



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 544**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07703330 .6**

96 Fecha de presentación : **07.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1981966**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **Utilización de hepatocitos humanos y procedimiento *in vitro* para determinar la función hepática y la regeneración del hígado.**

30 Prioridad: **07.02.2006 DE 10 2006 005 526**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73 Titular/es: **Martin Sauer**
Augustenstrasse 71
18055 Rostock, DE
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
Angewandten Forschung e.V.

72 Inventor/es: **Sauer, Martin**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

5 [0001] La presente invención se refiere a la utilización de hepatocitos humanos para la determinación in-vitro de la función hepática y para la regeneración del hígado en un probando, en particular en un paciente, así como a la utilización de estos hepatocitos humanos como parámetros de fosgeno. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento in-vitro para la determinación de la función hepática y la regeneración del hígado en un probando, en particular, en un paciente, utilizando hepatocitos humanos.

Estado de la técnica

10 [0002] Los formadores de enfermedades "Systemic Inflammatory Response Syndrom" (SIRS) con fallos de órganos múltiples, sepsis grave y choque séptico están con frecuencia en relación con el desarrollo de un daño reversible del hígado, con lo que se puede producir una limitación de las funciones hepáticas. Una administración regular de medicamentos, un alto consumo de alcohol o también infecciones pueden perjudicar igualmente en una medida considerable la función del hígado. Los formadores de enfermedades mencionados anteriormente pueden conducir en raros casos a un fallo irreversible del hígado.

15 [0003] Una función hepática limitada o bien perturbada puede tener como consecuencia, por ejemplo, una perturbación de la función del cerebro, como la encefalopatía hepática. Ésta es provocada por la metabolización reducida de productos de proteólisis en el hígado. Una función renal limitada se manifiesta de forma sintomática, por ejemplo, a través de una reducida capacidad de rendimiento, fatiga, somnolencia y en raras ocasiones también una sensación de presión en la región epigástrica.

20 [0004] En el choque séptico, aproximadamente el 22 % de todos los pacientes desarrollan, por último, un fallo hepático (1). Como fallo hepático o insuficiente hepática se designa la extinción de la función hepática hasta el coma hepático. El fallo hepático se caracteriza por la aparición de ictericia (Ikterus), encefalopatía hepática, síndrome hepato-renal, trastornos de la coagulación de la sangre, hipalbuminosis con ascitis, trombocitopenia o trastornos endocrinos.

25 [0005] Harbrecht y colaboradores pudieron verificar en un estudio que un fallo del hígado, que se desarrolla en el transcurso de una estancia en un hospital, prolonga el tiempo de residencia en el hospital y eleva en una medida considerable la mortalidad (2). Los motivos de ellos no están todavía aclarados en detalle. Los modelos de enfermedad conocidos hasta ahora parten de un daño del hígado, que procede de una limitación de la perfusión del esplácnico, de una disfunción del endotelio y de un daño directo a través de toxinas bacterianas u otras, como por ejemplo toxinas endógenas (3-6).

30 [0006] Por último, hay que indicar que en el caso de fallo agudo del hígado, que no se produce en el marco de SIRS o sepsis, se pueden constatar marcadores de inflamación humores y celulares intensificados (7).

35 [0007] La sepsis los SIRS con fallo de órganos múltiples y los fallos hepáticos están en todo el mundo en la punta de las causas de muerte. En los USA enferman cada año aproximadamente 500.000 pacientes de sepsis con una mortalidad media del 21 % (8). En Alemania, mueren cada año 70.000 pacientes de esta enfermedad y sus complicaciones. Aproximadamente 20.000 pacientes al año mueren en Alemania de una enfermedad hepática. Cuando se produce un fallo hepático fulminante, solamente queda en último término un trasplante de hígado.

[0008] En general, se puede constatar que la determinación o bien el diagnóstico de una función hepática limitada o bien perturbada en un probando en el instante más temprano posible tiene la máxima importancia, puesto que de esta manera se puede tratar precozmente de manera correspondiente un fallo agudo de hígado o se puede prevenir precozmente.

40 [0009] Una función hepática limitada o bien trastornada se puede diagnosticar actualmente a través de la medición de diferentes valores sanguíneos específicos y no específicos del hígado. Así, por ejemplo, a través de la medición de las enzimas del hígado glutamato-piruvato-transaminasas (GPT), glutamato-oxalacetato-transaminasas (GOT) y gamma-glutamato-transferasas gamma-GT) se puede determinar un daño hepático. Un trastorno de la función excretora y de la función de desinfección del hígado tiene como consecuencia, por ejemplo, altos valores de bilirrubina, gamma-GT, amoníaco y fosfatasa alcalina (AP). En el caso de una capacidad limitada de síntesis del hígado se puede reducir también el contenido de proteínas en el plasma, como por ejemplo la albúmina y muchos factores de la coagulación.

[0010] Los procedimientos diagnósticos utilizados actualmente tienen, sin embargo, el inconveniente de que muchos de los valores sanguíneos mencionados solamente en el caso de fallo progresivo del hígado están claramente en la zona patológica y, por lo tanto, son inadecuados para la detección precoz de un fallo del hígado.

50 [0011] Para la determinación de la función hepática se utiliza, además, procedimientos que calculan, por ejemplo, la perfusión del esplácnico. Esto se realiza, por ejemplo, con el sistema LIMON (PULSION Medical Systems AG, Alemania).

