

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 821**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2001 E 01903136 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 1252293**

54 Título: **Fuente de tejido de hígado**

30 Prioridad:

19.01.2000 US 176798 P

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

15.02.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL
HILL (100.0%)
308 BYNUM HALL, CAMPUS BOX 4105
CHAPEL HILL, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**REID, LOLA y
LECLUYSE, EDWARD L.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 395 821 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

5 Fuente de tejido de hígado

1. Campo de la invención

10 [0001] Esta invención generalmente se refiere a obtención de células diploides, incluyendo células progenitoras o madre, de tejidos de cadáveres de donantes con corazones parados.

2. Antecedentes de la invención

15 [0002] Hay un fuerte interés comercial y clínico en el aislamiento e identificación de células progenitoras inmaduras de hígado debido al impacto que tal población celular podría tener en el tratamiento de enfermedades del hígado. Cada año en Estados Unidos, hay aproximadamente 300.000 hospitalizaciones anuales por insuficiencia hepática. Trasplantes de hígado son curativos para algunas formas de insuficiencia hepática, y aproximadamente 4800 trasplantes se realizan al año en Estados Unidos. Uno de los factores limitantes en el trasplante de hígado es la disponibilidad de hígados donantes especialmente dada la restricción que suponen hígados donantes para trasplante de órganos procedentes de

20 pacientes que han sufrido muerte cerebral pero no parada cardíaca. Hígados de cadáveres (asistólicos) donantes no han sido exitosos, aunque recientes esfuerzos para usar tales donantes han apoyado la posibilidad del uso de estos si el hígado se obtiene dentro de la media hora después de la muerte.

25 [0003] Trasplante celular en el hígado es una terapia alternativa atractiva para la mayoría de enfermedades del hígado. Los procedimientos quirúrgicos para trasplante celular son menores en relación a aquellos necesitados para trasplante de órganos enteros y, por lo tanto, se pueden usar en pacientes con varios riesgos quirúrgicos tales como la edad o enfermedad. El uso de células hepáticas humanas es superior a células hepáticas derivadas de otros mamíferos debido a que los patógenos potenciales, si los hay, son de origen humano y podrían ser ambos mejor tolerados por pacientes y fácilmente seleccionados antes de uso.

30 [0004] Intentos se han hecho en el pasado para obtener la población de células hepáticas progenitoras, que han sido propuestas como la población más versátil para terapia celular y genética del hígado. Las patentes US 5,576,207 y 5,789,246 a Reid *et al.* que utilizó marcadores celulares superficiales y laterales dispersan citometría de flujo para proporcionar una sub-población definida en el hígado. Progenitores hepáticos son células diploides que ellas mismas o

35 su progenie son capaces de diferenciar en hepatocitos.

[0005] Progenitores de hígado son también extremadamente útiles para la producción de factores de crecimiento. Estos podrían asociarse a su crecimiento o al de otros progenitores en el hígado (p. ej. progenitores mesenquimales o hemapoyéticos) y podrían también incluir factores de crecimiento no descubiertos aún asociados a pasos tempranos en la dedicación de células progenitoras hepáticas a un linaje particular. Estos factores de crecimiento nuevos podrían tener potencial en el tratamiento de la enfermedad hepática o en el control de los cánceres de hígado, ahora reconocidos como transformantes de los progenitores de hígado.

45 [0006] Además, progenitores de hígado son vehículos para terapia genética, donde los progenitores insertados genéticamente transformados o hepáticos normales promueven la salud del individuo en aquellos en los que progenitores hepáticos se trasplantan.

50 [0007] Intentos de ejecutar trasplante de células hepáticas han hecho uso de células de hígado maduras no fraccionadas y han mostrado alguna medida de eficacia. No obstante, los éxitos requieren inyección de números grandes de células (10-20 billones), ya que las células han limitado potencial de crecimiento in vivo. Además, la introducción de números sustanciales de células hepáticas maduras grandes (diámetro de célula medio 25-50 μm) se complica por su tendencia a formar agregados grandes sobre inyección, dando como resultado émbolos potencialmente fatales. Por otra parte, estas células suscitan una respuesta de rechazo inmunológico marcado forzando a pacientes a ser mantenidos con fármacos inmunosupresores para el resto de sus vidas.

55 [0008] Células hepáticas maduras diferenciadas son distinguibles de células hepáticas progenitoras por diferentes criterios. Las células diferenciadas tienden a formar aglomerados o agregados, que, si se inyectan en un paciente, suponen un riesgo de formación de émbolos. Las células diferenciadas son particularmente resistentes a crioconservación y son sobre todo inmunogénicas. Por otra parte, como la capacidad de duplicación de las células diferenciadas está limitada, el trasplante con células diferenciadas tiene pocas, si no ninguna ventaja en comparación con trasplante de órganos, y desventajas que incluyen un procedimiento más elaborado de preparación.

