos, en un solo ganglio linfático se pueden administrar de aproximadamente 50 millones a aproximadamente 200 millones de células.

La población de células que se van a administrar puede tener al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 66 %, un 67 %, un 68 %, un 69 %, un 70 %, un 71 %, un 72 %, un 73 %, un 74 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o aproximadamente el 100 % de células viables. Se pueden aplicar medidas disponibles para promover la viabilidad celular con el fin de mantener el nivel de viabilidad celular en la población de células que se van a administrar. En determinados aspectos, antes de la administración celular, el estado de viabilidad de la población de células (por ejemplo, porcentaje de viabilidad u otros parámetros de viabilidad celular) se puede medir para garantizar que se administre una población de células viables y, en consecuencia, se pueda producir tejido ectópico funcional en el ganglio linfático.

En aspectos no limitantes, el tejido ectópico se puede formar al menos aproximadamente 5 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días, 100 días, 110 días, 120 días, 130 días, 140 días, 150 días, 160 días, 170 días, 180 días, 190 días o aproximadamente 200 días después del trasplante de los distintos tipos de células divulgados en un ganglio linfático. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los hepatocitos se pueden administrar a los ganglios linfáticos a través de EE, y los hepatocitos injertados pueden formar un tejido hepático aproximadamente 60, aproximadamente 90 o aproximadamente 150 días después del trasplante de los hepatocitos. En aspectos no limitantes, el tejido ectópico se puede formar aproximadamente 5 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días,

55 días, 60 días, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días, 100 días, 110 días, 120 días, 130 días, 140 días, 150 días, 160 días, 170 días, 180 días, 190 días o aproximadamente 200 días después del trasplante de los distintos tipos de células divulgados en un ganglio linfático. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los hepatocitos se pueden administrar a los ganglios linfáticos mediante EE y los hepatocitos injertados pueden comenzar a formar tejido hepático aproximadamente 60, aproximadamente 90 o aproximadamente 150 días después del trasplante de los hepatocitos.

5 Las células que se van a administrar se pueden obtener de diferentes fuentes y mediante varios métodos diferentes. Las células pueden ser alogénicas, xenogénicas o autólogas del sujeto. Las células se pueden obtener directamente de un tejido de un donante vivo. Por ejemplo, los hepatocitos se aíslan y se preparan para trasplante de acuerdo con los métodos descritos en las patentes de EE. UU. n.º 9125891B2 y 6610288B1, las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 20120045764A1 y 20040110289A1. En determinados aspectos, las células que se van a administrar se obtienen de fuentes *in vitro*. Se pueden cultivar *in vitro* células madre, tal como células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre trofoblásticas o cualquier otro tipo de células madre pluripotentes o multipotentes, y diferenciarse en determinados tipos de células o poblaciones de células que son adecuadas para los fines de aplicar los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, los organoides renales o los islotes pancreáticos se obtienen utilizando métodos de diferenciación *in vitro* y se preparan para los procedimientos de trasplante descritos en el presente documento. Las células que se entregarán también se pueden almacenar, por ejemplo, crioconservar, antes del trasplante. Se pueden utilizar protocolos convencionales de crioconservación y recuperación siempre que el nivel de viabilidad celular sea adecuado para la posterior administración de células y formación de tejido ectópico en el ganglio linfático. En determinados aspectos, las células que se van a administrar se modifican genéticamente de modo que uno o más genes de las células se modifican, o las células se modifican para expresar uno o más genes exógenos. Cualquier método de edición de genes disponible, tal como tecnología de recombinación homóloga, transposasa/transposición, nucleasa en dedos de cinc, TALEN y CRIPSR, por ejemplo, CRISPR-Cas9, se puede aplicar para la modificación genética de las células que se van a administrar.

10 Las células se pueden preparar y suspender en soluciones para trasplante. En determinados aspectos, la solución en suspensión que contiene la población celular puede incluir además excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" puede referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos del sujeto (por ejemplo, sujeto humano o animales no humanos) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

15 35 Como se utiliza en el presente documento, el término "solución" puede incluir un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células de la divulgación permanecen viables. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuosas, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de dichos vehículos y diluyentes es bien conocido en la materia. La solución es preferentemente estéril y fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. La solución puede ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos, a través del uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Las soluciones de la presente divulgación se pueden preparar mediante la incorporación de células funcionales viables como se describe en el presente documento en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según sea necesario, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración.

20 40 45 Los ejemplos no limitantes de sustancias o materiales que pueden servir como excipientes farmacéuticamente aceptables para los fines de la presente divulgación pueden incluir: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carmelosa sódica, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco; manteca de cacao y ceras de suppositorio; aceites, tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de pH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; espesantes, tales como polipéptidos y aminoácidos; componente sérico, tal como seroalbúmina, HDL y LDL; alcoholes C2-C12, tales como etanol; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. Los agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes aromatizantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la formulación. Los términos tales como "excipiente", "vehículo", "vehículo farmacéuticamente aceptable" o similares se utilizan indistintamente en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una relleno líquido o sólido, diluyente, portador, adyuvante de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco magnesio, estearato de calcio o cinc o ácido esteárico) o un material encapsulante de disolvente, implicados en llevar o transportar el compuesto, materiales o células en cuestión, hasta un órgano o parte del cuerpo. Cada excipiente debe ser

"aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación, por ejemplo, las células que se van a trasplantar, y no perjudiciales para el sujeto.

- 5 Despues de administrarse al ganglio linfático, las células de la presente divulgación pueden injertarse, proliferar y producir un tejido ectópico en el ganglio linfático. Como se utiliza en el presente documento, el término "injerto" o equivalentes gramaticales del mismo pueden referirse al proceso en el que una o más células se implantan en un ganglio linfático diana y sobreviven y se vuelven biológicamente activas (por ejemplo, que realizan función celular) dentro del ganglio linfático. Como se utiliza en el presente documento, el término "proliferar" o equivalentes gramaticales del mismo puede referirse al proceso por el cual una célula experimenta una o más series de mitosis y genera una serie de células descendientes, pudiendo dar lugar el proceso de proliferación a un aumento exponencial en el recuento de células. En determinados aspectos, las células proliferan a un nivel elevado, de modo que la masa del tejido ectópico finalmente producido es significativamente mayor que la masa original de las células administradas al ganglio linfático. En determinados aspectos, la proliferación celular es moderada. En determinados aspectos, el aumento de masa es al menos aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces, 17,5 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 120 veces, 150 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o 1000 veces, por ejemplo, en comparación con la masa de las células trasplantadas originalmente. En determinados aspectos, el número de células aumenta al menos aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces, 17,5 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 120 veces, 150 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o 1000 veces, por ejemplo, en comparación con el número de células trasplantadas originalmente.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- En determinados aspectos, la vascularización puede tener lugar en el ganglio linfático que recibe el trasplante de células, por ejemplo, puede haber vasos sanguíneos que se infiltran y forman una red vascular dentro del ganglio linfático, en determinados aspectos, dentro del tejido ectópico. En determinados aspectos, la red vascular infiltrante puede formar la base del suministro de sangre al tejido ectópico. En determinados aspectos, la red vascular infiltrante puede ayudar a transportar productos o materiales metabólicos hacia y/o desde el tejido ectópico. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un hígado ectópico puede producir glucógeno, glucosa y/o bilis, que se pueden transportar al torrente sanguíneo principal mediante la red vascular formada dentro del sitio del trasplante (el ganglio linfático). En determinados aspectos, un páncreas ectópico puede producir y secretar insulina, glucagón y/o somatostatina, que también se puede introducir en el torrente sanguíneo principal del cuerpo del sujeto a través de la red vascular formada dentro del ganglio linfático. En determinados aspectos, el sistema de circulación linfática también sirve como canal de transporte de las sustancias producidas por el tejido ectópico. De este modo, el sistema linfático puede, en determinados aspectos, suministrar dichas sustancias al sistema circulatorio sanguíneo a través de su transmisión en otras partes del cuerpo.

### **5. Enfermedades y afecciones**

- 40 Los métodos y sistemas se pueden aplicar para tratar una enfermedad o afección en un sujeto. En determinados aspectos, los métodos y sistemas encuentran uso en el crecimiento de uno o más tejidos ectópicos en ganglios linfáticos, que complementan o aumentan la función de un órgano del sujeto y, como resultado, puede mejorar uno o más síntomas o curar la enfermedad o condición que padece el sujeto.

#### ***A. Enfermedades y afecciones del hígado***

- 45 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas se pueden utilizar para administrar hepatocitos en un ganglio linfático del sujeto, permitiendo que los hepatocitos se injerten y produzcan un hígado ectópico en el ganglio linfático. El hígado ectópico puede desempeñar una o más funciones que un órgano hepático normal y sano, tal como, pero sin limitación, producción de bilis, que puede ayudar a eliminar los desechos y descomponer las grasas en el intestino delgado durante la digestión; producción de proteínas plasmáticas, por ejemplo, albúmina; producción de colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas para ayudar a transportar grasas por el cuerpo; regulación de la glucosa en sangre mediante la conversión del exceso de glucosa en glucógeno para su almacenamiento (glucogénesis) y despolimerización del glucógeno (gluconólisis) cuando se necesita glucosa; conversión del exceso de hidratos de carbono y proteínas en ácidos grasos y triglicéridos; desaminación y transaminación de aminoácidos; conversión de la parte no nitrogenada de los aminoácidos en glucosa o lípidos; oxidación de triglicéridos para producir energía; procesamiento de la hemoglobina para aprovechar su contenido de hierro (el hígado almacena hierro); conversión de amoníaco venenoso en urea; diálisis de sangre para eliminar ciertos fármacos y otras sustancias venenosas; síntesis de factores de coagulación necesarios para la coagulación de la sangre; resistir infecciones mediante la producción de factores inmunitarios y la eliminación de bacterias del torrente sanguíneo; eliminación de bilirrubina de los glóbulos rojos.
- 50
- 55
- 60

- 65 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas se pueden utilizar para tratar varias enfermedades o afecciones hepáticas diferentes. Dichas enfermedades o afecciones hepáticas pueden implicar insuficiencia hepática o reducción de una o más funciones hepáticas. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y/o trastornos hepáticos que pueden tratarse mediante los métodos de la presente divulgación incluyen insuficiencia

- hepática aguda, cirrosis, cáncer de hígado, hepatitis, esteatosis hepática y esteatosis hepática no alcohólica. La afección hepática puede estar asociada con trastornos metabólicos (por ejemplo, trastornos metabólicos pediátricos), incluidos, pero sin limitación, tirosinemia, enfermedad de la orina con olor a sirope de arce, fenilcetonuria, síndrome de Crigler-Najjar, oxalosis, hiperoxaluria, hemocromatosis, deficiencia de antitripsina α-1, enfermedad de Wilson, 5 síndromes de colestasis intrahepática familiar y polineuropatía amiloide familiar. Los presentes métodos y sistemas pueden encontrar un uso particular en el tratamiento de hepatopatías terminales y/o fibrosis hepática, por ejemplo, aquellas provocadas por la infección por hepatitis B, infección por hepatitis C, consumo de alcohol, cirrosis, esteatohepatitis no alcohólica o hemocromatosis.
- 10 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas proporcionados en el presente documento, cuando se aplican a un sujeto que los necesita, mejoran uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección hepática, por ejemplo, recuperación de una o más funciones hepáticas y/o, en determinados aspectos, prolongar la supervivencia del sujeto que experimenta una enfermedad o afección hepática potencialmente mortal antes del trasplante de células. Por ejemplo, los sujetos que reciben el trasplante de hepatocitos de acuerdo con la presente 15 divulgación pueden encontrar mejoras en los resultados de sus pruebas de función hepática, tales como la prueba de alanina transaminasa (ALT), prueba de aspartato aminotransferasa (AST), prueba de fosfatasa alcalina (ALP), prueba de albúmina, prueba de bilirrubina. Dicha mejora puede ser de al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o aproximadamente el 100 % de recuperación en comparación con otros sujetos sanos o en comparación con los resultados de las pruebas del mismo sujeto antes de 20 sufrir la enfermedad o afección hepática. En determinados aspectos, la esperanza de vida del sujeto que recibe el trasplante de hepatocitos se prolonga durante al menos aproximadamente 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 12 años, 15 años, 18 años, 20 años, 25 años, 30 años, 40 años, 50 años, 60 años o incluso más.
- 25 **B. Enfermedades y afecciones renales**
- En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas se pueden utilizar para administrar células renales o fragmentos de tejido renal en un ganglio linfático del sujeto, permitiendo que las células renales se injerten y produzcan un riñón ectópico en el ganglio linfático. El riñón ectópico puede desempeñar una o más funciones que 30 un órgano renal normal y sano. Por ejemplo, el riñón ectópico puede realizar, en cierta medida o en su totalidad, la función principal del riñón: producción de orina, que puede implicar la filtración de sustancias de pequeños pesos moleculares (por ejemplo, desechos metabólicos) de la sangre para producir un ultrafiltrado que acaba convirtiéndose en orina mientras retiene células y proteínas grandes en la sangre; y reabsorción de determinadas sustancias (por ejemplo, iones y glucosa) del ultrafiltrado al capilar peritubular. En determinados aspectos, el riñón ectópico también 35 puede participar en el mantenimiento de la homeostasis de todo el cuerpo como lo puede hacer un riñón normal, tal como, pero sin limitación, equilibrio ácido-base, concentraciones de electrolitos, volumen de líquido extracelular y presión arterial.
- En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas encuentran uso en el tratamiento de varias 40 enfermedades o afecciones renales diferentes. Dichas enfermedades o afecciones renales pueden implicar insuficiencia renal o reducción de una o más funciones renales. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y/o trastornos renales que pueden tratarse mediante los métodos de la presente divulgación incluyen insuficiencia renal aguda, enfermedad renal crónica, glomerulonefritis, lupus, enfermedad renal poliquística, nefropatía, nefrosis, malformaciones renales y cáncer de riñón. Los presentes métodos y sistemas pueden encontrar un uso particular en 45 el tratamiento de la enfermedad renal en etapa terminal (insuficiencia renal), por ejemplo, los provocadas por diabetes, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, lupus y nefropatía por IgA), enfermedades genéticas (por ejemplo, poliquistosis renal), síndrome nefrótico y problemas de las vías urinarias.
- En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas proporcionados en el presente documento, 50 cuando se aplican a un sujeto que los necesita, mejoran uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección renal, por ejemplo, recuperación de una o más funciones renales y/o, en determinados aspectos, prolongar la supervivencia del sujeto que experimenta una enfermedad o afección renal potencialmente mortal antes del trasplante de células. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los sujetos que reciben el trasplante de células o fragmentos de riñón de acuerdo con la presente divulgación encuentran una mejora en los resultados de sus pruebas de función 55 renal, tales como análisis de sangre para la creatinina sérica, tasa de filtración glomerular (TFG), nitrógeno de urea en sangre (NUS). Dicha mejora puede ser de al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o aproximadamente el 100 % de recuperación en comparación con otros sujetos sanos o en comparación con los resultados de las pruebas del mismo sujeto antes de sufrir la enfermedad o afección renal. En determinados aspectos, la esperanza de vida del sujeto que recibe el trasplante de células o fragmentos de riñón puede prolongarse durante al menos aproximadamente 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 12 años, 15 años, 18 años, 20 años, 25 años, 30 años, 40 años, 50 años, 60 años o incluso más.
- 65 **C. Enfermedades y afecciones pancreáticas**
- En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas se utilizan para administrar células pancreáticas

(por ejemplo, células  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  y pancreáticas) o islotes en un ganglio linfático del sujeto, permitiendo que las células o islotes pancreáticos se injerten y produzcan un páncreas ectópico en el ganglio linfático. El páncreas ectópico puede desempeñar una o más funciones que un páncreas sano normal. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, el páncreas ectópico secreta una o más de insulina, glucagón, somatostatina o polipéptido pancreático. En determinados aspectos, el páncreas ectópico secreta la una o más hormonas endocrinas adecuadamente en respuesta a estímulos fisiológicos. En determinados aspectos, el páncreas ectópico secreta insulina en respuesta al aumento de la concentración de glucosa en sangre y/o secreta glucagón en respuesta a la disminución de la concentración de glucosa en sangre, lo que puede ayudar a mantener la homeostasis del nivel de glucosa en sangre. Dicha respuesta de secreción puede ser proporcional al cambio en los estímulos fisiológicos. Por ejemplo, cuanto mayor sea el aumento de la glucosa en sangre, más insulina secreta el páncreas ectópico, cuya proporción puede ser, al menos parcialmente, equivalente o similar a un páncreas sano normal en otro sujeto sano o al páncreas del mismo sujeto antes de sufrir la enfermedad pancreática.