55 [0012] El sistema LIMON para la determinación de la perfusión del esplácnico y de la función hepática se encuentra actualmente en prueba clínica (3-4). Pero en este procedimiento, por razones técnicas, especialmente en pacientes con sepsis altas, es muy difícil realizar una medición correcta con este sistema.

[0013] En resumen, se puede decir, que los procedimientos habituales empleados actualmente solamente proporcionan manifestaciones relativamente inespecíficas con respecto a la función hepática en un paciente.

[0014] Se conocen a partir de la patente US 5.290.684 A hepatocitos humanos de una línea de células HepG2/C3A, que solamente se pueden utilizar aquí terapéuticamente. Éstos se pueden adquirir en el comercio.

5 Representación de la invención

[0015] El cometido de la invención es, por lo tanto, preparar un nuevo ensayo de citotoxicidad sobre la base de hepatocitos humanos, que detecta el daño directo del hígado y su regeneración en un probando.

10 [0016] De acuerdo con la invención, para la solución de este cometido se prepara un procedimiento in-vitro nuevo utilizando hepatocitos humanos y una utilización nueva de hepatocitos humanos, respectivamente, de manera que se puede determinar la función hepática de un probando, en particular en un paciente, tiene está enfermo de Systemic Inflammatory Response Syndrom" (SIRS), sepsis, fallo del hígado o fallo de órganos múltiples en el plano celular.

15 [0017] Hasta ahora no se conocen ensayos comparativos en el plano celular para la determinación de la función hepática en probandos, en particular en un paciente con función hepática limitada o bien trastornada, como se prepara con el procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención. En particular, no se conoce un ensayo de citotoxicidad sobre la base de hepatocitos humanos, que detecte el daño directo del hígado en un paciente con los formadores de enfermedad SIRS con fallo de múltiples órganos, sepsis grave, choque séptico y fallo del hígado en el plano celular.

20 [0018] El procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención o bien la utilización de acuerdo con la invención de hepatocitos humanos para la determinación in-vitro de la función hepática en el plano celular tiene la ventaja de que se pueden encontrar manifestaciones sobre la función hepática de un probando, en particular de un paciente, de maneras esencialmente más exacta y más precoz en comparación con los procedimientos disponibles actualmente.

[0019] Hay que indicar que el concepto "probando" comprende a continuación tanto un "probando sano" como también un "probando enfermo" en el sentido de un paciente.

25 [0020] El procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención o bien la utilización de acuerdo con la invención de hepatocitos humanos para la determinación in-vitro de la función hepática se base en el principio de que cualquier sustancia, en función de su concentración y combinación con otras sustancias, puede tener influencias tóxicas sobre células humanas. Con el procedimiento o bien con la utilización de acuerdo con la invención se prepara de esta manera un ensayo de citotoxicidad, en el que se detecta la citotoxicidad endógena y exógena (provocada, por ejemplo, por medicamentos).

30 [0021] De acuerdo con la invención, para la determinación de la función hepática de un probando se incuban hepatocitos humanos con plasma de probandos. Como parámetro para la función hepática de un probando se puede considerar el daño celular de los hepatocitos humanos después de la incubación con el plasma de probandos. En particular, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probando, se pueden derivar la función hepática y la regeneración del hígado de un probando por medio de la medición de determinados parámetros, como por ejemplo vitalidad, funcionalidad y grado de activación de los hepatocitos humanos.

35 [0022] El procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención para la determinación de la función hepática se realiza sobre la base de hepatocitos humanos, que son seleccionados a partir de las líneas de células hepáticas humanas C3A, HLE, HepG2, HuH7, Hep3B, PLC/PRF/5. Las líneas de células correspondientes fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC) y, por lo tanto, cumplen normas de calidad de validez general. El ensayo de citotoxicidad contiene dos partes de un kit de ensayo: la primera parte comprende microplacas ocupadas con hepatocitos humanos (placas de 24 pocillos). La segunda parte comprende soluciones preparadas para usar de reactivos necesarios para el ensayo.

45 [0023] Para la determinación de la función hepática e incuban los hepatocitos humanos con plasma de probandos. El plasma de probandos se obtiene prácticamente como sobrante libre de células después de la centrifugación de sangre anticoagulada. La coagulación de la muestra de sangre se inhibe a través de la adición de anticoagulantes, como por ejemplo heparina o bien heparinoides o sustancias, que ligan iones de calcio, como citrato, EDTA, fluoruros u oxalato. La coagulación del plasma y la concentración y composición de anticoagulantes necesarias para ello están normalizadas en una Norma internacional y, por lo tanto, debería ser conocido por el técnico.

50 [0024] El procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención o bien la utilización de acuerdo con la invención de hepatocitos humanos para la determinación in-vitro de la función hepática se basa en el principio de que debido a una función hepática limitada o bien perturbada se acumulan determinadas sustancias y metabolitos del metabolismo, como toxinas endógenas y exógenas, en el plasma de un probando. Estas sustancias pueden tener finalmente una influencia tóxica sobre los hepatocitos humanos. A través de la determinación de determinados parámetros de la vitalidad, de la función y de la activación después de la incubación de los hepatocitos humanos con el plasma del probando es posible derivar de esta manera la función hepática de un probando.

[0025] De esta manera, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probandos se puede derivar la función hepática del probando por medio de la medición de la actividad de Cytochrom P450 Isoenzym 1A2 (CYP 1A2) de los hepatocitos humanos.