60 [0009] La escasez de órganos esenciales, por ejemplo, corazón, hígado, páncreas, pulmón y riñón, para trasplante u otros fines médicos que requieren tejidos donantes se debe a la disponibilidad limitada de órganos que todavía son funcionales. Habitualmente, los órganos destinados para trasplantes se recuperan de donantes con muerte cerebral cuyos corazones todavía latían. Si el corazón se detiene, la circulación sanguínea se detiene (isquemia), lo que

interrumpe la oxigenación de tejidos (anoxia) y, en consecuencia, los órganos se dañan isquémicamente dentro de un periodo temporal muy corto dando como resultado probabilidad casi cierta de que tales órganos no funcionen cuando se trasplantan. En general, ninguno de los órganos se usan después de detención del corazón y, experimentalmente, ninguno se usa después de más de media hora del tiempo de detención del corazón o asistolia. Habitualmente, sólo 1-2% de muertes en hospitales cumple el criterio de muerte cerebral-corazón que late. No obstante, una fuente de órganos grande y aún inexplorada para trasplante está disponible, muchas de víctimas de accidentes que o bien mueren en el sitio de una herida o tienen un tiempo de supervivencia post-trauma corto. Estas víctimas de accidente no se usan como donantes de órganos debido al daño isquémico. Órganos tales como hígado, cerebro y corazón están entre los tejidos más sensibles a isquemia. Por ejemplo, heridas cerebrales isquémicas y anóxicas de paro cardíaco suponen daño al cerebro y a tejidos neurológicos asociados después de aproximadamente cuatro minutos. El corazón puede sobrevivir intacto hasta cuatro horas después de paro cardíaco. El hígado puede sobrevivir funcionalmente durante no más de una hora y trasplantes de donantes a corazón parado (NHBD) se recomiendan que sean realizados preferiblemente dentro de los primeros treinta y cinco minutos de exposición para isquemia caliente (ver los resúmenes, incorporados por referencia, de los artículos por Ong HS, Soo KC, Joseph VT, Tan SY, Jeyaraj PR. La viabilidad de injertos de hígado para trasplante después de isquemia caliente prolongada. *Ann Acad Med Singapore* 1999 Jan;28(1):25-30; Hong HQ, Yin HR, Zhu SL, Lin YT. Los resultados de hígados de trasplante de donantes seleccionados de cadáveres de corazones parados. *Hiroshima J Med Sci* 1991 Sep;40(3):87-91. Bajo los presentes reglamentos médicos, el tiempo antes de que de un órgano potencialmente transferible pueda ser rescatado se retrasa normalmente. Esto ocurre debido a que el donante potencial debe llevarse primero a un hospital o a una morgue. La familia debe luego firmar los formularios de donación de órganos. Solo después de que los procedimientos de donación de órganos se completan, se le permite a un equipo quirúrgico acceder al cuerpo para recoger los órganos. Debido al tiempo transcurrido debido a estos procedimientos en muchas ocasiones los órganos se han dañado ya irreversiblemente o no son ya viables. Por consiguiente, la técnica anterior proporciona un gran número de métodos y procesos para órganos de donantes para protección de daño isquémico. Ver por ejemplo las patentes US nº 5,702,881; 5,660,976; 5,752,929; 5,863,296; 5,855,617; 5,843,024; 5,827,222; 5,723,282; 5,514,536; y 4,723,939 entre muchos otros. A pesar de la abundancia de referencias de la técnica anterior dirigidas a medios de protección de órganos de donantes de la pérdida de funcionalidad, la técnica anterior es silenciosa en lo que se refiere al uso de cadáveres cuyos corazones se detuvieron más allá del punto de tiempo irreversible. Solo las tres patentes US nº (5,843,024; 5,702,881; 4,723,939) parecen tratar donantes de corazón parado. Esta técnica anterior no enseña el uso de órganos "irreparable" para aislamiento de células progenitoras de estos. Mientras métodos de aislamiento de células precursoras hepáticas se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, las patentes nº 5,576,207 y 5,789,246) hasta la reducción a la práctica de la presente invención no se sabía que células precursoras hepáticas se puedan aislar de lo que se consideraba en la técnica anterior como un órgano "inútil".