En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas encuentran uso en el tratamiento de una serie de enfermedades o afecciones pancreáticas diferentes. Dichas enfermedades o afecciones pancreáticas pueden implicar insuficiencia pancreática o reducción de una o más funciones pancreáticas. Las enfermedades o afecciones pancreáticas tratadas mediante los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento pueden ser enfermedades o afecciones pancreáticas endocrinas. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y/o trastornos pancreáticos que pueden tratarse mediante los métodos de la presente divulgación incluyen pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, pancreatitis hereditaria y cáncer de páncreas. Los métodos y sistemas presentes pueden encontrar un uso particular en el tratamiento de la insuficiencia del páncreas u otras situaciones en las que se necesita un trasplante de páncreas.

En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas proporcionados en el presente documento, cuando se aplican a un sujeto que los necesita, mejoran uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección pancreática, por ejemplo, recuperación de una o más funciones pancreáticas y/o, en determinados aspectos, prolongar la supervivencia del sujeto que experimenta una enfermedad o afección pancreática potencialmente mortal antes del trasplante de células. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los sujetos que reciben el trasplante de células o islotes pancreáticos de acuerdo con la presente divulgación pueden encontrar una mejora en el control de la glucosa en sangre. Dicha mejora puede ser de al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o aproximadamente el 100 % de recuperación en comparación con otros sujetos sanos o en comparación con los resultados de las pruebas del mismo sujeto antes de sufrir la enfermedad o afección pancreática. En determinados aspectos, la esperanza de vida del sujeto que recibe el trasplante de células o islotes pancreáticos puede prolongarse durante al menos aproximadamente 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 12 años, 15 años, 18 años, 20 años, 25 años, 30 años, 40 años, 50 años, 60 años o incluso más.

#### ***D. Disfunción del sistema inmunitario/Trastornos y afecciones por inmunodeficiencia***

En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas se utilizan para administrar células tímicas o fragmentos de timo en un ganglio linfático del sujeto, permitiendo que las células o fragmentos del timo se injerten y produzcan un timo ectópico en el ganglio linfático. En determinados aspectos, el timo ectópico complementa o aumenta una o más funciones que un órgano timo sano normal puede realizar. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, el timo ectópico puede participar en la inmunomodulación del cuerpo por su participación en el crecimiento, desarrollo, maduración y selección de linfocitos T. La producción de timo ectópico de acuerdo con la presente divulgación puede encontrar uso para aumentar o modular la función del sistema inmunitario en sujetos que tienen disfunción del sistema inmunitario, por ejemplo, en sujetos ancianos o de edad avanzada (por ejemplo, mayores de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 años), o en sujetos que tengan trastornos o afecciones por inmunodeficiencia, tal como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX), inmunodeficiencia común variable (IDCV), inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), quemaduras graves, quimioterapia, radiación, diabetes, desnutrición, síndrome de inmunodeficiencia adaptativa (SIDA), leucemia, infecciones víricas graves y mieloma múltiple.

En determinados aspectos, células o fragmentos tímicos de un sujeto donante se introducen en un ganglio linfático del sujeto receptor antes del trasplante de órgano u otra célula del mismo sujeto donante. La producción del timo ectópico en el ganglio linfático puede inducir tolerancia en el sujeto receptor hacia el sujeto donante, lo que puede resultar beneficioso para el posterior trasplante de órganos o células. El trasplante de células del timo, en estos aspectos, se puede realizar al menos aproximadamente 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses o 1 año antes del trasplante de órgano u otra célula, de modo que se pueda establecer en el receptor la tolerancia inmunitaria adecuada al sujeto donante. El trasplante de células tímicas que se puede describir en el presente documento se puede aplicar junto con cualquier tipo de trasplante de órgano o trasplante de cualquier otro tipo de células, y puede reducir la respuesta de rechazo al trasplante observada en un receptor que recibe por lo demás el mismo trasplante de órgano o células pero sin el trasplante de células tímicas de acuerdo con la presente divulgación.

La esperanza de vida del sujeto que recibe el trasplante de células de acuerdo con la presente divulgación puede prolongarse durante al menos aproximadamente 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7

años, 8 años, 9 años, 10 años, 12 años, 15 años, 18 años, 20 años, 25 años, 30 años, 40 años, 50 años, 60 años o incluso más.

#### ***E. Enfermedades y afecciones pulmonares***

- 5 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas se utilizan para administrar células pulmonares o fragmentos de tejido pulmonar en un ganglio linfático del sujeto, permitiendo que las células o fragmentos del pulmón se injerten y produzcan un pulmón ectópico en el ganglio linfático. El pulmón ectópico puede tener una o más funciones que un pulmón sano normal puede realizar. Por ejemplo, el pulmón ectópico puede afectar a los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). El pulmón ectópico puede aumentar la masa funcional pulmonar, que puede verse gravemente disminuida por la fibrosis progresiva en pacientes con EPOC. En determinados aspectos, los pacientes que se someten a procedimientos de reducción pulmonar que no serían candidatos para un trasplante de pulmón convencional pueden ser aptos para el trasplante de células pulmonares en los ganglios linfáticos peribronquiales.
- 10 15 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas encuentran uso en el tratamiento de varias enfermedades o afecciones pulmonares diferentes. Dichas enfermedades o afecciones pulmonares pueden implicar insuficiencia pulmonar o reducción de una o más funciones pulmonares. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y/o trastornos pulmonares que pueden tratarse mediante los métodos de la presente divulgación incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC puede estar provocada por: humo de cigarrillo y mayor consumo de tabaco, polución (química, polvo o sustancias tóxicas) y humos, trastornos genéticos (por ejemplo, antitripsina α-1, fibrosis quística), asma crónica, enfisema, bronquitis crónica o fibrosis pulmonar idiopática.
- 20 25 En determinados aspectos, los métodos (no reivindicados) y sistemas proporcionados en el presente documento pueden mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección pulmonar, por ejemplo, recuperación de una o más funciones pulmonares y/o, en determinados aspectos, prolongar la supervivencia del sujeto que experimenta una enfermedad o afección pulmonar potencialmente mortal antes del trasplante de células.

#### **6. Sujetos**

- 30 35 El sujeto que puede recibir un trasplante de células de acuerdo con la presente divulgación puede ser cualquier paciente humano, tal como un paciente con HPT, un paciente con insuficiencia renal, un paciente con diabetes de tipo I o un paciente en espera de trasplante de órgano. En determinados aspectos, el sujeto se encuentra en una etapa particular del tratamiento médico.
- 40 45 Un sujeto que recibe un trasplante de células de acuerdo con la presente divulgación puede tener cualquier edad y puede ser un adulto, un recién nacido, bebé o niño. En determinados aspectos, el sujeto tiene 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 años, o está en un intervalo de edad (por ejemplo, entre 2 y 20 años, entre 20 y 40 años, o entre 40 y 90 años). Además, un sujeto puede ser hombre o mujer.
- 50 55 Un médico certificado puede determinar la idoneidad de un sujeto para recibir un trasplante de células de acuerdo con la presente divulgación. En determinados aspectos, puede ser necesaria una evaluación exhaustiva del estado de salud del sujeto antes de realizar el trasplante de células. En determinados aspectos, el requisito para el estado de salud del sujeto puede ser significativamente inferior al de otro procedimiento de trasplante de órganos o células. Sin desear quedar ligados a una teoría particular, el procedimiento mínimamente invasivo de acuerdo con la presente divulgación puede reducir significativamente el riesgo del procedimiento quirúrgico en comparación con las cirugías mayores que normalmente se realizan para trasplante de órganos. Además, dado que las células se van a trasplantar en uno o más ganglios linfáticos y no al órgano enfermo, el requisito puede ser mucho menor, ya que no pueden existir condiciones previas para el órgano enfermo.

- 55 60 Cualquiera de los métodos y sistemas divulgados en el presente documento también se puede utilizar en un sujeto no humano, tal como un animal de laboratorio o de granja con fines de investigación o de medicina veterinaria. Ejemplos no limitantes de un sujeto no humano incluyen un perro, una cabra, una cobaya, un hámster, un ratón, un cerdo, un primate no humano (por ejemplo, un gorila, un homínido, un orangután, un lémur o un babuino), una rata, una oveja o una vaca.

#### **7. Sistemas**

- 65 La presente divulgación proporciona además sistemas para trasplantar células y hacer crecer un tejido ectópico funcional en un ganglio linfático. El sistema puede incluir un endoscopio y un inyector que tiene una aguja y una o más células en una solución en suspensión contenida en el mismo. El endoscopio y la aguja se pueden configurar para avanzar juntos a lo largo de una luz corporal (por ejemplo, el tubo GI, las vías respiratorias o las vías urinarias) o una cavidad corporal cerrada (por ejemplo, la cavidad abdominal, la cavidad pélvica o la cavidad torácica) del sujeto, y el

inyector puede configurarse para administrar la una o más células a través de la aguja.

Como se ha indicado anteriormente, en determinados aspectos, la solución en suspensión puede tener al menos

- 5 aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones o 10 mil millones de células por ml. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión de células que tiene aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones o 10 mil millones de células por ml.
- 10 En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión de células que tiene como máximo aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones o 10 mil millones de células por ml.
- 15 15 En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión de células que tiene como máximo aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones, 100 millones, 200 millones, 300 millones, 400 millones, 500 millones, 600 millones, 700 millones, 800 millones, 900 millones, mil millones, 3 mil millones, 5 mil millones, 8 mil millones o 10 mil millones de células por ml.

En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión de hepatocitos que tiene al menos aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml para la producción de un hígado

- 20 ectópico. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión de hepatocitos que tiene aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml para la producción de un hígado ectópico. En determinados aspectos, el inyector, como se describe en el presente documento, tiene una solución en suspensión de hepatocitos que tiene como máximo aproximadamente 30 millones, 40 millones, 45 millones, 50 millones, 55 millones, 60 millones, 70 millones, 80 millones, 90 millones o 100 millones de células por ml para la producción de un hígado ectópico.
- 25

Como se ha indicado anteriormente, en determinados aspectos, la aguja puede tener un diámetro interior de como

- 30 máximo aproximadamente 700 µm, 600 µm, 500 µm, 450 µm, 400 µm, 300 µm, 260 µm, 250 µm o 200 µm. En determinados aspectos, la aguja tiene un diámetro interior de como máximo aproximadamente 260 µm. En determinados aspectos, el diámetro interior de la aguja es de aproximadamente 700 µm, 600 µm, 500 µm, 450 µm, 400 µm, 300 µm, 260 µm, 250 µm o 200 µm. En determinados aspectos, el diámetro interior de la aguja es de aproximadamente 260 µm. La aguja puede tener un diámetro exterior de como máximo aproximadamente 1 mm, 900 µm, 800 µm, 750 µm, 700 µm, 650 µm, 600 µm, 550 µm, 520 µm, 510 µm, 500 µm, 480 µm, 450 µm o 400 µm.
- 35 En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es como máximo de aproximadamente 510 µm. En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es de aproximadamente 1 mm, 900 µm, 800 µm, 750 µm, 700 µm, 650 µm, 600 µm, 550 µm, 520 µm, 510 µm, 500 µm, 480 µm, 450 µm o 400 µm. En determinados aspectos, el diámetro exterior de la aguja es de aproximadamente 510 µm. En determinados aspectos, la aguja es de un determinado calibre, como se prescribe de acuerdo con la norma ISO 7864:2016. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la aguja tiene aproximadamente un calibre de 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27 (ga). En determinados aspectos, la aguja tiene como máximo un calibre de aproximadamente 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la aguja del sistema puede tener como máximo un calibre de aproximadamente 25. En determinados aspectos, la aguja tiene un tamaño no convencional, por ejemplo, que tiene una pared delgada manteniendo al mismo tiempo un diámetro
- 40 interior grande y un diámetro exterior pequeño.
- 45

Los sistemas y métodos proporcionados en el presente documento pueden ser particularmente útiles para células de un diámetro promedio de aproximadamente 20 µm, por ejemplo, hepatocitos. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría específica, el tamaño de las células que se van a administrar puede ser un factor que contribuya a determinar la concentración de células de trabajo en la solución en suspensión, el diámetro interior de la aguja utilizada para la administración de células y el nivel de viabilidad celular en el inyector antes de la administración de células y después de la administración de células. Para células de un diámetro medio inferior a 20 µm, el tamaño de la aguja puede ser inferior a 25 ga, mientras que la concentración de células y el número total de células en la solución en suspensión pueden ser mayores en comparación con las células de un diámetro medio de aproximadamente 20 µm, por ejemplo, los parámetros como se indicó anteriormente. Por otra parte, para células de un diámetro medio superior a 20 µm, el tamaño de la aguja puede ser, por ejemplo, mayor de 25 ga, mientras que la concentración de células y el número total de células en la suspensión pueden ser inferiores en comparación con las células de un diámetro medio de aproximadamente 20 µm, por ejemplo, los parámetros como se indicó anteriormente.