5 **[0026]** La Superfamilia Cytochrom P450 está constituida por hemoproteínas microsomales, que tienen una importancia central para el metabolismo oxidativo, peroxidativo y reductor de una serie de sustancias endógenas y exógenas.

[0027] Otra división de los citocromos se realiza en familias de enzimas, que muestran una coincidencia de la secuencia de proteínas de al menos el 40 %, y en subfamilias, cuya coincidencia es superior al 55 %.

10 **[0028]** Cyrochrom P450 (CYP 1A2) en el hombre se ha podido constar hasta ahora exclusivamente en el hígado y representa allí aproximadamente el 15 % de todo el contenido de citocromo. Su expresión depende de diversos factores, entre otros del sexo, raza, polimorfismos genéticos y de la exposición frente a inductores, de manera existe una diferencia grande entre los individuos.

[0029] La función de CYP 1A2 se encuentra principalmente en el metabolismo de sustancias extrañas (tóxicos del medio ambiente y tóxicos de la alimentación, medicamentos).

15 **[0030]** La actividad del citocromo P450 1A2, una enzima implicada en la biotransformación de diferentes medicamentos, es, en efecto, reducida en células HepG2/C3A, pero se puede incrementar a través de inducción con metilclorantreno por encima de 40 veces el valor inicial (12).

[0031] En otra forma de realización, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probandos, se puede derivar la función hepática del probando por medio de medición de la actividad de los hepatocitos humanos para sintetizar microalbúmina y otras proteínas.

20 **[0032]** Las albúminas son proteínas globulares bien solubles en agua. Están constituidas por aproximadamente 580 aminoácidos y tienen un peso molecular medio de 66.000 Dalton. Las albúminas forman aproximadamente el 60 % de la albúmina total en el plasma sanguíneo y sirven sobre todo para la regulación de la presión oncótica intravascular y como proteínas de transporte para sustancias insolubles en agua, como por ejemplo ácidos grasos, hormonas, elementos traza y también diversos medicamentos. Las sustancias con efecto tóxico pueden reducir la capacidad de transporte de las albúminas a través de la ligazón en éstas.

25 **[0033]** Además, las albúminas representan reservas de aminoácidos para el cuerpo y contribuyen a la capacidad tampón de la sangre.

30 **[0034]** La síntesis de la albúmina tiene lugar exclusivamente en el hígado y representa aproximadamente el 10 % de toda la capacidad de síntesis de proteínas en el hígado. Por este motivo, la síntesis de aminoácidos se considera como un parámetro importante para la función del hígado. Un adulto forma diariamente aproximadamente de 120 a 200 mg de albúmina / kg de peso corporal.

35 **[0035]** En otra forma de realización, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probandos se puede derivar la función hepática del probando por medio de la medición de la liberación de lactato-dehidrogenasa a partir de los hepatocitos humanos. La lactato-dehidrogenasa (LDH) es una enzima celular, que tiene una gran importancia para el metabolismo intermedio de la célula, puesto que la enzima colabora en la glicólisis. Cataliza la reacción de piruvato en lactato, como coenzima sirve en este caso NADH.

[0036]

Ecuación de reacción:

LDH

40 Piruvato + NADH + H⁺ ←-----→ Lactato + NAD⁺

[0037] LDH es verificable en muchos tejidos diferentes, entre otros en el hígado, en la musculatura del corazón y en la musculatura del esqueleto, en los eritrocitos, en el tejido linfático y en el tejido hematopoyético así como en los riñones y en malignotas.

45 **[0038]** Existen cinco isoenzimas diferentes, que poseen una distribución orgánica diferente. El periodo de vida media del plasma de la lactato-dehidrogenasa está entre 10 y 120 horas. El valor normal para la actividad LDH en el suero sanguíneo está entre 120 a 240 U/l y resulta de la muda celular diaria.

[0039] Una elevación de esta actividad se encuentra en el caso de un daño de las células de procedencia, de manera que a través de trastornos de la permeabilidad de la membrana celular o lisis de las células se puede producir la salida de la enzima. Éste puede ser el caso también en caso de muda celular intensificada y en procesos regenerativos.