[0010] Tecnologías desarrolladas de los avances en la comprensión de células progenitoras hepáticas humanas y su aislamiento y expansión, como fueron pioneros los inventores de la invención descrita aquí, ofrecen un impacto muy importante en la morbilidad y mortalidad asociadas a enfermedad hepática ofreciendo una población celular nueva que es extremadamente útil para trasplante celular en el hígado.

[0011] Por consiguiente, hay una necesidad largamente sentida para medios eficaces del uso órganos de cadáveres con circulación sanguínea detenida o corazón parado como una fuente de órganos o equivalentes de órgano para uso médico.

3. Resumen de la invención

[0012] La presente invención se refiere a un método para proporcionar un tejido con al menos una población celular diploide como una fuente de células diploides. El método comprende (a) recogida de un tejido de un donante que tiene un corazón parado cuando el tejido es recogido, sospechándose que el tejido recogido tiene al menos una población de célula diploide; (b) tratamiento del tejido recogido para obtener una población de células sustancialmente enriquecidas con células diploides. Preferiblemente, el donante no es un feto y se selecciona de un neonato, un bebé, un niño, un joven, o un adulto. Las células diploides obtenidas del presente método incluyen progenitoras.

[0013] En una forma de realización particular de la invención, el paso de tratamiento comprende el tratamiento del tejido recogido para proporcionar una suspensión celular sustancialmente única. Esta suspensión celular única se puede procesar además por separación de la suspensión celular sustancialmente única en dos o más fracciones, típicamente, tres o más, preferiblemente, cuatro o más. En este paso de separación, las células más grandes se separan de las células más pequeñas, células de densidad mayor de células de densidad inferior, o ambos. Cualquier método conocido por aquellos técnicos en la materia de separación de las células en fracciones puede usarse. Un método conveniente es centrifugado, primero a velocidades más lentas, luego velocidades más rápidas en aumento. Las fracciones que consisten esencialmente en células más pequeñas, células de densidad inferior, o ambas, se procesan además para proporcionar una población de células sustancialmente enriquecida con células diploides. En particular, ejemplos de células diploides, que son deseables, incluyen progenitoras que expresan alfa fetoproteína, particularmente, progenitoras hepáticas.

[0014] Los tejidos preferidos de la presente invención son los que han sido recogidos dentro de sobre seis horas después de que el latido del donante cesara, preferiblemente, dentro de sobre tres horas después de que el latido