60 **8. Kits**

La presente divulgación proporciona además kits que contienen materiales útiles para realizar cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento. En determinados aspectos, el kit incluye un recipiente que contiene una o más células divulgadas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las células se pueden proporcionar en el recipiente congeladas. En determinados aspectos, las células se pueden proporcionar en una solución, por ejemplo, un medio. En determinados aspectos, el recipiente puede incluir de aproximadamente 10

millones a aproximadamente 500 millones de células. En determinados aspectos, el recipiente puede comprender una población de células homogénea. Como alternativa, el recipiente puede contener una población de células heterogénea. Ejemplos no limitantes de células que se pueden proporcionar en el recipiente incluyen hepatocitos, células renales o fragmentos de tejido renal, células pancreáticas o islotes de Langerhans, células tímicas o fragmentos de tejido de timo, o células pulmonares o fragmentos de tejido pulmonar.

5 En determinados aspectos, el kit puede incluir además un segundo recipiente que comprende una solución para introducir las células en un ganglio linfático como se divulga en el presente documento.

10 En determinados aspectos, el kit puede incluir además un dispositivo (o sistema) para administrar las células a un ganglio linfático como se divulga en el presente documento. En determinados aspectos, el kit puede incluir además un endoscopio como se divulga en el presente documento. En determinados aspectos, el endoscopio está acoplado a la aguja. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, el kit puede incluir una aguja y/o endoscopio para administrar las células a un ganglio linfático como se divulga en el presente documento. En la sección sistemas anterior se divultan 15 ejemplos no limitantes de dichos dispositivos de administración.

### Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente algunos métodos de la presente divulgación, pero no están previstos para limitar el alcance de la divulgación; se entenderá por su carácter ilustrativo que de manera alternativa se pueden utilizar otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la materia.

#### Ejemplo 1. Aislamiento de hepatocitos para trasplante y prueba de viabilidad

25 Este ejemplo demuestra que la viabilidad de los hepatocitos aislados no se ve afectada significativamente cuando la suspensión celular se administra a través de agujas de determinados tamaños de acuerdo con la presente divulgación. Este ejemplo demuestra que los hepatocitos aislados y administrados de acuerdo con un método ilustrativo de la presente divulgación pueden tener una viabilidad adecuada para el trasplante.

30 Las células hepáticas se aislaron de acuerdo con el siguiente protocolo. En primer lugar, se obtuvo quirúrgicamente el lóbulo hepático izquierdo de un perro donante y se transportó mediante técnica de almacenamiento en frío (conservación estática con solución Belzer a 4 °C) en un recipiente de doble bolsa con hielo para su posterior procesamiento. Las células hepáticas se aislaron mediante el método de perfusión de colagenasa en dos etapas descrito por Seglen (Seglen P. O., Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol, 1976; 13:29-63). En síntesis, 35 se colocó una cánula portal o cánula en cualquier vaso grande. El hígado se perfundió con solución de EDTA (0,02 %) a 37 °C, a un caudal de 50 ml por minuto durante 10 minutos en una placa de cultivo. Posteriormente, la solución de colagenasa (37 °C) se recirculó a través de la muestra de hígado al mismo caudal. Diez minutos tarde, se rompió la cápsula hepática y el parénquima hepático digerido se suspendió en la solución de Hanks enfriada con hielo o en la solución Plasma-Lyte A que contenía gluconato de calcio y seroalbúmina humana. La suspensión de células hepáticas 40 resultante se filtró y se lavó tres veces.

45 Se utilizó la prueba de exclusión con azul tripán para determinar la viabilidad de los hepatocitos aislados en las soluciones en suspensión en diferentes etapas a lo largo de los experimentos que se describen a continuación. En estos experimentos, se probaron diferentes lotes de soluciones de suspensión que tienen diferentes concentraciones celulares para determinar la viabilidad celular antes y después de pasar por las agujas de EE AAF de diferentes calibres. La **figura 3** es un gráfico que resume los resultados de viabilidad celular obtenidos de los experimentos de los dos lotes de células. Como se muestra en la figura, la mayor parte, si no todas las soluciones probadas, antes y después de pasar por cualquier aguja de EE probada, tenían niveles de viabilidad celular similares.

50 Agujas utilizadas en los experimentos:

Aguja de calibre 19 (19 ga) (Covidien: N.º de ref. DSN-19-01: volumen no utilizado aproximado de 1,2 ml.

Aguja de calibre 22 (22 ga) (Covidien: N.º de ref. N22-05: volumen no utilizado aproximado de 0,5 ml.

Aguja de calibre 25 (25 ga) (Covidien: N.º de ref. DSN-25-01: volumen no utilizado aproximado de 1,1 ml.

55

#### Lote n.º 1:

N.º ID del donante: 6303.

60 Viabilidad inicial después de la digestión del hígado y el aislamiento de hepatocitos unicelulares: 59,5 %. Para un total de 4,24 mil millones de hepatocitos vivos (5,3 M/ml con un total de 800 ml de solución).

Viabilidad celular después del ciclo de 3 lavados y lista para el trasplante: 72,04 %. Para un total de 429 millones de hepatocitos vivos (2,86 M/ml con un total de 150 ml de solución utilizada de 800 ml).

65

Los 429 millones de hepatocitos vivos se resuspendieron en aproximadamente 20 ml y se analizó su viabilidad

utilizando agujas para EE de 19, 22 y 25 ga. La tabla 1 resume las puntuaciones de viabilidad obtenidas en diferentes grupos probados en este experimento. El control representa la solución que no se introdujo a través de ninguna aguja de EE pero que, por lo demás, se manejó de la misma manera antes de la evaluación de viabilidad posterior a la prueba.

5

Tabla 1. Resultados de viabilidad del lote n.º 1

Calibre de aguja de EE	Viabilidad celular		Concentración de células fuera de la aguja
	Previa a la prueba	Posterior a la prueba	
Control	72,4 %	72,04 %	20 M/ml
19		68,2 %	15 M/ml
22		67 %	18,6 M/ml
25		72,2 %	20,1 M/ml

Lote n.º 2:

10 N.º ID del donante: 6302.

Viabilidad inicial después de la digestión del hígado y el aislamiento de hepatocitos unicelulares: 67,5 %. Para un total de aproximadamente 5 mil millones de hepatocitos vivos (5,5 M/ml con un total de 900 ml de solución), se utilizaron 600 ml de solución (aproximadamente 3,3 mil millones de células) para el experimento.

15

Viabilidad celular después del ciclo de 3 lavados y lista para el trasplante:

20 71,7 % de viabilidad para un total de 624 millones de hepatocitos vivos (4,16 M/ml en 150 ml de solución). Almacenaje en UW durante la noche para el trasplante al día siguiente.

20

76,3 % de viabilidad para un total de 567 millones de hepatocitos vivos (8,1 M/ml en 70 ml de solución). 14 tubos a 107 hepatocitos/ml, 2 ml por tubo crioconservado.

69,7 % de viabilidad para un total de 1,3 mil millones de células (9,1 M/ml en 150 ml de solución).

25 Los hepatocitos se resuspendieron a 25 M/ml y 50 M/ml y se analizó su viabilidad utilizando agujas de EE de 19, 22 y 25 ga. Las tablas 2 y 3 resumen las puntuaciones de viabilidad obtenidas en diferentes grupos probados en este experimento. El control representa la solución que no se introdujo a través de ninguna aguja de EE pero que, por lo demás, se manejó de la misma manera antes de la evaluación de viabilidad posterior a la prueba.

Tabla 2. Resultados de viabilidad del lote n.º 2 con 25 M/ml de solución

Calibre de aguja de EE	Viabilidad celular		Concentración de células fuera de la aguja
	Previa a la prueba	Posterior a la prueba	
Control	69,7 %	64,5 %	16,8 M/ml
19		71,6 %	15,4 M/ml
22		67,4 %	18,2 M/ml
25		70,7 %	13,6 M/ml

30

Tabla 3. Resultados de viabilidad del experimento n.º 2 con 50 M/ml de solución

Calibre de aguja de EE	Viabilidad celular		Concentración de células fuera de la aguja
	Previa a la prueba	Posterior a la prueba	
Control sin aguja	69,7 %	73,1 %	43,9 M/ml
19		77,3 %	42,9 M/ml
22		78,7 %	50,3 M/ml
25		77,2 %	40,6 M/ml

Ejemplo 2. Derivación portocava en perros como modelo de insuficiencia hepática

Este ejemplo describe un procedimiento quirúrgico ilustrativo que crea un modelo animal para estudiar la medicina regenerativa para el tratamiento de la insuficiencia hepática.

- 5 Como se ilustra en la **figura 4**, se puede realizar una derivación portocava completa para cortar el flujo sanguíneo principal hacia el hígado, que puede inducir daño hepático. El uso de grapadoras quirúrgicas adecuadas permitirá que este procedimiento se realice casi sin pérdida de sangre. La movilización de la vena porta (VP) principal dentro del hilio hepático es seguida por el aislamiento del conducto colédoco (CC) y la arteria hepática (AH) principal. También se realiza la disección proximal de la VP principal hacia la confluencia entre la vena mesentérica superior (VMS) y la vena esplénica (VE). Se realiza una mayor movilización de la vena cava inferior (VCI) infrahepática con una disección distal hacia las venas renales. Se realiza una ligadura completa y una sección transversal de la VP principal antes de la bifurcación (ramas derecha e izquierda) con grapas endovasculares articuladas antes de la movilización de la VP caudalmente hacia la VCI. Se realiza una movilización caudal completa de la VP hacia la VCI y se realiza una anastomosis de lado a lado entre la VP y la VCI (suturas continuas de Prolene 6-0). Esta etapa implica el pinzamiento parcial de la VCI y el pinzamiento total de la VP proximal. Después de lograr la hemostasia completa, se cierra la cavidad abdominal. Los animales se extubaron en el quirófano después de recuperarse completamente de la anestesia general.
- 10
- 15

**Ejemplo 3. Estudio preclínico de la administración de hepatocitos guiada por EE para la organogénesis en ganglios linfáticos**

- 20 Este ejemplo ilustra un tratamiento de la insuficiencia hepática en un modelo animal grande (perro) mediante la administración de hepatocitos guiada por EE en el ganglio linfático (GL) peridiudodenal.
- 25 Los experimentos preclínicos en un modelo animal grande (perro) descritos en el presente documento están aprobados por un protocolo IACUC según las pautas del USDA y se llevan a cabo en un laboratorio de pago por servicios prestados en Allegheny Health Network, Highmark, Pittsburgh, PA. En estos experimentos, los trasplantes de hepatocitos se realizan en un modelo canino en el que se ha inducido insuficiencia hepática después de que se haya desarrollado quirúrgicamente una derivación portocava (DPC) completa.
- 30 En síntesis, se prueban dos grupos de animales para confirmar que el trasplante de hepatocitos en los ganglios linfáticos peridiudodenales (GLPD) induce la generación de nuevos brotes hepáticos ectópicos (organogénesis) con citoarquitectura hepática normal y funcionalidad completa. El grupo de control se somete a una DPC quirúrgica completa seguida de una infusión simulada de solución salina normal en el GL. Los grupos de estudio se someten al mismo procedimiento de DPC inicial antes del trasplante de hepatocitos autólogo o alogénico en el GLPD mediante un enfoque de EE. Ambos grupos reciben terapia inmunodepresora inespecífica compuesta de tacrolimus y prednisona. Ambos grupos reciben un seguimiento durante 6 meses después de los procedimientos iniciales. Los animales del grupo de control experimentan insuficiencia hepática progresiva con una mortalidad del 30 % durante la duración del estudio. Los animales del grupo de estudio no muestran signos prolongados de insuficiencia hepática y no tienen mortalidad. Estos animales muestran signos de agrandamiento de los sitios de GLPD donde inicialmente se trasplantan los hepatocitos. Durante la necropsia de final del estudio, estos animales muestran el desarrollo de tejido hepático ectópico en estos GLPD con características anatómicas e histológicas normales. Los hígados ectópicos en el GLPD muestran evidencia clínica y de laboratorio de función hepática sostenible durante la duración del estudio.
- 35
- 40

- 45 Como se muestra en el diagrama del estudio en la **figura 5**, el grupo 1 sirve como grupo donante para los grupos 4 a 7, que reciben alotrasplantes de hepatocitos (TH). El grupo 2 se somete a un procedimiento de DPC junto con una infusión de placebo (solución salina) en sus GL. El grupo 3 es el grupo de control autólogo. Los grupos 4 y 5 reciben inyección directa de HT (como se muestra en la **figura 2**) en GL en niveles bajos (75 M de HT; 25 M de hepatocitos/ml, con 1 ml de solución inyectada en cada uno de los 3 GL) o niveles de dosis media (150 M HT; 50 M de hepatocitos/ml, con 1 ml de solución inyectada en cada uno de los 3 GL). Los grupos 6 y 7 reciben sus trasplantes de HT a través de un enfoque de ecoendoscopia (EE) mínimamente invasivo (como se muestra en la **figura 1A y 1B**), con las dosis baja y media descritas anteriormente.
- 50

- 55 El criterio de valoración principal es a los 90 días (N = 2 sacrificios de cada uno de los grupos 2 a 7), con seguimientos de seguridad adicionales a largo plazo desde los días 91 a 180, con sacrificios provisionales de los animales del estudio el día 120 (N = 1 de cada uno de los grupos 2 a 7), día 150 (N = 1 de cada uno de los grupos 2 a 7) y final del estudio el día 180 (N = 1 de cada uno de los grupos 2 a 7).

- 60 Los ganglios linfáticos se extraen de animales sacrificados en cada momento, se fijan en paraformaldehído y se incluyen en parafina o compuesto a temperatura de corte óptima. Las secciones se preparan y se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E) o hematoxilina con inmunotinción anti-fumarilacetato-hidrolasa (FAH). La FAH se expresa altamente en los hepatocitos y, por lo tanto, se puede utilizar para identificar hepatocitos. Se toman imágenes de las secciones y se evalúan histológicamente para detectar la presencia de hepatocitos injertados y la formación de tejido hepático ectópico.

- 65 *Análisis estadísticos*

El criterio de valoración principal es el tamaño y el peso (g) de los ganglios linfáticos con los hepatocitos recién injertados a los 90 días. Un hígado de tamaño completo para un perro mediano a grande (23,7 kg) pesa aproximadamente  $767 \pm 48$  g, lo que también sirve como estimación del peso de un hígado ectópico completamente injertado y la desviación típica de los pesos del hígado dentro de un grupo de tratamiento. Cuatro de los seis grupos de tratamiento reciben hepatocitos alogénicos en dosis de 75 M (dosis baja) o 150 M (dosis media) mediante inyección directa o infusión endoscópica en sus ganglios linfáticos. Un análisis de covarianza bidireccional (ANCOVA) de los 4 grupos alogénicos, que se ajusta al peso total del animal (kg), se utiliza para probar diferencias en los criterios de valoración en los efectos principales y la interacción del nivel de dosis y el tipo de infusión. Cinco (5) perros por grupo de tratamiento proporcionan el 92 % de potencia para detectar una diferencia de 77 g en el criterio de valoración (tamaño del efecto de 0,8) entre los dos niveles de cada efecto principal, utilizando una prueba F con  $\alpha = 0,05$  (bilateral) y el 75 % de potencia para detectar una interacción entre el nivel de dosis y el tipo de infusión cuando el tamaño del efecto es 0,6. Sin desear quedar ligados a una teoría en particular, puede haber una relación lineal subyacente, así como una correlación significativa entre el peso del hígado y el peso total según los hallazgos informados previamente (Kam *et al.*, 1987, Sohlenius-Stembeck, 2006). Ésta es una estimación conservadora de la potencia global ya que no tiene en cuenta el ajuste de covariables.