- [0040] En otra forma de realización, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probandos, se puede derivar la función hepática del probando por medio de la medición de la adherencia de los hepatocitos humanos vitales.
- 5 [0041] En otra forma de realización, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probandos, se puede derivar la función hepática del probando por medio de medición de la actividad esterasa de los hepatocitos humanos vitales.
- [0042] En otra forma de realización, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probandos, se puede derivar la función hepática del probando por medio de medición del número de los hepatocitos humanos muertos y del número de los hepatocitos humanos vivos.
- 10 [0043] En otra forma de realización, después de la incubación de los hepatocitos humanos con plasma de probandos, se puede derivar la función hepática del probando por medio de medición de la actividad de dehidrogenasas mitocondriales de los hepatocitos humanos vitales.
- 15 [0044] El procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención o bien la utilización de hepatocitos humanos son adecuados para la determinación de la función hepática en probandos, que están enfermos de "Systemic Inflammatory Response Syndrom" (SIRS), sepsis, choque séptico, fallo del hígado o fallo de múltiples órganos.
- [0045] Además, el procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención o bien la utilización de hepatocitos humanos son adecuados para la detección precoz de un fallo del hígado, para la verificación de terapias, del desarrollo del tratamiento y de la regeneración de la función hepática.
- 20 [0046] Además, el procedimiento in-vitro de acuerdo con la invención o bien la utilización de hepatocitos humanos son adecuados como parámetros de pronóstico, con los que es posible preparar ya precozmente a un probando para un trasplante de hígado, cuando tiene, por ejemplo, un pronóstico malo con respecto a su enfermedad hepática. En probandos a los que se ha transplántale el hígado, el procedimiento o bien la utilización de acuerdo con la invención contribuyen a encontrar manifestaciones más exactas sobre la capacidad funcional del transplantado una vez realizado el trasplante.
- 25 **Realización de la invención**
- [0047] A continuación se indican las formas de realización preferidas de la invención.
- [0048] Con preferencia, el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza para la determinación de la función hepática sobre la base de células HepG2/C3A.
- 30 [0049] En la línea de células HepG2/C3A (ATCC #CRL 10741) se trata de un subclón de la línea de células hepatoblastoma humana HepG2 muy extendida.
- 35 [0050] Las células HepG2/C3A están muy diferenciadas. Poseen muchas propiedades fenotípicas y genotípicas de las células hepáticas normales y no llevan secuencias virales. En la fase de crecimiento antes de la confluencia, las células HepG2/C3A se comportan de manera similar al tejido hepático regenerador. Tienen un tiempo de duplicación corto de tan sólo 24 horas y segregan una serie de proteínas fetales, entre ellas [alfa]-fetoproteína, aldolasa A y C y piruvatquinasa K.
- [0051] Tan pronto como las células alcanzan el estadio de la confluencia, se produce una fuerte inhibición del contacto. La frecuencia de las divisiones de las células se reduce drásticamente, de manera que el tiempo de duplicación se eleva por encima de 200 horas y se configura un equilibrio. Ahora predominan células HepG2/C3A, que representan un fenotipo adulto. Esto se muestra claramente también en la producción de proteínas: la formación de proteínas fetales se reduce, en su lugar se produce una síntesis multiplicada de albúmina, aldolasa B y piruvatquinasa L.
- 40 [0052] Además de la formación de diferentes proteínas de plasma, como por ejemplo albúmina, haptoglobina, ceruloplasmina, [alfa]2-macroglobulina, transferina, plasminógeno, fibrinógeno, las células HepG2/C3A están en condiciones también para la síntesis de urea a partir de lactato y cloruro de amonio.
- [0053] Además, las células HepG2/C3A se pueden cultivar en medio libre de glucosa. Esto muestra que dichas células poseen la capacidad de gluconeogénesis, que es una de las funciones metabólicas específicas de hígado más importantes.
- 45 [0054] La actividad de Cytochrom P450 1A2, una enzima implicada en la biotransformación de diferentes medicamentos, es, en efecto, reducida en células HepG2/C3A, pero se puede incrementar a través de inducción con metilcolantreno por encima de 40 veces la actividad de partida (12).
- 50 [0055] En una serie de ensayos sobre el mecanismo de la invasividad tumoral y la metástasis han sido investigadas diferentes líneas de células hepáticas humanas, entre otras las líneas de células C3A, HLE, HepG2, HuH7, Hep3B, PLC/PRP/5. Las líneas de células HepG2/C3A mostraron en este caso la invasividad mínima.

[0056] En virtud de la amplia diferenciación específica del hígado de la línea de células HepG2/C3A, las células ya han sido probadas como componente de un sistema de asistenta hepática artificial para la terapia del fallo hepático (10). Estas líneas de células hepáticas se pueden adquirir en el comercio.

[0057] Cultivo de las células HepG2/C3A:

- 5 [0058] Células HepG2/C3A fueron cultivadas en un termostato a 37°C y con 5 % de gasificación CO₂ en frascos de cultivo de tejido con 4 a 20 ml de solución nutritiva (medio). Ésta estaba constituida por Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies Ltd.) con 10 % de suero de ternera fetal (=FCS, PAA), 1 % de solución de glutamina (200 nM, Serva) y 1 5 de solución de antibióticos (penicilina G (10.000 IE/ml) / estreptomycin (10 mg/ml) – Jenapharm ratiopharm GmbH). Para la crioconservación se almacenaron células HepG2/C3A a -196°C en nitrógeno líquido en tubos, que contenían 1x10⁷ células en 2 ml de medio con 10 % DMSO (dimetilsulfóxido). Se formó un banco de células de trabajo. Para la revitalización se transfirieron las células al medio celular descrito anteriormente y después del recuento de las células con coloración de Trypanblau en la cámara de recuento Neubauer (ver más abajo) se sembraron en una concentración de 5 x 10⁵ células. El primer cambio de medio se realizó al cabo de 24 horas, a continuación tres veces por semana. El tiempo de revitalización fue 14 días. A continuación se investigaron las células cada 7 a 10 días y se sembraron de nuevo en una concentración de 5 x 10⁵ células / ml. En este caso no se excedió un número de división máximo (pasos) de 10.