- cesara, más preferiblemente, dentro de sobre dos horas después de que el latido cesara y, de la forma más preferible, dentro de sobre una hora después de que el latido cesara. Cuanto más pronto se recoge el tejido después de que el latido del donante cese mejor, no obstante. Por lo tanto, todavía de forma más preferida, son tejidos recogidos dentro de aproximadamente 45, 30, o 15 minutos después de que el latido del donante cesara. Una variedad de tejidos se puede recoger y procesar para obtener células diploides, incluyendo glándula suprarrenal, vaso sanguíneo, médula ósea, córnea, retina, islotes de Langerhans, conducto biliar, lente, pulmón, riñón, corazón, intestino, ovario, páncreas, próstata, paratiroides, pineal, glándula pituitaria, piel, testículo, vejiga, cerebro, médula espinal, bazo, timo, tiroides, o hígado.
- [0015] La presente invención se dirige también a una composición comprendiendo una población de células sustancialmente enriquecida con células diploides, especialmente aquellas que expresan alfa-fetoproteína, obtenida por el método de la invención.
- [0016] La presente invención proporciona un significativo gran avance en el campo de adquisición de órganos donantes y tejidos y proporciona medios par obtener de una fuente de tejido de células progenitoras y células diploides adultas. Esta invención fue completamente inesperada, ya que todas las referencias de la técnica anterior conocida consideraban órganos isquémicamente dañados como totalmente inútiles para cualquier fin significativo. Los medios preferidos comprenden recogida de tejido de un donante, donde el donante tiene un corazón parado y el tratamiento del tejido para proporcionar células diploides que pueden incluir células progenitoras o madre.
- [0017] Preferiblemente esta invención comprende un método para proporcionar una fuente de tejido de células diploides de hígado incluyendo de células progenitoras, que comprende recogida de tejido de hígado de un donante, donde el donante tiene un corazón parado y tratamiento del tejido para proporcionar células diploides y/o células progenitoras hepáticas. Tales células son útiles, por ejemplo, en repoblación de parénquima de hígado dañado o reconstrucción de hígado en un huésped en necesidad de esto. Mientras cualquier donante animal es igualmente apto, el donante preferido es un humano. Animales tales como cerdos y primates son igualmente adecuados.
- [0018] Por consiguiente, es un objeto de esta invención obtener tales órganos o tejidos dentro de veinticuatro horas o más después de que el latido cese. Aunque la limitación de tiempo no es vinculante, es preferible que el tejido se obtenga dentro de sobre dieciséis horas después de que el latido cese. Más preferiblemente, el tejido se obtiene dentro de diez horas después de que el latido cese. Aún más preferiblemente, el tejido se obtiene dentro de sobre seis horas después de que el latido cese. Incluso más preferiblemente, el tejido se obtiene dentro de sobre tres horas después de que el latido cese. Otro periodo de tiempo preferido es cuando el tejido se obtiene dentro de sobre una hora después de que el latido cese. Independientemente del periodo de tiempo, las células diploides y progenitoras son resistentes a isquemia. Los tejidos recogidos son o bien perfundidos con medios de perfusión adecuados o no perfundidos para tratamiento posterior.
- [0019] Mientras el tejido es preferiblemente enfriado a aproximadamente temperatura ambiente es igualmente ventajoso tener el tejido enfriado a aproximadamente 4 °C. El tejido se puede enfriar durante todo o parte del tiempo isquémico. Es decir, el órgano se puede someter a una combinación de isquemia caliente y fría.
- [0020] Dentro del campo de la invención es preferible que el donante sea un neonato, un bebé, un niño, un joven, o un adulto. Los tejidos fetales se consideraban inadecuados debido a la isquemia presumida se contemplan también dentro del campo de esta invención. Mientras la edad del donante no es muy importante, es deseable que el donante esté entre aproximadamente 0 años y aproximadamente 77 años de edad, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 años de edad.
- [0021] Los tejidos útiles preferidos en esta invención comprenden glándula suprarrenal, vaso sanguíneo, médula ósea, córnea, islotes de Langerhans, lente, hígado, ovario, páncreas, paratiroides, pineal, glándula pituitaria, piel, testículo, timo, tiroides o combinaciones de estos. Preferiblemente, el tejido es hígado.
- [0022] Otra forma de realización de la presente invención es proporcionar medio de procesamiento que suponga una suspensión celular sustancialmente única de tales tejidos. Métodos de tratamiento preferidos comprenden adicionalmente un paso de reducción, que reduce sustancialmente el número de células maduras o poliploides en la suspensión, para proporcionar una suspensión reducida enriquecida con células diploides y/o progenitoras que muestran al menos un marcador asociado a al menos un linaje celular. Sin limitación para tales medios, los pasos de tratamiento incluyen células de separación por tamaño o densidad.
- [0023] Preferiblemente, el tratamiento adicionalmente comprende selección de la suspensión aquellas células que expresan al menos un marcador asociado a al menos un linaje celular, por lo que al menos un linaje celular incluye al menos uno de linaje celular hepático, hematopoyético, o mesenquimal. Es otro objeto de esta invención proporcionar células diploides y/o células progenitoras con la capacidad para desarrollarse en hepatocitos, células biliares, o una combinación de estas.

[0024] Es preferible que células donantes de la invención expresen al menos un marcador incluyendo alfa-fetoproteína, albúmina, sialoproteína de hueso, CD14, CD34, CD38, CD90, CD45, CD117, ICAM-1, colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, glicoforina A, u osteopontina, bien solo o en combinación ventajosa.