También se utiliza un ANOVA unidireccional con el mismo criterio de valoración y covariable para realizar una prueba F general para las diferencias de los grupos de tratamiento, así como comparaciones por pares relevantes entre los seis grupos. Los 6 grupos incluyen los 4 grupos alogénicos descritos anteriormente más un grupo que recibió 75 M de hepatocitos autólogos mediante infusión endoscópica y un grupo de control que recibió una infusión endoscópica de solución salina. Cinco (5) perros por grupo pueden proporcionar el 100 % de potencia para detectar al menos una diferencia de 154 g (20 % de injerto) contra la hipótesis nula de medias iguales utilizando una prueba F general con  $\alpha = 0,05$  (bilateral). Este tamaño de muestra puede alcanzar una potencia del 90 % para detectar una diferencia de al menos 230 g (30 % de injerto) para todas las pruebas de reducción utilizando el procedimiento de comparación múltiple de Tukey-Kramer (por pares) para conservar un nivel de significancia de 0,05. Estos cálculos de potencia se derivan a través del PASS 12 (Hintze, 2013).

#### *Métodos quirúrgicos y experimentales*

##### 30 (I) Colocación de líneas y apoyo animal

Se canula la vena yugular derecha con un catéter de PE y se inician líquidos de soporte intravenosos con NaCl al 0,9 %. Se administra y mantiene un agente paralizante mediante una bomba de jeringa o una terapia en bolo durante todo el procedimiento. Se canula una arteria periférica con un catéter de PE. Además, se coloca un acceso venoso central de doble luz y larga duración (vena cava superior) a través de una cervicotomía derecha y un acceso directo a la vena yugular derecha externa. El acceso a la vía central permanente se inserta y exterioriza en la región cervical posterior después de completar el procedimiento abdominal. El registro electrocardíaco se controla a través de electrodos colocados en la superficie corporal del animal. La temperatura rectal se controla continuamente. El soporte animal está de acuerdo con el SOP ANI-017, *Directrices para realizar cirugías de supervivencia en especies reguladas por el USDA y ANI-032 Regulación Térmica del Paciente Anestesiado*.

##### (II) Segmentectomía del lóbulo hepático izquierdo para posterior aislamiento de hepatocitos

Los animales se preparan y se cubren de forma estéril después de estar estables con anestesia general. Se accede a la cavidad abdominal a través de una incisión en la línea media. Inicialmente se diseca el hilio hepático y se aísla el segmento lateral izquierdo (SLI). La vena porta (VP) izquierda y la arteria hepática (AH) izquierda se aíslan y se rodean con una cinta vascular. El SLI se extirpa mediante una sección parenquimatosa controlada junto con el uso de grapas endovasculares articuladas. La segmentectomía lateral izquierda da como resultado la eliminación de aproximadamente un 20 % del volumen total del hígado. Una vez que se retira el segmento lateral izquierdo hepático del campo operatorio, la muestra se procesa en un procedimiento de cirugía de banco (CB) en condiciones estériles. La CB implica lavar la VP izquierda y la AH izquierda con solución de Ringer lactato (RL) fría para eliminar toda la sangre (etapa de lavado), seguido de la infusión de solución Belzer para su posterior conservación hepática. El segmento hepático se empaqueta en una doble bolsa de plástico y se coloca en una hielera para su posterior transporte al laboratorio donde se realiza el posterior aislamiento celular (para obtener hepatocitos).

##### 55 (III) Derivación portocava

La disección quirúrgica extendida del hilio hepático se realiza después de completar la segmentectomía lateral izquierda. La derivación portocava completa se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

##### 60 (IV) Aislamiento de hepatocitos para trasplante

Las células hepáticas se aíslan de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La suspensión de células hepáticas resultante se filtra y se lava. La prueba de exclusión con azul tripán se utiliza para determinar la viabilidad de los hepatocitos aislados. En el grupo de autotrasplante, donde los animales recibieron sus propios hepatocitos, los animales permanecen bajo anestesia general durante 5 horas adicionales mientras las células se aíslan y se preparan

para la posterior infusión.

(V) Trasplante de hepatocitos mediante infusión quirúrgica directa

- 5 Los cirujanos realizan el trasplante de hepatocitos después de obtener muestras para el control de calidad (viabilidad celular, recuento celular, cultivo y sensibilidad). Los ganglios linfáticos mesentéricos y peridiudenciales reciben infusiones directas de células intraparenquimatosas (rendimiento celular de  $25 \times 10^6$  a  $50 \times 10^6$  células viables/ml dentro de un pequeño volumen (1 a 3 ml) en medio de infusión) mediante un abordaje quirúrgico directo o mediante inyección endoscópica (descrita a continuación), según lo determinado por el grupo experimental asignado. La hemostasia adecuada se logra por completo después de la infusión de hepatocitos heterotópicos en los ganglios linfáticos. La cavidad abdominal se irriga profusamente con soluciones de antibióticos y antifúngicas (Neomicina 500 mg/l, polimixina 15.000 unidades/kg/l, bacitracina 1000 unidades/kg/l y anfotericina B 4 mg/kg/l) después de lograr una hemostasia meticulosa. La pared abdominal se cierra en tres capas y no se utilizan drenajes. Se coloca un apósito quirúrgico sellador sobre el cierre cutáneo. Los animales se recuperan adecuadamente del procedimiento de anestesia general y después se extuban en el quirófano. Posteriormente, los animales se trasladan a un animalario debidamente equipado para recibir sus cuidados postoperatorios.

(VI) Trasplante de hepatocitos mediante abordaje endoscópico intraluminal

- 20 La inyección endoscópica se realiza en el animal bajo anestesia general una vez finalizada la DPC. Un endoscopista biliar-pancreático certificado con amplia experiencia en EE realiza estos procedimientos. Para estos experimentos se utiliza un ecoendoscopio lineal (Olympus GF-UCT 180). El endoscopio se introduce por la boca del animal y se hace avanzar hasta el estómago y el duodeno. La sonda de ecoendoscopia (EE) ayuda y guía la localización de los ganglios linfáticos (GL) peridiudenciales. Se llega directamente al GL mediante un abordaje transgástrico y/o transduodenal.
- 25 Una vez que se ha penetrado correctamente al GL con agujas de aspiración con aguja fina (AAF) (Boston Scientific, que van de 19 a 25 G), el cirujano operativo ayuda al endoscopista a realizar los trasplantes de hepatocitos después de la inserción exitosa de la aguja en el GL a través de este procedimiento guiado por EE. Los hepatocitos previamente aislados se mantienen en una solución que contiene  $25 \times 10^6$  células/ml o  $50 \times 10^6$  células/ml. Los hepatocitos en solución se trasplantan directamente al GL peridiudenal, utilizando una aguja de aspiración con aguja fina (AAG) (Boston Scientific, con agujas de 19 a 25 G). Una vez que se completa el procedimiento quirúrgico, los animales se recuperan adecuadamente del procedimiento de anestesia general y se extuban en el quirófano. Posteriormente, los animales son trasladados a un animalario debidamente equipado para recibir sus cuidados postoperatorios.

(VII) Recuperación y cuidados postoperatorios

- 35 Se permite que los animales se recuperen de la anestesia con un control adecuado mientras se reanuda la ventilación espontánea. Los animales se controlan las 24 horas del día durante los primeros 2 a 3 días después de la cirugía (más tiempo si está indicado) por personal capacitado del centro preclínico, después, al menos diariamente durante la duración del estudio. El cuidado postoperatorio de los animales está bajo la dirección del director del estudio en consulta con los veterinarios.

- 40 Los animales se controlan de cerca y con frecuencia. Cada animal se evalúa según los siguientes criterios específicos de cada especie para la evaluación y el alivio del dolor: vocalizaciones, depresión, respiración >50 % de aumento (basado en 20/min, la frecuencia respiratoria promedio en perros). Además, se controla la frecuencia cardíaca.
- 45 También se controla la temperatura.

*Manejo y seguimiento del dolor*

- 50 Inicialmente, los animales se controlan cada hora para detectar los siguientes indicadores de dolor y angustia posquirúrgicos, utilizando un sistema de puntuación del dolor que incluye, pero sin limitación: nivel general de actividad, herida quirúrgica, apetito y actitud hacia su dieta.

- 55 El dolor postoperatorio se trata con las administraciones de analgésicos descritas en función de los siguientes indicadores: aumento de la frecuencia cardíaca de ~10-15 %; y aumentos de la frecuencia respiratoria de ~40 %. El dolor se maneja con la administración programada de: buprenorfina o butorfanol y ketoprofeno, u otra analgesia coadyuvante determinada en consulta con los veterinarios.

- 60 Todos los animales reciben analgesia postoperatoria con buprenorfina (0,01 mg/kg i.v. cada 6-8 h). Este se complementa con ketoprofeno (1 a 2 mg/kg i.v.) y butorfanol (0,1 mg/kg i.v. cada 6 h) si se necesita analgesia adicional o alternativa.

*Medidas adicionales de apoyo y prevención*

- 65 Los animales reciben antibióticos por vía i.v. diarios durante la primera semana y medicación adicional durante el período postoperatorio. Los animales posoperatorios reciben líquidos por vía i.v. de mantenimiento que se ajustan de acuerdo con los parámetros clínicos y de laboratorio.

Además, durante todo el postoperatorio, se controla la motilidad gástrica (íleo, etc.).

5 Se coloca una vía central al final del procedimiento quirúrgico. Este acceso i.v. se limpia y se mantiene durante la duración del estudio, a menos que haya signos de infección, angustia del animal o traumatismo infligido por el perro.

*Terapia inmunodepresora (ID):*

10 Los animales reciben solumedrol (1 g i.v.) en el quirófano antes del trasplante de hepatocitos. El régimen ID postoperatorio es el siguiente:

Prograf (aproximadamente 0,3 mg/kg) v.o. cada 12 horas durante la duración de este estudio, controlado y ajustado en consecuencia para prevenir la toxicidad.

Prednisona 20 mg v.o. una vez al día  $\times$  1 semana

15 Prednisona 10 mg v.o. una vez al día  $\times$  1 semana

Prednisona 5 mg v.o. una vez al día durante la duración de este estudio.

**Ejemplo 4. Estudio preclínico de la administración de hepatocitos guiada por EE para la organogénesis en ganglios linfáticos**

20 Este ejemplo ilustra el tratamiento de la insuficiencia hepática en un modelo animal grande (perro) mediante la administración de hepatocitos guiada por EE en el ganglio linfático (GL) peridiudodenal.

25 Los experimentos preclínicos en un modelo animal grande (perro) descritos en el presente documento se aprobaron por un protocolo IACUC según las pautas del USDA y se llevaron a cabo en un laboratorio de pago por servicios prestados en Allegheny Health Network, Highmark, Pittsburgh, PA. En estos experimentos, los trasplantes de hepatocitos se realizaron en un modelo canino en el que se ha inducido insuficiencia hepática después de que se haya desarrollado quirúrgicamente una derivación portocava (DPC) completa.

30 En síntesis, se probaron grupos de animales para confirmar que el trasplante de hepatocitos en los ganglios linfáticos peridiudenciales (GLPD) puede inducir la generación de nuevos brotes hepáticos ectópicos (organogénesis) con citoarquitectura hepática normal y funcionalidad completa. Los grupos de estudio se sometieron a un procedimiento quirúrgico completo de DPC antes del trasplante de hepatocitos autólogo o alogénico en el GLPD mediante un abordaje de EE o mediante inyección directa. Todos los grupos recibieron terapia inmunodepresora inespecífica compuesta de tacrolimus y prednisona. Se siguió a los grupos durante 150 días después de los procedimientos iniciales.

35 Los animales recibieron TH mediante inyección directa en GL (como se muestra en la **figura 2**) o mediante un método de ecoendoscopia (EE) mínimamente invasivo (como se muestra en las **figuras 1A y 1B**). Los animales recibieron 75 millones de HT (25 M de hepatocitos/ml, con 1 ml de solución inyectada en cada uno de los 3 GL), o 150 millones de HT (50 M de hepatocitos/ml, con 1 ml de solución inyectada en cada uno de los 3 GL).

40 Los animales se sacrificaron el día 6, 60, 90 o 150.

45 En la **figura 6A** se muestra tinción positiva de CK-18, un marcador de hepatocitos, en el tejido hepático normal, mientras que las **figuras 6B y 6C** muestran la presencia de hepatocitos inmunotetñidos con CK-18 en los ganglios linfáticos 6 días después del trasplante mediante EE e inyección directa, respectivamente. Estos primeros resultados demuestran la presencia de hepatocitos en los ganglios linfáticos tanto en el grupo de inyección directa como en el de inyección por EE. Los hepatocitos primarios administrados a los ganglios linfáticos mediante EE formaron con éxito tejido hepático.

50 En las **figuras 7A a 7D** se muestra la formación de tejido hepático después del trasplante de hepatocitos mediante EE. Se recogieron ganglios linfáticos de animales sacrificados en cada momento, fijados en paraformaldehído e incluyen en parafina. Se prepararon secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o hematoxilina con inmunotinción anti-fumarilacetato-hidrolasa (FAH). La FAH se expresa altamente en los hepatocitos y, por lo tanto, se puede utilizar para identificar hepatocitos. Se tomaron imágenes de las secciones y se evaluaron histológicamente para detectar la presencia de hepatocitos injertados y la formación de tejido hepático ectópico.

55 En la **figura 7A** se muestran imágenes histológicas de un ganglio linfático después del trasplante de hepatocitos autólogos mediante EE. Se trasplantaron aproximadamente  $25 \times 10^6$  hepatocitos autólogos por ganglio linfático mediante EE y el ganglio linfático se recogió aproximadamente 90 días después del trasplante. Se tiñeron secciones del ganglio linfático con hematoxilina y eosina (H&E). Una mayor ampliación de la tinción H&E (derecha) muestra que se formó tejido hepático (flechas) a partir de los hepatocitos injertados.

60 En la **figura 7B** se muestran imágenes histológicas de un ganglio linfático después del trasplante de hepatocitos alogénicos mediante EE. Se trasplantaron aproximadamente  $50 \times 10^6$  hepatocitos alogénicos por ganglio linfático

mediante EE y el ganglio linfático se recogió aproximadamente 90 días después del trasplante. Se tiñeron secciones del ganglio linfático con H&E. Se formó tejido hepático (flechas) a partir de los hepatocitos injertados en varias partes del ganglio linfático.