[0059] Determinación de los parámetros

- [0060] 1. Determinación de la actividad de Cytochrom P450 Isoenzym 1A2 (ensayo de etoxiresorfina, determinación de la actividad de la Ethoxiresorussn-O-Deethylase, 11, 12).
- 20 [0061] La actividad de Cytochrom P450 Isoenzym 1A2 se puede determinar a través de O-deetilación de 7-etoxiresorufina en resorufina.
- [0062] A tal fin, se sembraron células HepG2/C3A en placas de cultivo de células de 24 pocillos en el transcurso de 3 días en una concentración de 250.000 células / pocillo y se mezclaron con 0,5 ml de medio. Durante este tiempo se realizó diariamente un cambio del medio. Para elevar la actividad de CYP 1A2 de las células, se indujo con 3-metil colantreno (Sigma) en una concentración de 5,36 g/l (20 µM). Desde el cuarto hasta el sexto día se incubaron las células con el plasma de probando (0,5 ml).
- 25 [0063] La medición de la actividad tuvo lugar el sexto día después de la siembra de las células. En primer lugar, se aspiró el medio de cultivo de células / plasma de probandos, luego las células recibieron 0,5 ml de medio con etoxiresorufina (8 µM) y Dicumarol (10 µM) y se incubaron en el transcurso de una hora a 37°C en el termostato. En este caso, una parte de la etoxiresorufina de las células HepG2/C3A se convirtió en resorufina. El Dicumarol tenía el cometido de impedir otro metabolismo de la resorufina.
- 30 [0064] A continuación, se extrajeron de cada pocillo 2 x 75 µl para determinaciones dobles y se transfirieron a una placa negra de 96 pocillos. A continuación se añadieron 15 µl de una solución de β-glucuronidasa (15 unidades de Fishman) y arilsulfatasa (120 unidades de Roy), para disociar complejos de resorufina eventualmente formados.
- 35 [0065] A continuación tubo lugar una nueva incubación en el transcurso de tres horas a 37°C y con agitación.
- [0066] Luego se pipetaron 200 µl de etanol (99,9 %) en cada pocillo. Después de 5 a 10 minutos se pudo medir el contenido de resorufina de las muestras en el lector de fluorescencia (Fluoroskan Ascent, Labsystems) durante una excitación de 530 nm y una emisión de 584 nm.
- 40 [0067] Para poder convertir las fluorescencias en cantidades de resorufina, se preparó en cada ensayo una curva estándar de resorufina (Blank – 10 pmol – 20 pmol – 30 pmol – 80 pmol). En cada ensayo se realizó un control de medio puro con y sin células y se cada muestra se realizó una determinación doble.

[0068] Protocolo para la optimización del tiempo de l ensayo de etoxiresorfina (estadio experimental):

- [0069] Desde los días 8 a 14 de la revitalización de las células se añadió al medio 3-metilcolantreno en una concentración de 2,68 g/l (10 µM). Adicionalmente se trabajó durante toda la fase de revitalización (14 días) con una concentración elevada de FCS del 15 %. A continuación, el tiempo de incubación de las células con 3-metilcolantreno en una concentración de 5,36 g/l (20 µM) fue un día. El tiempo de incubación con el plasma de probandos fue solamente todavía un día, de manera que al cabo de 48 horas desde el comienzo del ensayo se obtuvo el resultado.
- 45

[0070] 2. Capacidad de síntesis, por ejemplo microalbúmina y otras síntesis de proteínas de las células HepG2/C3A (13).

- 50 [0071] Las células HepG2/C3A fueron sembradas en placas de cultivo de células de 24 pocillos en una concentración de 250.000 células / pocillo y se mezclaron en el transcurso de 3 días con 0,5 ml de plasma de probandos + 0,25 ml de medio, a continuación se lavaron una vez con medio y a continuación se incubaron con medio fresco (1 ml) en el transcurso de 3 días. A continuación se determinó a partir de 0,2 ml de sobrante de cultivo celular la microalbúmina de

forma nefelométrica como determinación doble (+ control del medio). Cada uno de los ensayos con plasma de probandos se realizó igualmente como determinación doble.

[0072] Protocolos para la optimización del ensayo de síntesis de proteína (estadio experimental):

5 **[0073]** A través de la agitación continua de los frascos de cultivo celular por medio de un agitador disponible en la industria se optimizó el contacto de célula-medio y célula-plasma, respectivamente. De esta manera, los tiempos de incubación tanto con plasma de probandos como también con el medio se acortaron a un día, de manera que al cabo de 48 horas después del comienzo del ensayo se obtuvo un resultado.

10 **[0074]** A través de la adición de ornitina alfa-cetoglutarato (=OKG, 0,03 mM, 13a) al medio se incrementó la capacidad de síntesis de las células HepG2/C3A. De esta manera, se pudo acortar de la misma manera el tiempo del ensayo a 48 horas y, en segundo lugar, las células liberaron a través de la estimulación OKG cantidades medibles de fibrógeno y transferina (proteínas del plasma), que se midieron en 200 µl de sobranse de cultivo celular como determinación doble.

[0075] 3. Determinación de la liberación de lactato-dehidrogenasa (LDH) a partir de las células HepG2/C3A (ensayo de vitalidad, 14):

15 **[0076]** Las células HepG2/C3A fueron sembradas en placas de cultivo e células de 24 pocillos y se mezclaron en el transcurso de 3 días en una concentración de 250.000 células / pocillo con 0,5 ml de plasma de probandos + 0,25 ml de medio, a continuación se lavaron una vez con medio y luego se incubaron con medio fresco (1 ml) en el transcurso de 3 días. A continuación a partir de 0,2 ml de sobranse de cultivo de células se determinó la LDH como determinación doble. Cada ensayo con probandos se realizó igualmente como determinación doble. De la misma manera se realizó un control del medio.