5 [0025] Como otro objeto de la invención, se provee un método de terapia, en el que células progenitoras se usan como trasplante celular, biorreactor, órgano artificial, etc. Las condiciones y necesidades médicas comprenden síndrome
 10 Crigler-Najjar, tirosinemia, cirrosis, insuficiencia hepática aguda, diabetes, y otras condiciones hepáticas o relacionadas con el hígado conocidas en la técnica. En general, se tratan pacientes que pueden padecer al menos un trastorno del hígado seleccionado del grupo que consiste en inflamación del hígado, hepatitis vírica, daño de células hepáticas
 15 tóxicas, fibrosis del hígado, cirrosis hepática, congestión del hígado, distrofia del hígado, degeneración grasa de células hepáticas, hígado graso, trastornos de la función de desintoxicación, trastornos de la función excretoria del hígado, trastornos de la función conjugacional del hígado, trastornos de la función de sintetización de la hipertensión portal del hígado debido a una enfermedad hepática, o un coma de insuficiencia hepática, e intoxicación por productos de
 20 degradación de proteína o amoníaco. Estos malfuncionamientos suponen enfermedades tales como síndrome Alagille, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, atresia biliar, ductopenia biliar, fallo de médula ósea, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad de Biler, síndrome de Crigler-Najjar, enfermedad de Caroli, prurito colestático, coleditiasis, hiperbilirrubinemia conjugada, enfermedad de injerto-contrahuésped crónico, enfermedad hepática criptogénica, diabetes, síndrome de Dubin-Johnson, protoporfiria eritrohepática, carcinoma de conducto biliar extrahepático, hipercolesterolemia familiar, galactosemia, síndrome de Gilbert, enfermedad de
 25 almacenamiento de glicógeno, hemangioma, hemocromatosis, encefalopatía hepática, hepatocolangitis, hepatomalacia, hepatomegalia, hepatocarcinoma, hepatoblastoma, hemocromatosis hereditaria, ictericia, colestasis intrahepática, quistes de hígado, trasplante de hígado, insuficiencia hepática asociada a *Bacillus cereus*, crioglobulinemia mezclada, deficiencia de ornitina-carbamoyltransferasa, peliosis hepatis, porfiria cutánea tardía, cirrosis biliar primaria, ascitis refractaria, síndrome de rotor, sarcoidosis, colangitis esclerosante, esteatosis, síndrome de Summerskill, trombocitopenia, tirosinemia, sangrado variceal, enfermedad venoclusiva del hígado, y enfermedad de Wilson entre muchas otras, y son ventajosamente tratados con los métodos y composiciones de la presente invención.

[0026] Sin limitación a las formas de realización mencionadas anteriormente, se contemplan también métodos de terapia
 30 genética, que comprenden medios bien conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, introducción de un vector en células diploides y/o progenitoras, luego trasplantando a un huésped en necesidad de esto. Condiciones y genes objetivo pueden comprender el gen receptor LDL en la hipercolesterolemia familiar, los genes del factor de coagulación para factores VIII y IX en la hemofilia, el gen de alfa-1-antitripsina en el efisema, el gen de fenilalanina hidroxilasa en la fenilcetonuria, el gen de ornitina-carbamoyltransferasa en hiperamonemia, y genes de proteína de complemento en varias formas de deficiencias de complemento, y otras condiciones médicas que se tratarán
 35 ventajosamente o se curarán mediante terapia genética.

[0027] Otras formas de realización deseadas incluyen genes que codifican carbamoyl sintetasa I, ornitina-carbamoyltransferasa, argininosuccinato-sintasa, liasa de arginosuccinato, arginasa fumarilacetoacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, receptor lipoproteínico de densidad baja,
 40 hidroximetilbilano-sintasa, carbamoyl sintetasa I, ornitina-carbamoyltransferasa, argininosuccinato-sintasa, liasa de arginosuccinato, arginasa, factores VIII o IX, cistationa beta-sintasa, decarboxilasa de cetoácido de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-CoA-deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metílico malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, transferrina, beta-glucosidasa, piruvato-carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa-cinasa, glicina-deshidrogenasa, proteína H, proteína T, proteína de la enfermedad de Menkes, o el producto del gen de la enfermedad de Wilson.

[0028] La presente invención también se refiere a un método de aislamiento y crioconservación de células diploides y/o
 50 progenitoras de hígado humano que incluye (a) tratamiento de tejido de hígado humano para proporcionar una suspensión de células sustancialmente única incluyendo células diploides adultas, progenitoras y no progenitoras de uno o más linajes celulares encontrado en el hígado humano; (b) sometimiento de la suspensión a un paso de reducción, que reduce sustancialmente el número de no progenitoras en la suspensión, para proporcionar una suspensión reducida enriquecida en progenitoras que muestran uno o más marcadores asociados a al menos uno de los linajes celulares; y (c) selección de la suspensión reducida de aquellas células, que ellas mismas, su progenie, o formas más maduras de estas expresan uno o más marcadores asociados a diferentes linajes de células hepáticas; y
 55 (d) suspensión de las células bajo condiciones óptimas para crioconservación. Más preferiblemente, se seleccionan progenitores hepáticos que expresan proteínas citoplásmicas tales como alfa-fetoproteína. El tratamiento o pasos reductores de esta invención incluyen preferiblemente una centrifugación de gradiente de densidad de la suspensión de células hepáticas para separar las células según su densidad flotante y tamaño que se asocia a una o más fracciones de gradiente con una densidad flotante inferior.

[0029] No progenitores de la suspensión de células hepáticas incluyen células hepáticas maduras, hemopoyéticas y
 60 mesenquimales. Selección negativa de los no progenitores incluye el uso de marcadores asociados a células hepáticas maduras, tales como connexin32, marcadores asociados a células hemopoyéticas, tales como glicoforina A y CD45, o marcadores asociados a células maduras mesenquimales, tales como retinoides, o factor de von Willebrand.