- 5 En la **figura 7C** se muestran imágenes histológicas de un ganglio linfático después del trasplante de hepatocitos autólogos mediante EE. Se trasplantaron aproximadamente  $50 \times 10^6$  hepatocitos autólogos por ganglio linfático mediante EE y el ganglio linfático se recogió aproximadamente 60 días después del trasplante. Las secciones del ganglio linfático se tiñeron con H&E (cuadros de la derecha) o hematoxilina con inmunotinción antifumarilacetatohidrolasa (FAH) (cuadros de la izquierda). Se formó tejido hepático (flechas) en varias partes del ganglio linfático e incluía hepatocitos positivos para FAH.

- 10 En la **figura 7D** se muestran imágenes histológicas de un ganglio linfático después del trasplante de hepatocitos alogénicos mediante EE. Se trasplantaron aproximadamente  $25 \times 10^6$  hepatocitos alogénicos por ganglio linfático mediante EE y el ganglio linfático se recogió aproximadamente 150 días después del trasplante. Las secciones del ganglio linfático se tiñeron con H&E (cuadros de la derecha) o hematoxilina con inmunotinción antifumarilacetatohidrolasa (FAH) (cuadros de la izquierda). Se formó tejido hepático (flechas) en varias partes del ganglio linfático e incluía hepatocitos positivos para FAH.

- 15 Los animales del grupo de estudio no mostraron signos prolongados de insuficiencia hepática o mortalidad. Estos animales mostraron signos de agrandamiento de los sitios de GLPD donde inicialmente se trasplantaron los hepatocitos. Durante la necropsia de fin de estudio, estos animales mostraron el desarrollo de tejido hepático ectópico en el GLPD con características anatómicas e histológicas normales. Los hígados ectópicos en el GLPD mostraron evidencia de tejido hepático sostenible durante la duración del estudio.

20 25 *Métodos quirúrgicos y experimentales*

(I) Colocación de líneas y apoyo animal

- 30 Se canuló la vena yugular derecha con un catéter de PE y se iniciaron líquidos de soporte intravenosos con NaCl al 0,9 %. Se administró y mantuvo un agente paralizante mediante una bomba de jeringa o una terapia en bolo durante todo el procedimiento. Se canuló una arteria periférica con un catéter de PE. Además, se colocó un acceso venoso central de doble luz y larga duración (vena cava superior) a través de una cervicotomía derecha y un acceso directo a la vena yugular derecha externa. El acceso a la vía central permanente se insertó y exteriorizó en la región cervical posterior después de completar el procedimiento abdominal. El registro electrocardiográfico se controló a través de electrodos colocados en la superficie corporal del animal. La temperatura rectal se controló continuamente. El soporte animal se realizó de acuerdo con el SOP ANI-017, *Directrices para realizar cirugías de supervivencia en especies reguladas por el USDA* y ANI-032 *Regulación Térmica del Paciente Anestesiado*.

35 40 (II) Segmentectomía del lóbulo hepático izquierdo para posterior aislamiento de hepatocitos

- 45 Los animales se prepararon y se cubrieron de forma estéril después de estar estables con anestesia general. Se accedió a la cavidad abdominal a través de una incisión en la línea media. Inicialmente se disecó el hilio hepático y se aisló el segmento lateral izquierdo (SLI). La vena porta (VP) izquierda y la arteria hepática (AH) izquierda se aislaron y rodearon con una cinta vascular. El SLI se extirpó mediante una sección parenquimatosa controlada junto con el uso de grapas endovasculares articuladas. La segmentectomía lateral izquierda dio como resultado la eliminación de aproximadamente un 20 % del volumen total del hígado. Una vez que se retiró el segmento lateral izquierdo hepático del campo operatorio, la muestra se procesó en un procedimiento de cirugía de banco (CB) en condiciones estériles. El CB implicó el lavado de la VP izquierda y de la AH izquierda con solución Ringer lactato (RL) fría para eliminar toda la sangre (etapa de lavado) seguido de la infusión de solución Belzer para la posterior conservación hepática. El segmento hepático se empaquetó en una doble bolsa de plástico y se colocó en una hielera para su posterior transporte al laboratorio donde se realiza el posterior aislamiento celular (para obtener hepatocitos).

50 (III) Derivación portocava

- 55 55 La disección quirúrgica extendida del hilio hepático se realizó después de completar la segmentectomía lateral izquierda. La derivación portocava completa se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

(IV) Aislamiento de hepatocitos para trasplante

- 60 60 Las células hepáticas se aislaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La suspensión de células hepáticas resultante se filtró y se lavó. La prueba de exclusión con azul tripán se utilizó para determinar la viabilidad de los hepatocitos aislados. En el grupo de autotrasplante, donde los animales recibieron sus propios hepatocitos, los animales permanecieron bajo anestesia general durante 5 horas adicionales mientras se aislaban y preparaban las células para la infusión posterior.

65 (V) Trasplante de hepatocitos mediante infusión quirúrgica directa

Los cirujanos realizaron el trasplante de hepatocitos después de obtener muestras para el control de calidad (viabilidad celular, recuento celular, cultivo y sensibilidad). Los ganglios linfáticos mesentéricos y peridiuodenales recibieron infusiones directas de células intraparenquimatosas (rendimiento celular de  $25 \times 10^6$  a  $50 \times 10^6$  células viables/ml dentro de un pequeño volumen (1 a 3 ml) en medio de infusión) mediante un abordaje quirúrgico directo o mediante inyección endoscópica (descrita a continuación), según lo determinado por el grupo experimental asignado. La hemostasia adecuada se logró por completo después de la infusión de hepatocitos heterotópicos en los ganglios linfáticos. La cavidad abdominal se irrigó profusamente con soluciones de antibióticos y antifúngicas (Neomicina 500 mg/l, polimixina 15.000 unidades/kg/l, bacitracina 1000 unidades/kg/l y anfotericina B 4 mg/kg/l) después de lograr una hemostasia meticulosa. La pared abdominal se cerró en tres capas y no se utilizaron drenajes. Se colocó un apósito quirúrgico sellador sobre el cierre cutáneo. Los animales se recuperaron adecuadamente del procedimiento de anestesia general y después se extubaron en el quirófano. Posteriormente, los animales se trasladaron a un animalario debidamente equipado para recibir sus cuidados postoperatorios.

15 (VI) Trasplante de hepatocitos mediante abordaje endoscópico intraluminal (EE)

La inyección endoscópica se realizó en el animal bajo anestesia general una vez finalizada la DPC. Estos procedimientos los llevó a cabo un endoscopista biliar-pancreático certificado con amplia experiencia en EE. Para estos experimentos se utilizó un ecoendoscopio lineal (Olympus GF-UCT 180). El endoscopio se introdujo por la boca del animal y se hizo avanzar hasta el estómago y el duodeno. La sonda de ecoendoscopia (EE) ayudó y guió la localización de los ganglios linfáticos (GL) peridiuodenales. Se llegó directamente al GL mediante un abordaje transgástrico y/o transduodenal. Una vez que se penetró correctamente al GL con agujas de aspiración con aguja fina (AAF) (Boston Scientific, que van de 19 a 25 G), el cirujano operativo ayudó al endoscopista a realizar los trasplantes de hepatocitos después de la inserción exitosa de la aguja en el GL a través de este procedimiento guiado por EE. Los hepatocitos previamente aislados se mantuvieron en una solución que contenía  $25 \times 10^6$  o  $50 \times 10^6$  células/ml. Los hepatocitos en solución se trasplantaron directamente al GL peridiuodenal, utilizando una aguja de aspiración con aguja fina (AAG) (Boston Scientific, con agujas de 19 a 25 G). Una vez finalizado el procedimiento quirúrgico, los animales se recuperaron adecuadamente del procedimiento de anestesia general y después se extubaron en el quirófano. Posteriormente, los animales se trasladaron a un animalario debidamente equipado para recibir sus cuidados postoperatorios.

(VII) Recuperación y cuidados postoperatorios

35 Se permitió que los animales se recuperasen de la anestesia con un control adecuado mientras se reanudaba la ventilación espontánea. Los animales se controlaron las 24 horas del día durante los primeros 2 a 3 días después de la cirugía (más tiempo si está indicado) por personal capacitado del centro preclínico, después, al menos diariamente durante la duración del estudio. El cuidado postoperatorio de los animales estuvo bajo la dirección del director del estudio en consulta con los veterinarios.

40 Los animales se controlaron de cerca y con frecuencia. Cada animal se evaluó según los siguientes criterios específicos de cada especie para la evaluación y el alivio del dolor: vocalizaciones, depresión, respiración >50 % de aumento (basado en 20/min, la frecuencia respiratoria promedio en perros). Además, se controló la frecuencia cardíaca. También se controló la temperatura.

45 *Manejo y seguimiento del dolor*

50 Inicialmente, los animales se controlaron cada hora para detectar los siguientes indicadores de dolor y angustia posquirúrgicos, utilizando un sistema de puntuación del dolor que incluye, pero sin limitación: nivel general de actividad, herida quirúrgica, apetito y actitud hacia su dieta.

55 El dolor postoperatorio se trató con las administraciones de analgésicos descritas en función de los siguientes indicadores: aumento de la frecuencia cardíaca de ~10-15 %, y aumentos de la frecuencia respiratoria de ~40 %. El dolor se manejó con la administración programada de: buprenorfina o butorfanol y ketoprofeno, u otra analgesia coadyuvante determinada en consulta con los veterinarios.

60 Todos los animales recibieron analgesia postoperatoria con buprenorfina (0,01 mg/kg i.v. cada 6-8 h). Este se complementó con ketoprofeno (1 a 2 mg/kg i.v.) y butorfanol (0,1 mg/kg i.v. cada 6 h) si se necesitó analgesia adicional o alternativa.

65 *Medidas adicionales de apoyo y prevención*

Los animales recibieron antibióticos por vía i.v. diarios durante la primera semana y medicación adicional durante el período postoperatorio. Los animales postoperatorios recibieron líquidos por vía i.v. de mantenimiento, que se ajustaron según parámetros clínicos y de laboratorio.

Además, durante todo el postoperatorio, se controló la motilidad gástrica (íleo, etc.).

Se colocó una vía central al final del procedimiento quirúrgico. Este acceso i.v. se limpió y se mantuvo durante la duración del estudio, a menos que hubiera signos de infección, angustia del animal o traumatismo infligido por el perro.

5 *Terapia inmunodepresora (ID):*

Los animales recibieron solumedrol (1 g i.v.) en el quirófano antes del trasplante de hepatocitos. El régimen ID postoperatorio es el siguiente:

- 10 Prograf (aproximadamente 0,3 mg/kg) v.o. cada 12 horas durante la duración de este estudio, controlado y ajustado en consecuencia para prevenir la toxicidad.  
Prednisona 20 mg v.o. una vez al día × 1 semana  
Prednisona 10 mg v.o. una vez al día × 1 semana  
Prednisona 5 mg v.o. una vez al día durante la duración de este estudio.

- 15 Si bien se han mostrado y descrito aspectos preferidos de la presente divulgación en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que dichos aspectos se proporcionan solamente a modo de ejemplo. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la presente divulgación y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones estén cubiertos de ese modo.

## REIVINDICACIONES

1. Una o más células para su uso en un método de tratamiento, en donde el método es para trasplantar la una o más células y hacer crecer un tejido ectópico en un sujeto, comprendiendo el método:
  - 5 (a) hacer avanzar un endoscopio a través de un abordaje endoluminal en el tubo gastrointestinal, las vías respiratorias o las vías urinarias del sujeto,
  - (b) utilizar un abordaje transluminal para insertar una aguja unida al endoscopio a través de una pared visceral en un ganglio linfático del sujeto y
  - 10 (c) administrar la una o más células al ganglio linfático a través de la aguja, permitiendo así que la una o más células se injerten y produzcan el tejido ectópico en el ganglio linfático.
2. La una o más células para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el avance del endoscopio, la utilización de un abordaje transluminal para insertar la aguja, o ambas, se realizan con la ayuda ecografías.
  - 15 (a) hacer avanzar un endoscopio a través de un abordaje endoluminal en el tubo gastrointestinal, las vías respiratorias o las vías urinarias del sujeto,
  - (b) utilizar un abordaje transluminal para insertar una aguja unida al endoscopio a través de una pared visceral en un ganglio linfático del sujeto y
  - 20 (c) administrar la una o más células al ganglio linfático a través de la aguja, permitiendo así que la una o más células se injerten y produzcan el tejido ectópico en el ganglio linfático.
3. La una o más células para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el ganglio linfático está en la cavidad abdominal del sujeto, la cavidad torácica del sujeto, una región mediastínica del sujeto o una región retroperitoneal del sujeto.
4. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el endoscopio comprende una sonda de ultrasonido configurada para detectar el ganglio linfático.
5. La una o más células para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el ganglio linfático es al menos 2 ganglios linfáticos en la cavidad abdominal o la cavidad torácica del sujeto.
6. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la una o más células comprenden una o más células de un diámetro promedio de 20 µm o de más de 20 µm.
7. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la una o más células comprenden una población de células, en donde la administración conduce a una reducción de menos del 20 % en la viabilidad celular en la población de células cuando la una o más células pasan a través de la aguja.
8. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la aguja tiene un calibre de 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27.
- 35 9. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde:
  - (i) un diámetro interior de la aguja no es superior a 700 µm;
  - (ii) un diámetro exterior de la aguja no es superior a 1 mm;
  - (iii) el tamaño de la aguja no supera el calibre 19; y/o
  - 40 (iv) la aguja es parte de un inyector que comprende una solución en suspensión, en donde la solución en suspensión comprende la una o más células, y en donde la solución en suspensión comprende al menos 10 millones de células por ml.
- 45 10. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la una o más células comprenden hepatocitos y el tejido ectópico es tejido hepático ectópico, opcionalmente en donde el método trata una enfermedad o afección hepática en el sujeto, opcionalmente en donde además:
  - 50 (i) la enfermedad o afección hepática es fibrosis hepática relacionada con el consumo de alcohol, infección por hepatitis A, B, C o D, esteatosis hepática no alcohólica, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, atresia biliar, fibrosis quística, síndrome de Alagille, sífilis, brucelosis, infecciones parasitarias, exposición química, enfermedades biliares crónicas, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad de Osler o insuficiencia cardíaca derecha;
  - (ii) la enfermedad o afección hepática está asociada con un trastorno metabólico que comprende tirosinemia, enfermedad de la orina con olor a sirope de arce, fenilcetonuria, síndrome de Crigler-Najjar, oxalosis, hiperoxaluria, hemocromatosis, deficiencia de antitripsina α-1, enfermedad de Wilson, síndromes de colestasis intrahepática familiar, galactosemia, enfermedad por almacenamiento de glucógeno o polineuropatía amiloide familiar;
  - 55 (iii) el sujeto ha recibido un procedimiento quirúrgico de derivación portocava o derivación portosistémica intrahepática transyugular (DPIT) que reduce el suministro de sangre al hígado del sujeto e induce disfunción hepatocelular en el sujeto, además opcionalmente en donde el procedimiento quirúrgico de derivación portocava comprende una derivación portocava de extremo a lado, derivación portocava de lado a lado, derivación mesocava con interposición de injertos H o C, o derivación esplenorenal central o distal; o
  - (iv) la enfermedad o afección hepática es una hepatopatía terminal.
- 65 11. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la una o más células comprenden:

- (i) células renales o fragmentos de tejido renal y el tejido ectópico es tejido renal ectópico, opcionalmente en donde la una o más células son para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección renal en el sujeto, además opcionalmente en donde la enfermedad o afección renal es una enfermedad renal en etapa terminal;
- 5 (ii) células pancreáticos o islotes de Langerhans y el tejido ectópico es tejido pancreático ectópico, opcionalmente en donde la una o más células son para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección pancreática endocrina que conduce a la reducción o ausencia de secreción de insulina en el sujeto, además opcionalmente en donde la enfermedad o afección pancreática es diabetes de tipo I, diabetes de tipo II o pancreatitis crónica que conduce a una reducción de la secreción de insulina en el sujeto;
- 10 (iii) células pulmonares o fragmentos de tejido pulmonar y el tejido ectópico es tejido pulmonar ectópico, opcionalmente en donde la una o más células son para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección pulmonar en el sujeto; además opcionalmente en donde la enfermedad o afección pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), opcionalmente en donde la EPOC está provocada por el humo del cigarrillo, contaminación y humos, antitripsina  $\alpha$ -1, fibrosis quística, asma crónica, enfisema, bronquitis crónica o fibrosis pulmonar idiopática;
- 15 (iv) células tímicas o fragmentos de tejido de timo, y el tejido ectópico es tejido de timo ectópico; opcionalmente en donde (a) las células tímicas o fragmentos de tejido de timo se obtienen de un sujeto donante y el tejido de timo ectópico induce tolerancia específica del donante en el sujeto al trasplante de células del sujeto donante, o (b) la una o más células son para su uso en el tratamiento del mal funcionamiento del sistema inmunitario relacionado con la edad, y el tejido del timo ectópico modula la función inmunitaria del sujeto.
- 20
12. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el ganglio linfático está próximo al tubo gastrointestinal y el endoscopio avanza a lo largo del tubo gastrointestinal, opcionalmente en donde el ganglio linfático comprende uno o más de un ganglio linfático peridiudodenal, un ganglio linfático perigástrico, un ganglio linfático peripancreático, un ganglio linfático mesentérico, un ganglio linfático ileocólico, un ganglio linfático mesocólico, un ganglio linfático gástrico, un ganglio linfático hepático-esplénico, un ganglio linfático hiliar esplénico, un ganglio linfático paraesofágico, un ganglio linfático paracardial, un ganglio linfático paraaórtico, un ganglio linfático retroaórtico, un ganglio linfático aórtico lateral, un ganglio linfático preaórtico, un ganglio linfático de menor curvatura, un ganglio linfático hepático común, un ganglio linfático de la arteria esplénica, un ganglio linfático del tronco celiaco, un ganglio linfático ilíaco o un ganglio linfático retroperitoneal.
- 25
13. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde:
- 30
- (i) el ganglio linfático está cerca de las vías respiratorias, y el endoscopio avanza a lo largo de las vías respiratorias; opcionalmente en donde
- 35
- (a) el ganglio linfático comprende uno o más ganglios linfáticos en la región mediastínica, y/o
- 40
- (b) el ganglio linfático se selecciona de un ganglio linfático paraesternal, un ganglio linfático intercostal, un ganglio linfático diafragmático superior, un ganglio linfático traqueobronquial superior, un ganglio linfático traqueobronquial inferior, un ganglio linfático broncopulmonar, un ganglio linfático paratraqueal, un ganglio linfático intrapulmonar y combinaciones de los mismos; o
- 45
- (ii) el ganglio linfático está cerca de las vías urinarias del sujeto y el endoscopio avanza a lo largo de las vías urinarias; opcionalmente en donde
- 50
- (a) el ganglio linfático comprende uno o más ganglios linfáticos en una región retroperitoneal del sujeto, y/o
- (b) el ganglio linfático se selecciona de un ganglio linfático ilíaco externo, un ganglio linfático ilíaco interno, un ganglio linfático lumbar cava, un ganglio linfático lumbar aórtico, un ganglio linfático inguinal superficial, un ganglio linfático inguinal profundo, un ganglio linfático perivesical interaortocava, un ganglio linfático perivesical obturador, un ganglio linfático perivesical presacro y combinaciones de los mismos.
- 45
14. La una o más células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde:
- 55
- (i) el sujeto es un ser humano;
- (ii) la una o más células son autólogas del sujeto;
- (iii) la una o más células son alogénicas para el sujeto;
- (iv) la una o más células son xenogénicas para el sujeto;
- (v) la una o más células son singénicas para el sujeto; o
- 60
- (vi) el método comprende además administrar un inmunodepresor al sujeto para reducir el rechazo inmunitario de la una o más células.
- 65
15. Un sistema para trasplantar hepatocitos y hacer crecer un hígado ectópico en un ganglio linfático de un sujeto, que comprende un endoscopio y un inyector, en donde el endoscopio comprende una sonda de ultrasonido configurada para detectar el ganglio linfático del sujeto, en donde el inyector comprende una aguja y una población de células en una solución en suspensión contenida en el mismo, en donde la solución en suspensión comprende de 25 millones a 100 millones de hepatocitos viables por ml, en donde el endoscopio y la aguja están configurados para avanzar juntos

a lo largo del tubo gastrointestinal, las vías respiratorias o las vías urinarias del sujeto, opcionalmente en donde la aguja es de calibre 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 o 27, o la aguja tiene un diámetro interior de como máximo 700  $\mu\text{m}$ .

5 16. El sistema de la reivindicación 15, en donde:

- (i) el inyector está configurado para administrar la una o más células a través de la aguja;
- (ii) la sonda de ultrasonido está configurada para detectar un ganglio linfático en la cavidad abdominal del sujeto;
- (iii) la solución en suspensión tiene al menos 30 millones de células por ml;
- (iv) la población de células en el inyector tiene al menos un 50 % de células viables;
- (v) la población de células en el inyector comprende al menos 10 millones de células; y/o
- (vi) el tamaño de la aguja y la concentración celular de la solución en suspensión se configuran de modo que haya menos de un 20 % de reducción en el porcentaje de viabilidad celular en la población de células cuando las células pasan a través de la aguja.