20 **[0077]** La determinación de LDH se realizó de acuerdo con el método estándar optimizado de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC). En este caso, se utilizó piruvato como sustrato y se determinó fotométricamente la reducción de NADH.

[0078] Protocolos para la optimización del tiempo del ensayo de vitalidad de LDH (estadio experimental):

25 **[0079]** A través de la agitación continua de los frascos de cultivo celular por medio de un agitador disponible en la industria se optimizó el contacto de célula-medio y célula-plasma, respectivamente. De esta manera, los tiempos de incubación tanto con plasma de probandos como también con el medio se acortaron a un día, de manera que al cabo de 48 horas después del comienzo del ensayo se obtuvo un resultado.

[0080] Otros ensayos de vitalidad y de proliferación:

30 **[0081]** Las células HepG2/C3A fueron mezcladas en el transcurso de 3 días en placas de cultivo de células de 24 pocillos en una concentración de 250.000 células / pocillo con 0,5 ml de plasma de probandos + 0,25 ml de medio, a continuación se lavaron una vez con medio y a continuación se incubaron con medio fresco (1 ml) en el transcurso de 3 días. De la misma manera se realizó un control del medio. A continuación se realizaron los siguientes ensayos con las células:

[0082] 4. Ensayo de adherencia

35 **[0083]** En primer lugar, se registró de forma semicuantitativa la adherencia de las células HepG2/CA3 por medio de microscopio óptico. Puesto que en la línea de células HepG2/C3A se trata de una línea de células adherente, un alto porcentaje de células adherentes en el pocillo indica una buena vitalidad. La detección de la adherencia se realizó como determinación doble.

[0084] 5. Ensayo de vida / muerte

40 **[0085]** En el ensayo de vida / muerte (Molecular Probes, 15) se mezclaron las células con 2 colorantes (Calcein AM y Ethidium Homodimer).

45 **[0086]** CalceinAcetona-Metiléster (Calcein Green AM) puede penetrar en virtud de su permeabilidad de la membrana en la célula vital y se disocia intracelularmente a través de esterasas propias de las células (hidroxilación). La calceína resultante forma con iones de calcio quelatos, que no pueden abandonar la célula. Los quelatos de calceína emiten, con una longitud de onda de excitación de 485 nm, luz con una longitud de onda de 530 nm. Entonces se muestra una fluorescencia verde, que se puede captar y fotografiar con un microscopio de fluorescencia. En las células muertas, la actividad de esterasa se anula, de tal modo que de manera muy específica solamente células vitales muestran una fluorescencia verde.

50 **[0087]** En cambio, para las células muertas es adecuado el colorante que no pasa la membrana etidio bromuro homodímero. Este colorante no puede pasar las membranas celulares intactas, es decir, que no se puede difundir a través de las células vitales, de modo que este colorante no es absorbido por células vitales. En las células muertas, el colorante forma un complejo fluorescente que aparece rojizo con ácidos nucleicos (longitud de onda de excitación: 514 nm, longitud de onda emitida: 642 nm).

[0088] Al comienzo del ensayo se aspiró el medio con precaución. Luego se añadieron 0,5 ml de reactivo de vida / muerta (Calcein AM: 2 μ M, Ethidium Homodimer: 4 μ M). A continuación se realizó la incubación de las células en el termostato a 37°C en condiciones estándar en el transcurso de 30 minutos. A continuación se fotografiaron las células con luz monocromática y se evaluó el ensayo cuantitativamente. A tal fin, se realizaron en el lector de fluorescencia (Fluoroskan Ascent, Labsystems) tanto una medición verde como también una medición roja con las longitudes de onda mencionadas anteriormente. Siempre se realizaron determinaciones dobles y se formó un valor medio a partir de ellas.

[0089] 6. Ensayo XTT

[0090] En el ensayo XTT (Roche, 16-17) se midió la conversión de la sal de tetazolol y las modificación del color resultante de ella, que provoca una modificación del valor de extinción. En este caso, a través de las células metabólicamente activas, a partir de la sal de tetazolol amarilla XTT se obtuvo el Formazan de color naranja. A través de dehidrogenasas mitocondriales se realizó la conversión de la sal de tetazolol amarilla. La conversión de la sal de tetazolol es directamente proporcional al estado de actividad de las células.

[0091] Al comienzo del ensayo se aspiró el medio con precaución. Luego se añadieron 0,5 ml de medio fresco y 0,25 ml de reactivo XTT en una concentración de 1 mg/ml. A continuación se realizó la incubación de las células en el termostato a 37°C en condiciones estándar. Después de 2, 4 y 24 horas se realizaron las mediciones de las extinciones (Anthos Reader) como determinaciones dobles (longitud de onda: 450 nm, longitud de onda de referencia: 690 nm). A tal fin se extrajeron a partir de cada pocillo 2 x 10 μ l para determinaciones dobles y se transfirieron a una placa de 96 pocillos.

[0092] 7. Ensayo de vitalidad con Trypanblau

[0093] Las células son coloreadas después de la tripsinación con Trypanblau y se registra en la cámara de recuento de nuevos constructores el número de las células muertas (que se iluminan en color azul) / vivas (no coloreadas).