- [0030] Otro aspecto de esta invención proporciona para progenitores de células hepáticas de origen hepático, hematopoyético, o mesenquimal. Estos linajes celulares, sus progenies o sus formas más maduras se seleccionan por marcadores antigénicos seleccionados del grupo que consisten en CD 14, CD34, CD38, CD45, CD 117, ICAM glicoforina A, y/o marcadores citoplásmicos tales como inmunorreactividad de tipo alfa-fetoproteína, inmunorreactividad tipo albúmina, o ambas. Alfa-fetoproteína deriva de formas variantes de algunos ARNm que son únicos para células progenitoras hepáticas y algunos para células progenitoras hemopoyéticas. Los progenitores de hígado de esta invención puede ser aislados del hígado de un feto, un neonato, un bebé, un niño, un joven, o un adulto.
- [0031] Conforme a aún otro aspecto de esta invención, progenitores de hígado humano aislado, una sub-población de las células diploides, se aíslan en una forma altamente enriquecida a substancialmente pura. Tales progenitores de hígado contienen progenitores hepáticos, mesenquimales y hemopoyéticos. Los progenitores hepáticos tienen la capacidad de desarrollarse en hepatocitos, células biliares, o una combinación de estos; los progenitores hematopoyéticos tienen la capacidad de desarrollarse en macrófagos, neutrófilos, granulocitos, linfocitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, o una combinación de estos. Los progenitores mesenquimales tienen la capacidad de desarrollarse en células endoteliales, células estromales, células hepáticas estrelladas (células Ito), células de cartílago, células de hueso o combinaciones de estas. El método de esta invención se puede usar para seleccionar expresión de progenitores mesenquimales CD34, osteopontina, sialoproteína de hueso, tipos de colágeno I, II, o III, o una combinación de estos.
- [0032] Los presentes inventores superan muchas de las dificultades anteriores fabricando células diploides, incluyendo células progenitoras, ideal para uso en terapias celulares y genéticas y para órganos bioartificiales. Las células son pequeñas, por lo tanto, minimizan la formación de émbolos grandes. También, las células tienen potencial de crecimiento extensivo que significa que pocas células se necesitan para la reconstitución de tejido hepático en un paciente. Finalmente, los progenitores tienen marcadores antigénicos mínimos que pueden suscitar rechazo inmunológico proporcionando esperanza de que se necesite poco fármaco inmunosupresor o ninguno.
- [0033] Se proveen progenitores del hígado que albergan ácido nucleico exógeno. Tal ácido nucleico exógeno puede codificar uno o más polipéptidos de interés, o puede promover la expresión de uno o más polipéptidos de interés.
- [0034] Se proporciona un método de alivio de los efectos negativos de uno o más trastornos humanos o disfunciones por administración a un individuo que sufre de tales efectos negativos de una cantidad eficaz de células hepáticas humanas aisladas diploides y/o progenitores. Los progenitores se pueden administrar parenteralmente vía un vaso vascular, o administrarse directamente en el hígado. La administración directa se puede efectuar quirúrgicamente vía vena porta, vena mesentérica, conducto biliar hepático, o combinaciones de estos. Alternativamente, los progenitores de hígado se puede administrar en un sitio ectópico del individuo, tal como el bazo.
- [0035] Los trastornos humanos o disfunciones que podrían ser aliviados por el método de esta invención incluyen: hepatocolangitis, hepatomalacia, hepatomegalia, cirrosis, fibrosis, hepatitis, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica, o errores innatos en el metabolismo, hepatocarcinoma, o hepatoblastoma. Cáncer del hígado podría ser un sitio primario de cáncer o uno que ha metastatizado en el hígado. El tumor metastásico podría derivarse de cualquier número de sitios primarios, incluyendo intestino, próstata, pecho, riñón, páncreas, piel, cerebro, pulmón o una combinación de estos. La enfermedad hepática o disfunción que se puede tratar con estos métodos también incluye enfermedad hepática o disfunción asociada a una degradación en el compartimento mitocondrial de tejidos hepáticos y puede consistir en enfermedad hepática crónica, insuficiencia hepática fulminante, enfermedad hepática inducida por virus, enfermedad hepática metabólica y disfunción hepática asociada a sepsis o traumatismo del hígado.
- [0036] Un biorreactor se provee que incluye (i) material biológico comprendiendo (a) progenitores aislados de hígado humano, su progenie, sus descendientes en maduración o diferenciados, o combinaciones de estos, (b) matriz extracelular, y (c) medios; (ii) uno o más compartimentos que albergan dicho material biológico o los componentes comprendiendo dicho material biológico; y (iii) una o más aberturas de conexión. El material biológico del biorreactor puede también incluir opcionalmente: (d) hormonas, factores de crecimiento, o suplementos nutritivos, o (e) plasma, suero, linfa, o productos derivado desde estos.
- [0037] El biorreactor se adapta para sostener dichos progenitores en un estado funcional viable, y puede sostener progenitores de hígado durante un periodo que varía de aproximadamente una semana o más tiempo. Específicamente, el biorreactor se adapta para uso como un hígado artificial, para fabricación de producto, estudios toxicológicos, o estudios metabólicos, incluyendo estudios que implican la actividad de citocromo P450, u otros tipos de metabolismo de fármaco.
- [0038] Se provee una composición de progenitores de hígado humano aislado, o una suspensión enriquecida con progenitores obtenida de hígado humano. La suspensión celular se provee en un portador farmacéuticamente aceptable o diluyente y se administra a un sujeto en necesidad de tratamiento. La composición de esta invención incluye progenitores de hígado que muestran uno o más marcadores asociados al menos a uno de uno o más linajes celulares encontrados en el hígado humano y están sustancialmente libres de células maduras. Más particularmente, progenitores de hígado aislado se derivan de uno o más linajes de células hepáticas, incluyendo linajes celulares hepáticos, hematopoyéticos, o mesenquimales y ellos mismos, su progenie, o formas más maduras de los progenitores de los