10

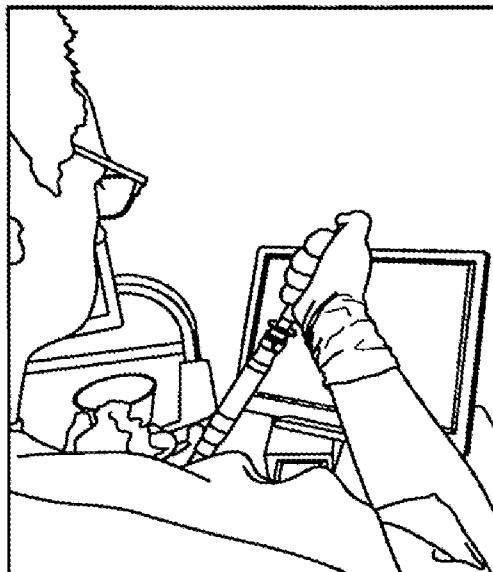


FIGURA 1A

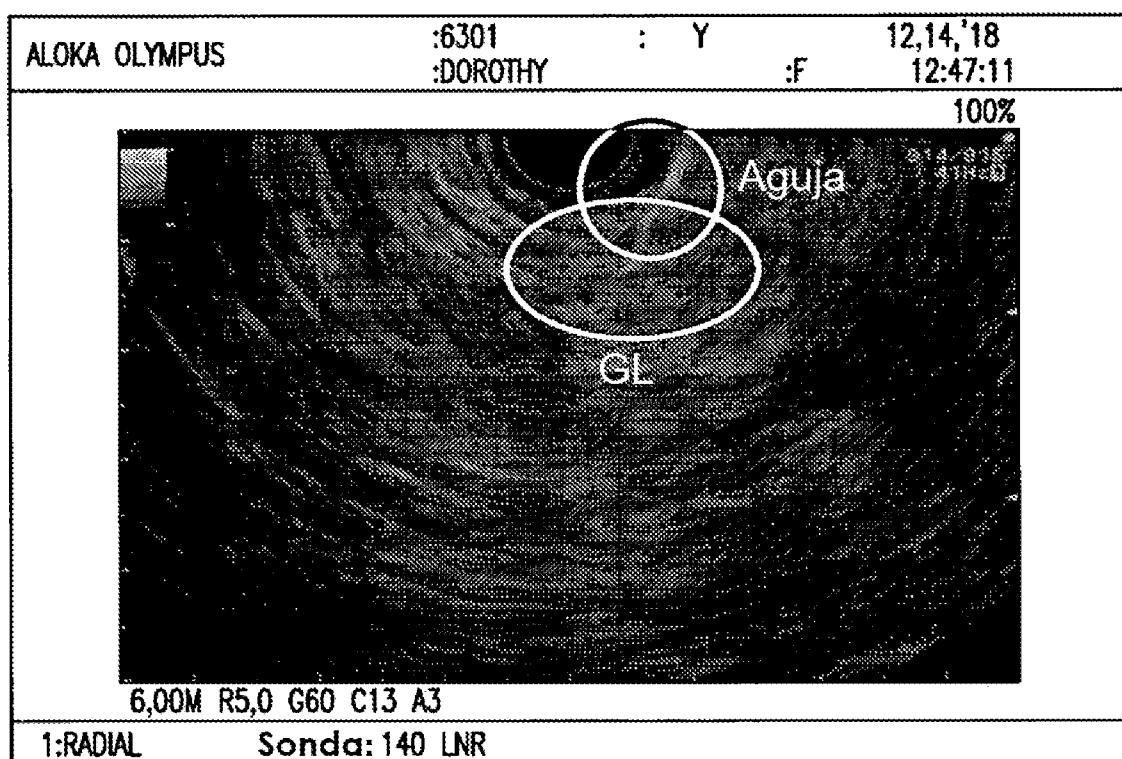


FIGURA 1B

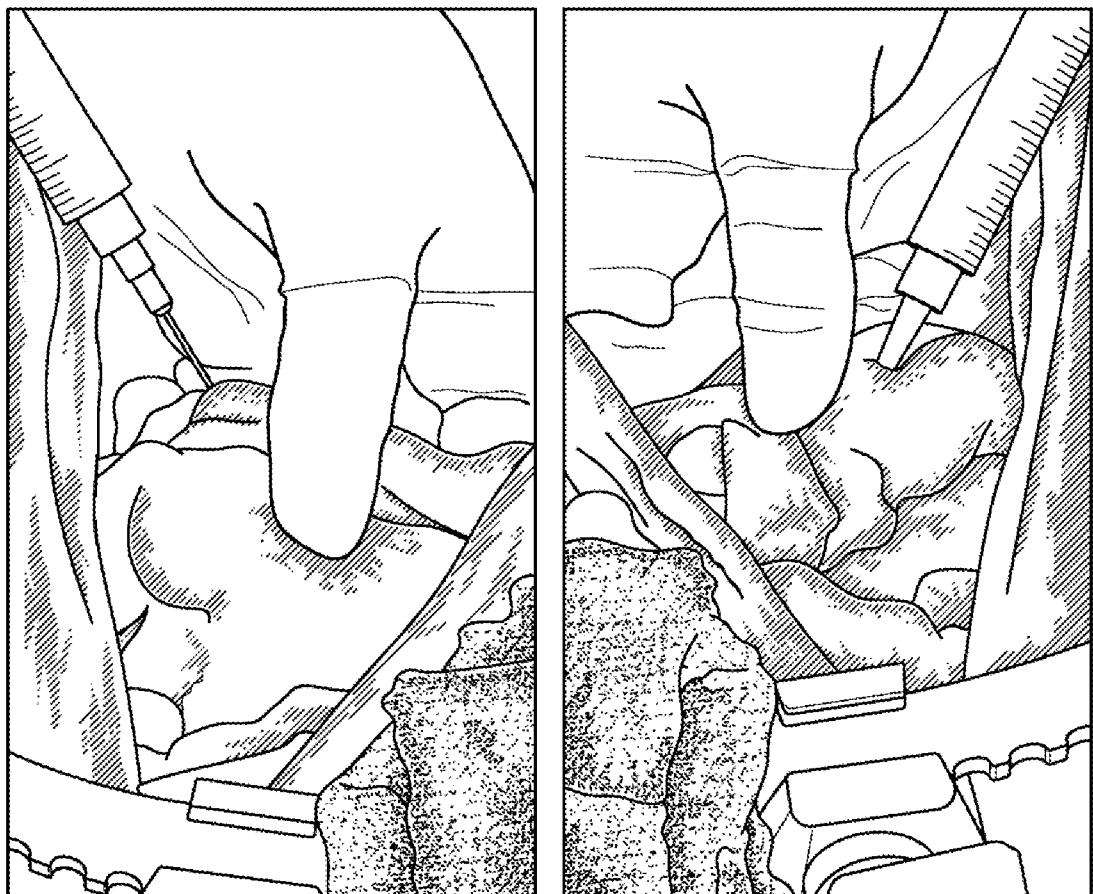


FIGURA 2

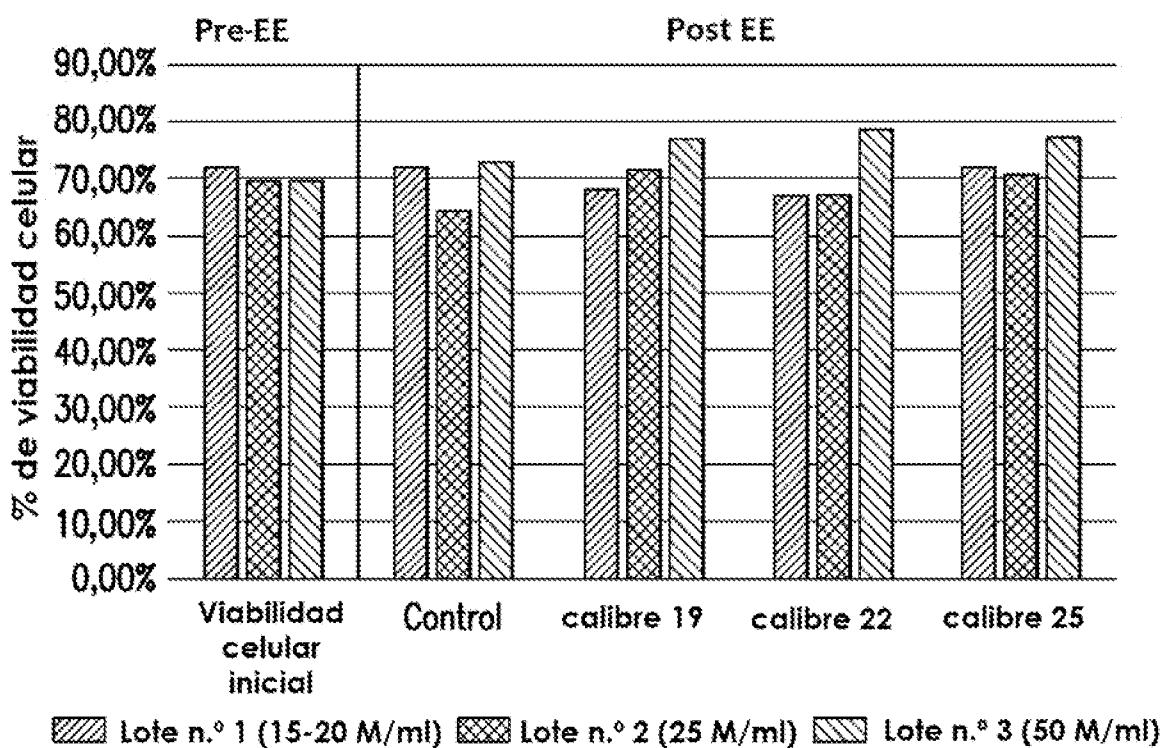
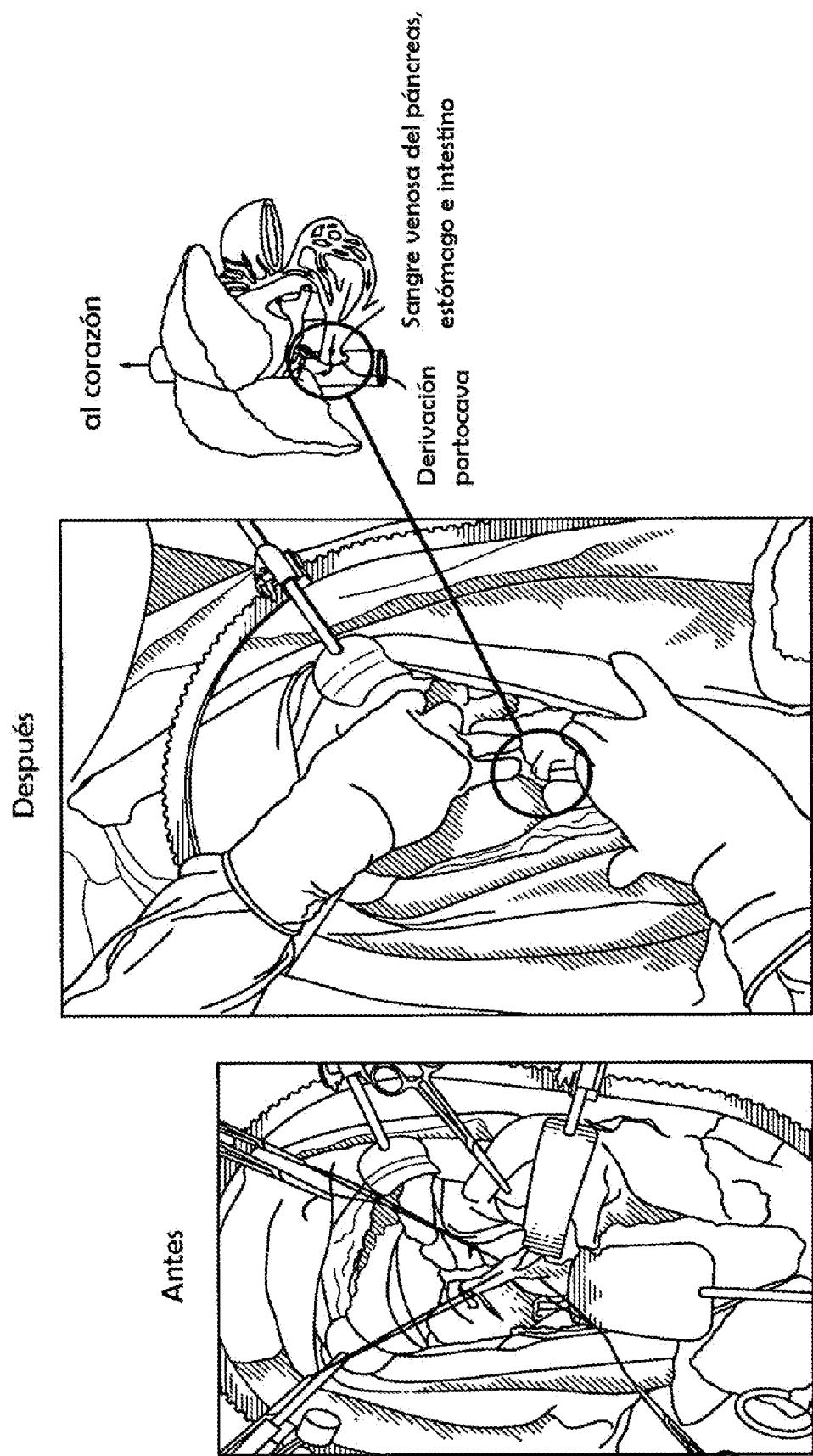


FIGURA 3



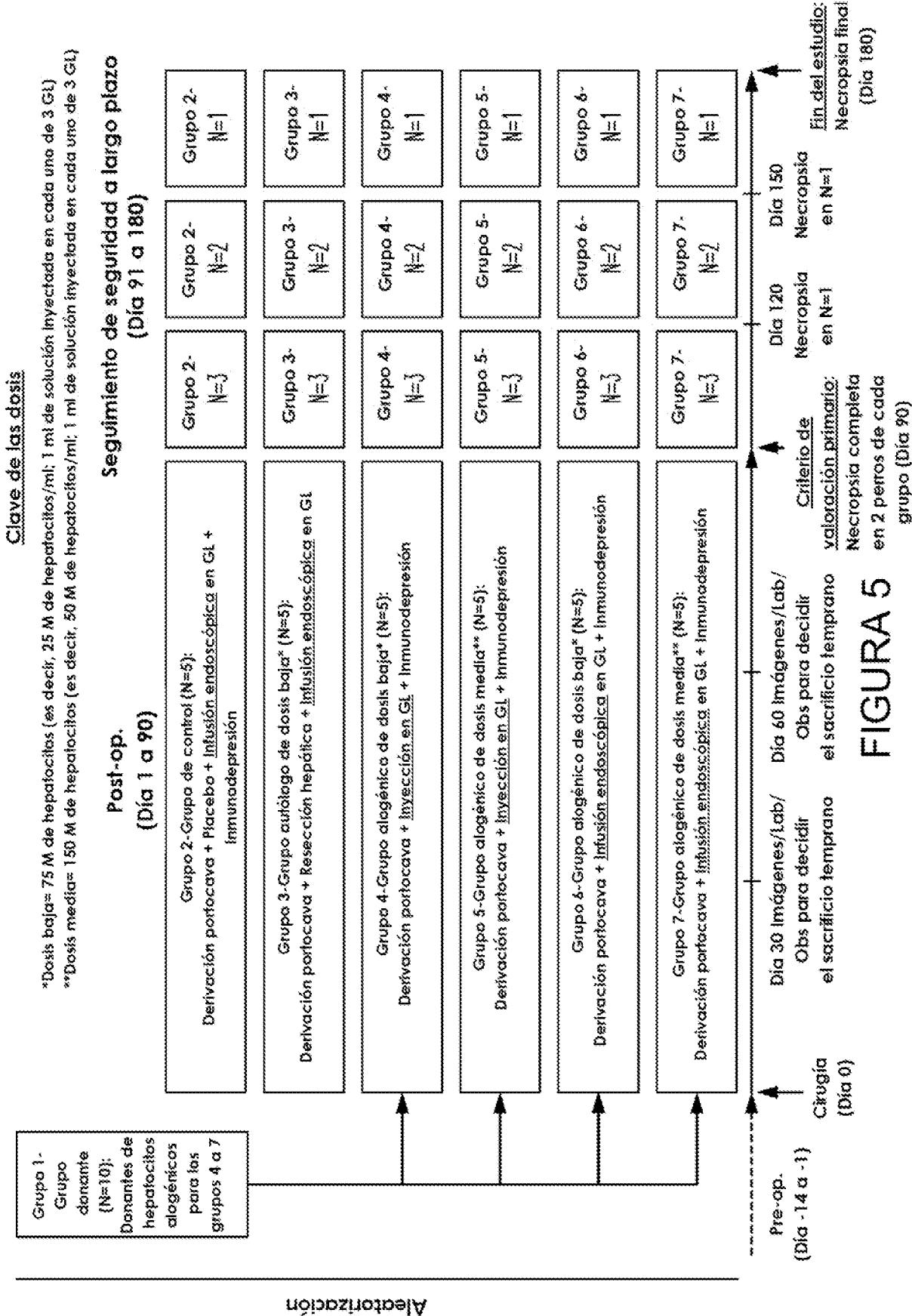
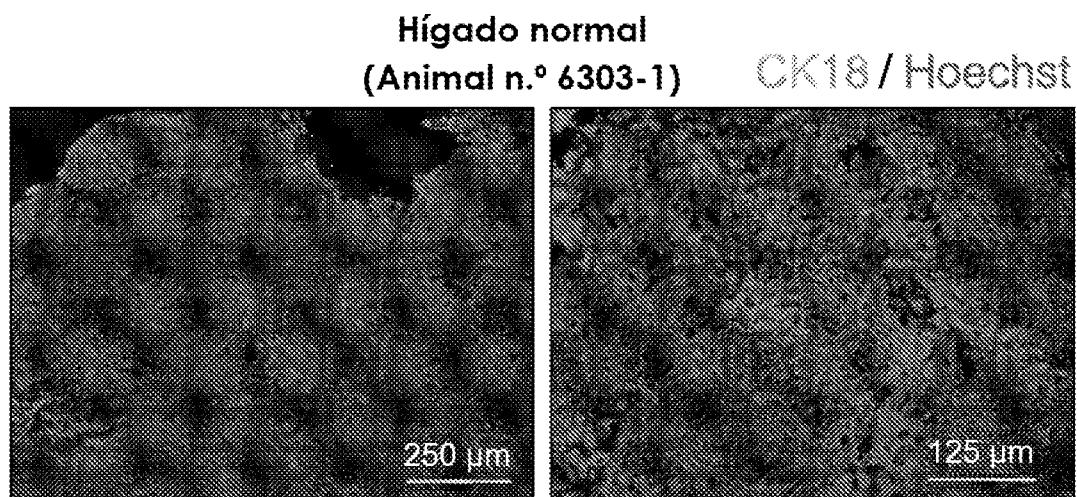
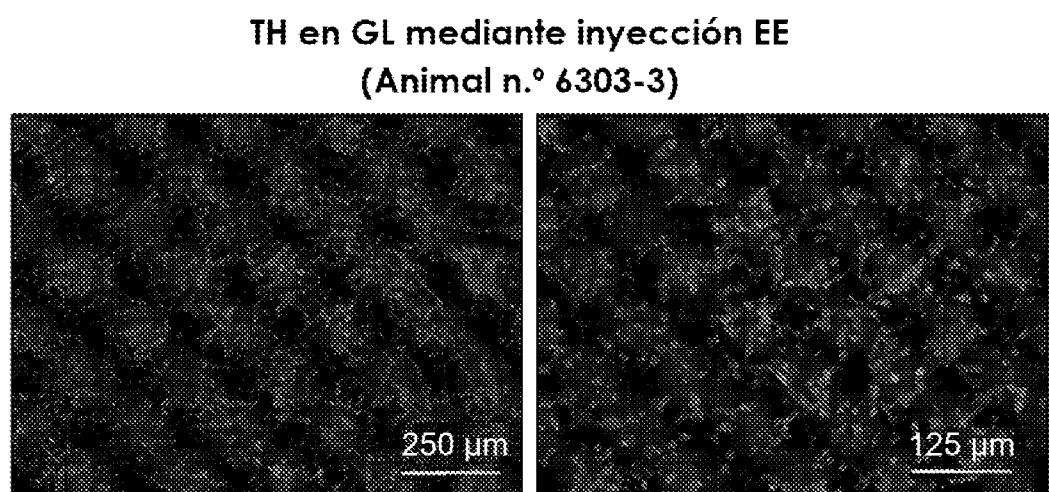