[0094] Al comienzo del ensayo, se aspira el medio con precaución desde el pocillo, se rellena en 15 ml de BlueCaps y se centrifugan las células no adherentes eventualmente presentes. El medio centrifugado se desecha. Las células adherentes en el pocillo se mezclan con 0,6 ml de solución de tripsina (1,25 mg/ml) 7 1,5 ml de medio, para disolver las células. A continuación se realiza la incubación a 37°C bajo agitación en el transcurso de 16 minutos. Las células disueltas son introducidas a continuación con el medio en el BlueCap preparado, en el que se encuentran las células eventualmente no adherentes. Las células son resuspendidas y se lleva a cabo la determinación del número de células con Trypanblau en la cámara de recuento de nuevos constructores. A tal fin se mezclan 25 μ l de la suspensión de células con 25 μ l de Trypanblau y a continuación se introducen en la cámara de recuento. Se recuentan dos cuartas grandes y el resultado se multiplica por 10.000. De esta manera se determina el número de las células vivas como también de las muertas, Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

[0095] Protocolos para la optimización del tiempo del ensayo de vitalidad con Trypanblau (fase experimental).

[0096] A través de agitación continua de los frascos de cultivo de células por medio de un agitador disponible en la industria se optimiza el contacto entre el medio y las células o bien entre el plasma y las células. De esta manera se acortan los tiempos de incubación tanto con el plasma del probando como también con el medio a un día, de manera que al cabo de 48 horas después del comienzo del ensayo existe un resultado.

[0097] Ejemplos

[0098] El ensayo de citotoxicidad de acuerdo con la invención ha sido probado en pacientes con fallos hepáticos para verificar la efectividad del procedimiento de asistencia del hígado MARS (Molecular Adsorbens Recirculation System, 18) para la reducción de toxinas endógenas, que conducen a un daño adicional del hígado. En este caso, las células son incubadas con las muestras de plasma de los pacientes antes y después de un tratamiento MARS. Con la ayuda del ensayo de citotoxicidad se pueden constatar diferencias claras entre las muestras de pacientes antes y después de la terapia MARS y en la comparación con muestras de probandos sanos, en el sentido de una función mejorada, capacidad de síntesis mejorada y vitalidad mejorada de las células HepG2/C2A, cuando fueron incubadas con el plasma del paciente de acuerdo con la terapia MARS.

[0099] El ensayo de citotoxicidad de acuerdo con la invención ha encontrado aplicación también en el marco de un estudio de terapia de sepsis (EIS S –Istudie) con el modelo de perfusión de plasma extracorporeal EISS (Extracorporeal Immune Support System, 19, que se basa en granulocitos donantes. En este estudio, se determinaron muestras de plasma de pacientes con choque séptico en el desarrollo de la terapia (cuatro instantes de extracción) y se midieron a tal fin en comparación con muestras de plasma de probandos sanos. En este caso, se detectaron diferencias claras entre las muestras de plasma de pacientes y de probandos sanos en el sentido de una vitalidad limitadas, una capacidad de síntesis limitada y una función limitada de las células HepG2/C3A en pacientes. También aparecieron diferencias marcadas en los resultados de los pacientes entre células HepG2/C3A supervivientes y no supervivientes en el desarrollo temporal, de manera que el ensayo de citotoxicidad desarrollado posee también un vapor de empleo para la supervisión de la terapia y como parámetro de pronóstico.

[0100] Actualmente se desarrolla un estudio clínico grande, en el que se prueba el ensayo en 50 pacientes con sepsis grave o choque séptico grave en comparación con un colectivo de pacientes “no séptico” (50 pacientes). En ninguno de los pacientes se puede diagnosticar una enfermedad hepática preexistente.

- 5 **[0101]** Además, el ensayo de citotoxicidad desarrollado es validado actualmente en el marco de un estudio en 15 pacientes, que deben someterse a un trasplante de hígado en el caso de fallo del hígado. El ensayo debe ayudar en este caso a poder obtener manifestaciones más exactas sobre la función del trasplante en el desarrollo posterior.

Literatura

[0102]