misimos que expresan al menos uno o más de marcadores antigénicos CD14, CD34, CD38, CD90, o CD117, CD45, glicoforina A, y marcadores citoplásmicos de inmunorreactividad tipo alfa-fetoproteína, inmunorreactividad tipo albúmina, o ambos.

[0039] Se provee un cultivo celular de progenitores de hígado que incluye progenitores aislados de hígado humano, su progenie, sus descendientes madurando o diferenciados, o combinaciones de estos. El cultivo celular incluye adicionalmente matriz extracelular comprendiendo uno o más colágenos, un o más proteínas de adhesión (lamininas, fibronectinas), y otros componentes tales como proteoglicanos (tales como heparano sulfato proteoglicanos); o un componente de matriz individual. La componente matricial incluye fragmentos de componentes matriciales; miméticos matriciales que pueden ser sintéticos y/o materiales biodegradables (es decir, microesferas) revestidos con un o más de los factores de una de las clases de matrices extracelulares. El cultivo celular incluye adicionalmente medios basales y otros nutrientes; hormonas y/o factores de crecimiento, con o sin un líquido biológico tal como suero, plasma o linfa. Adicionalmente, los medios de cultivo podrían contener uno o más compartimentos que tiene el material biológico tal como un placa de cultivo, matraz, frasco rotativo, transwell u otro contenedor de este tipo.

[0040] Los cultivos o biorreactores podrían usarse para producir varios factores segregados por células médicamente importantes incluyendo, pero no limitado a, enzimas, hormonas, citocinas, antígenos, anticuerpos, factores de coagulación, ARN antisentido, proteínas reguladoras, ribozimas, proteínas de fusión y similares. Los cultivos se adecúan para suministrar una proteína terapéutica tal como factor VIII, factor IX, factor VII, eritropoyetina, alfa-1-antitripsina, calcitonina, hormona de crecimiento, insulina, lipoproteína de baja densidad, apolipoproteína E, receptor IL-2 y sus antagonistas, superóxido-dismutasa, modificadores de respuesta inmunitaria, hormona paratiroidea, los interferones (IFN alfa, beta, o gama), factores de crecimiento de nervio, glucocerebrosidasa, factor estimulador de colonias, interleucinas (IL) 1 a 15, factor estimulador de colonias de granulocito (g-CSF), granulocito, factor estimulador de colonias de macrófago (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófago (m-CSF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), adenosina-desaminasa, factores de crecimiento de tipo insulina (IGF-1 y IGF-2), ligando promotor de megacariocito MPL, trombopoyetina, etc.