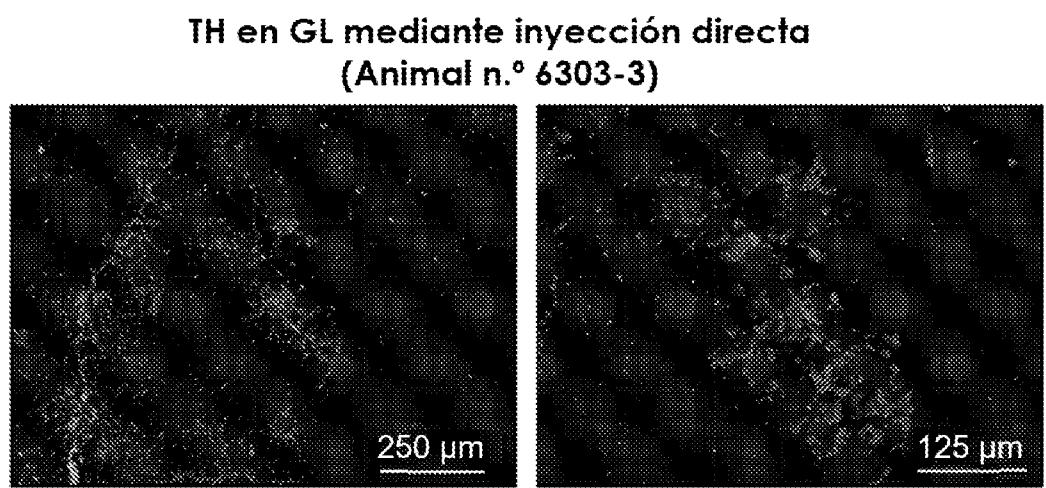
FIGURA 5



**FIGURA 6A**



**FIGURA 6B**



**FIGURA 6C**

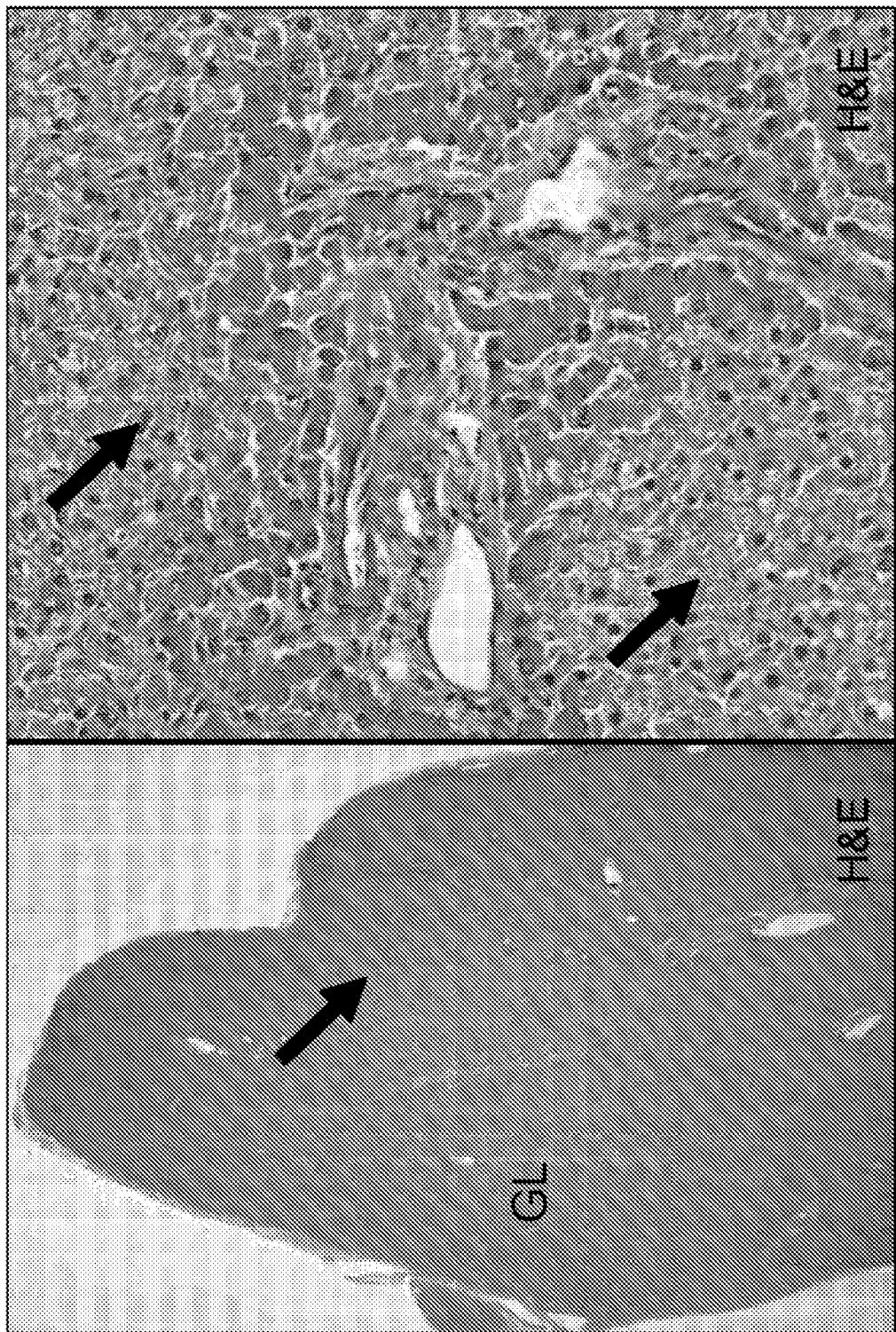


FIGURA 7A

N.º 6321

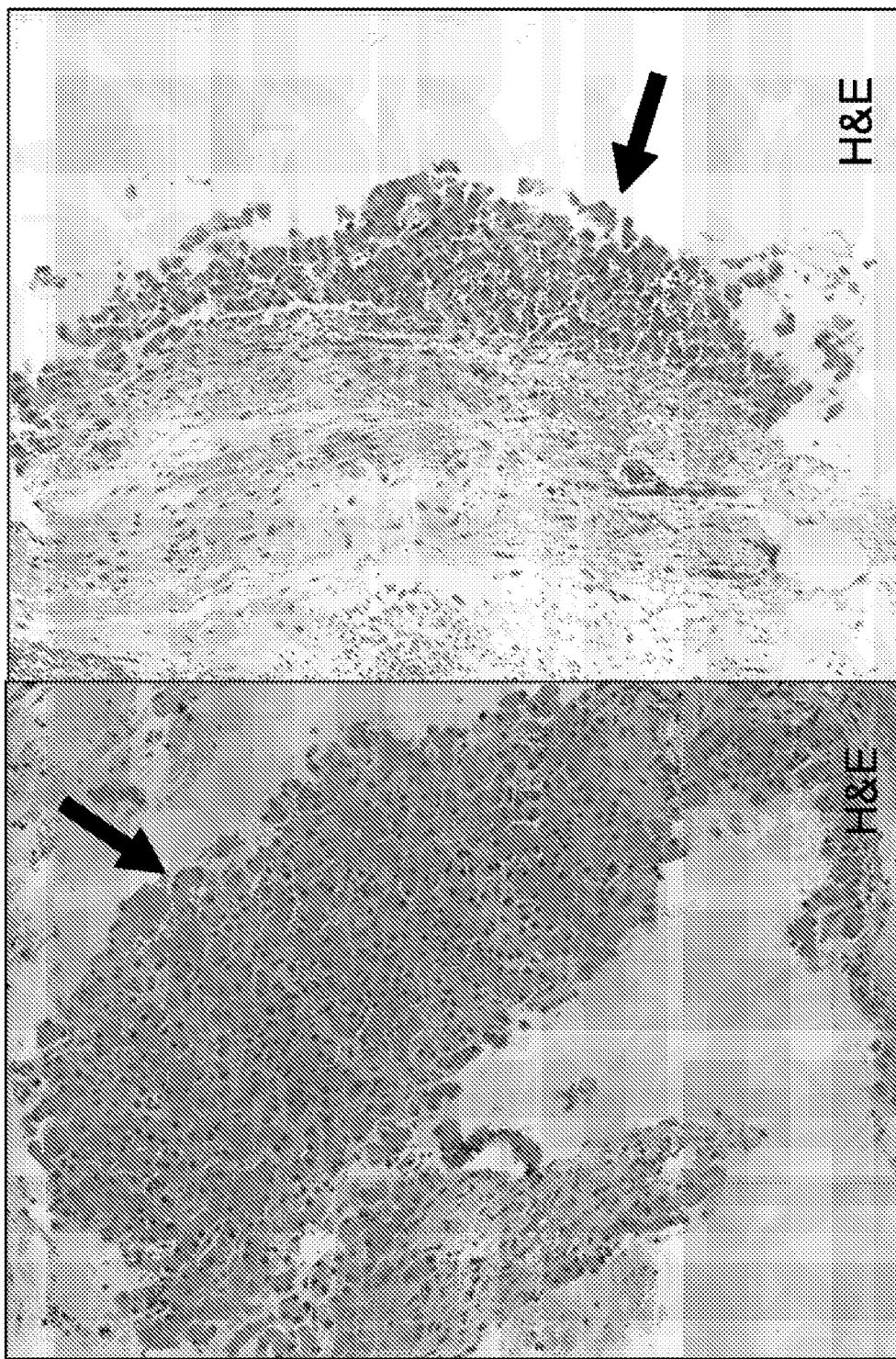


FIGURA 7B

N.º 6354

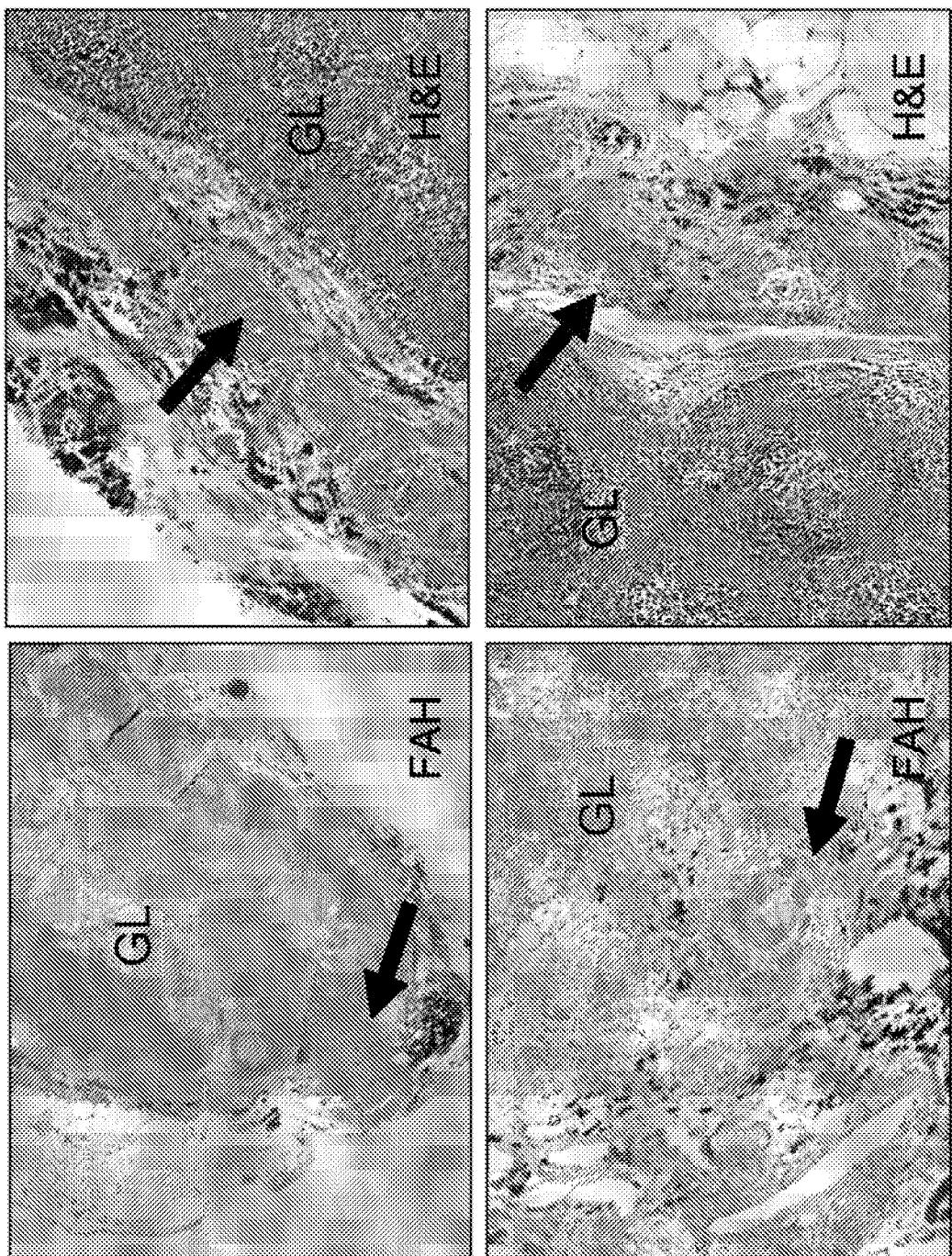


FIGURA 7C

N.º 6360

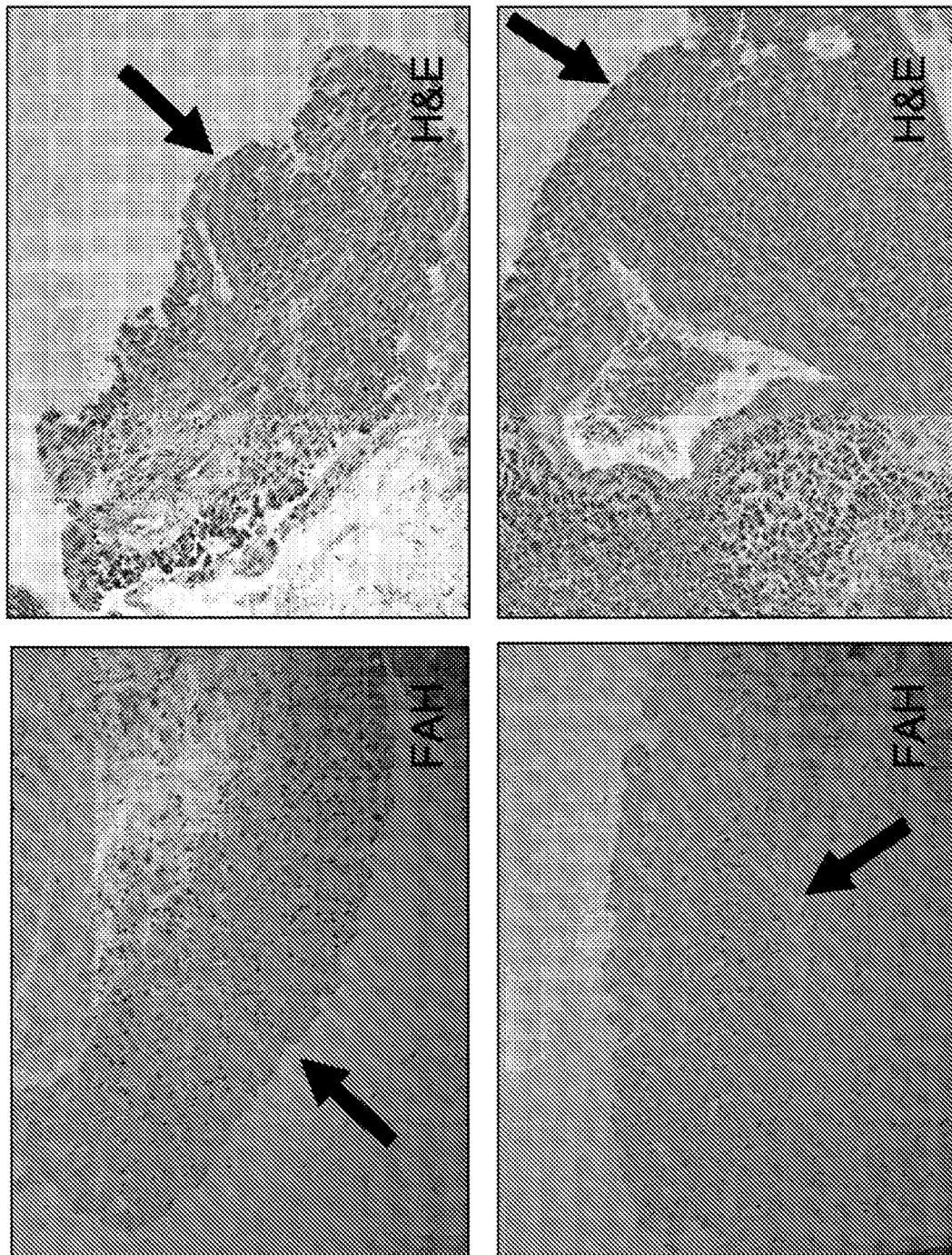


FIGURA 7D

N.º 6347