- (1) Bakker J, Grover R, McLuckie A, Holzapfel L, Andersson J, Lodato R, Watson D, Grossman S, Donaldson J, Takala J; Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group: Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NGmethyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebocontrolled multicenter study (study no. 144-002). Crit Care Med 32 (1):1-12, 2004
- 10 (2) Harbrecht BG, Zenati MS, Doyle HR, McMichael J, Townsend RN, Clancy KD, Peitzman AB: Hepatic dysfunction increases length of stay and risk of death after injury. J Trauma 53 (3): 517-23, 2002
- 15 (3) Kimura S, et al: Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival. Crit Care Med 29: 1159-63, 2001
- (4) Sakka S, et al: Prognostic Value of the Indocyanine Green Plasma Disappearance Rate in Critically 111 Patients. Chest 122: 1715-20, 2002
- 20 (5) Kobayashi M, Tsujitani S, Kurisu Y, Kaibara N: Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. Hepatogastroenterology 49 (48): 1602-6, 2002
- (6) Nöldge-Schomburg GFE, Priebe HJ, Armbruster K, Pannen B, Haberstroh J, Geiger K: Different effects of early endotoxaemia on hepatic and small intestinal oxygenation in pigs. Intensive Care Med 22: 795-804, 1996
- (7) Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R: The Systemic Inflammatory Response
- 25 Syndrom in Acute Liver Failure. Hepatology 32 (4): 734-9, 2000
- (8) Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome and associated costs of care. Crit Care Med 29 (7): 1303-9, 2001
- (9) Kelly JH, Darlington GJ: Modulation of the Liver Specific Phenotype in the Human Hepatoblastoma Line HEP G2. In Vitro Cellular and Developmental Biology 25 (2): 217-22, 1989
- 30 (10) Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, et al: Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. Hepatology 24: 1446-51, 1996
- (11) Kelly JH, Sussman NL: A Fluorescent Cell-Based Assay for Cytochrome P-450 Isozyme 1A2 Induction and Inhibition. Journal of Biomolecular Screening 5(4): 249-253, 2000
- 35 (12) Donato MT, Gomez-Lech MJ, Castell JV: A Microassay for Measuring Cytochrome P450IA1 and P450IIB1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96- Well Plates. Analytical Biochemistry 213: 29-33, 1993
- (13) Krasteva N, Groth TH, Fey-Lambrecht F, Altankow G: The role of surface wettability on hepatocyte adhesive interactions and function. J Biomater 12 (6): 613-27, 2001
- 40 (13a) Lescoat G, Desvergne B, Loreal O, Padeloup N, Deugnier Y, Bourel M, Brissot P: Modulation of Albumin Secretion by Ornithine Alpha-Ketoglutarate in Adult Rat Hepatocyte Culture and a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). Ann Nutr Metab 33: 252-60, 1989
- (14) Modrianski M, Umchova J, Bachleda P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Walterova D, Simanek V: Human Hepatocyte - A Model for Toxicological Studies. Functional and Biochemical Characterization. Gen Physiol Biophys 19: 223-35, 2000
- 45 (15) Dehn PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA: Characterization of the human hepatocellular Carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. In Vitro Cell Dev Biol Anim 40 (5-6): 172-82, 2004

- (16) Scudiero DA, Shoemaker RH, Pauli KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR:
Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other
tumor cell lines. *Cancer Res* 48 (17): 4827-33, 1988
- 5 (17) Gressner AM, Polzar B, Lahme B, Mannherz H: Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic
myofibroblasts via transforming growth factor α . *Hepatology* 23 (3): 571-81, 2003
- (18) Sen S, Mookerjee RP, Davies NA, Williams R, Jalan R: Review article: the molecular adsorbents recirculating
System (MARS) in liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 16(5): 32- 8, 2002
- 10 (19) Mitzner SR, Freytag J, Sauer M, Kleinfeldt T, Altrichter J, Klöhr S, Koball S, Stange J, Ringel B, Nebe B, Schmidt H,
Podbielski A, Noeldge-Schomburg G, Schmidt R: Use of human preconditioned phagocytes for extracorporeal immune
support: introduction of a concept. *Ther Apher* 5 (5): 423-32, 2001

REIVINDICACIONES

- 1.- Utilización de hepatocitos humanos para la determinación in-vitro de la función hepática en un probando, en la que se realiza una medición del daño de las células de los hepatocitos humanos después de la incubación con plasma de probandos.
- 5 2.- Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los hepatocitos humanos son seleccionados a partir de las líneas de células hepáticas humanas C3A, HLE, HepG2, HuH7, Hep3B, PLC/PRF/5 que se pueden adquirir en el comercio.
- 3.- Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los hepatocitos humanos son células HepG2/C3A.
- 10 4.- Utilización de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, para la detección precoz de un fallo hepático, para la supervisión de terapias, del desarrollo del tratamiento y de la regeneración de la función hepática y como parámetros de pronóstico.
- 5.- Utilización de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el probando está enfermo de "Systemic Inflammatory Response Syndrom" (SIRS), sepsis, sepsis grave, choque séptico, fallo del hígado o fallo de múltiples órganos.
- 15 6.- Procedimiento in-vitro para la determinación de la función hepática en un probando utilizando hepatocitos humanos, en el que después de la incubación de los hepatocitos humanos, que se pueden adquirir en el comercio, con plasma de probando, se deriva la función hepática del probando por medio de medición de los parámetros vitalidad, funcionalidad y grado de activación de los hepatocitos humanos y los hepatocitos humanos están seleccionados a partir de las líneas de células hepáticas humanas C3A, HLE, HepG2, HepG2/C3A, HuH7, Hep3B, PLC/PRF/5.
- 20 7.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los hepatocitos humanos son células HepG2/C3A.
- 8.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la función hepática del probando se deriva por medio de medición de la actividad de Cytochrom P450 Isoenzym 1A2 (CYP 1A2) de los hepatocitos humanos.
- 25 9.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la función hepática del probando se deriva por medio de medición de la actividad de los hepatocitos humanos microalbúmina y otras proteínas para la sintetización.
- 10.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la función hepática del probando se deriva por medio de medición de la liberación de lactato-dehidrogenasa a partir de los hepatocitos humanos.
- 30 11.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la función hepática del probando se deriva por medio de medición de la adherencia de los hepatocitos humanos vitales.
- 12.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la función hepática del probando se deriva por medio de medición de la actividad éster de los hepatocitos humanos vitales.
- 35 13.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la función hepática del probando se deriva por medio de medición del número de los hepatocitos humanos muertos y del número de los hepatocitos humanos vivos.
- 14.- Procedimiento in-vitro de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la función hepática del probando se deriva por medio de medición de la actividad de dehidrogenasas mitocondriales de los hepatocitos humanos vitales.
- 40