[0041] Se provee como composición farmacéutica que es útil para tratar y evitar una enfermedad hepática. La composición comprende una cantidad eficaz de células progenitoras de hígado cadavérico y un soporte farmacéutico. La enfermedades de hígado de interés incluyen enfermedad hepática crónica o aguda de origen tóxico, metabólico, genético, y/o infeccioso o de naturaleza degenerativa, o daño de hígado que resulta del uso de fármacos o sustancias perjudiciales para el hígado. Preferiblemente entre estas condiciones y enfermedades están la inflamación del hígado, hepatitis vírica, daño de células hepáticas tóxicas, fibrosis del hígado, cirrosis hepática, congestión del hígado, distrofia de hígado, degeneración grasa de células del hígado, hígado graso, trastornos de la función de desintoxicación, trastornos de la función excretoria del hígado, trastornos de la función conjugacional del hígado, trastornos de la función de sintetización de la hipertensión portal del hígado debido a una enfermedad hepática, o un coma de insuficiencia hepática, e intoxicación por productos de degradación de proteína de amoníaco. Más específicamente, estos incluyen, pero de forma no limitativa, síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, ductopenia biliar, fallo de médula ósea, síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, enfermedad de Byler, síndrome de Crigler-Najjar, enfermedad de Caroli, prurito colestático, colelitiasis, hiperbilirrubinemia conjugada, enfermedad de injerto-contrahuésped crónica, enfermedad hepática criptogénica, diabetes, síndrome de Dubin-Johnson, protoporfiria eritrohepática, carcinoma de conducto biliar extrahepático, hipercolesterolemia familiar, galactosemia, síndrome de Gilbert, enfermedad de almacenamiento de glicógeno, hemangioma, hemocromatosis, encefalopatía hepática, hepatocolangitis, hepatomalacia, hepatomegalia, hepatocarcinoma, hepatoblastoma, hemocromatosis hereditaria, ictericia, colestasis intrahepática, quistes de hígado, trasplante de hígado, insuficiencia hepática asociada a *Bacillus cereus*, crioglobulinemia mezclada, deficiencia de ornitina-carbamoyltransferasa, peliosis hepática, porfiria cutánea tardía, cirrosis biliar primaria, ascitis refractaria, síndrome de Rotor, sarcoidosis, colangitis esclerosante, esteatosis, síndrome de Summerskill, trombocitopenia, tirosinemia, sangrado variceal, enfermedad del hígado venooclusiva, enfermedad de Wilson y combinaciones de estos.

[0042] Otros objetos se darán a conocer por el experto en la materia visto la siguiente descripción detallada.

4. Breve descripción de las figuras

[0043]
Figuras 1a y 1b ilustran el efecto de isquemia caliente en la proporción de células aisladas con núcleos grandes y pequeños.
Figuras 2a y 2b ilustran análisis PCR de alfa-fetoproteína truncada (AFP) en células hemopoyéticas.
Figura 3 ilustra la relación entre tiempo de almacenamiento a -170°C y viabilidad de células hepáticas fetales descongeladas.
Figuras 4a y 4b ilustran histogramas típicos univariantes de suspensiones de células hepáticas fetales analizadas por selección de célula activada por fluorescencia (FACS).

Figura 5 ilustra el porcentaje de marcadores de superficie de expresión de células CD14, CD34, CD38, CD45 y glicoforina A (GA) en suspensiones de células hepáticas no-fraccionadas.

Figura 6 ilustra porcentaje de células en la suspensión celular original que expresa alfa-fetoproteína y otros marcadores antigénicos.

Figuras 7a, 7b y 7c ilustran expresión de alfa-fetoproteína antes y después de depleción de glóbulos rojos.

Figuras 8a, 8b, 8c, 8d, 8e y 8f ilustran el análisis FACS de suspensión de células hepáticas fetales para coexpresión de CD14, CD38 y AFP.

Figura 9 ilustra CD14 y CD38 enriquecidos para células AFP positivas.

Figuras 10a, 10b, 10c y 10d ilustran microscopia de fluorescencia de células progenitoras hepáticas humanas.

Figuras 11a, 11b, 11c y 11d ilustran células representativas seleccionadas por expresión de AFP.

Figuras 12a, 12b y 12c muestran que hay dos células positivas AFP en este campo.

Figuras 13a y 13b ilustran células que se marcan con calceína (A) para mostrar todos los tipos celulares.

5. Descripción detallada de la invención

[0044] En la descripción que sigue, varios términos se usan extensivamente para describir la invención. Para proporcionar una comprensión consistente y clara de la especificación y reivindicaciones, se proveen las siguientes definiciones.

[0045] Inmunorreactividad tipo alfa-fetoproteína: cualquier reacción inmunológica provocada por alfa-fetoproteína.

Fetoproteína alfa deriva de formas de variantes de algún ARNm siendo únicas para células progenitoras hepáticas y algunas a células progenitoras hemopoyéticas.

[0046] Progenitores cometidos: células inmaduras que tienen un único destino tal como progenitores hepatocíticos cometidos (dando ascensión a hepatocitos) o progenitores biliares cometidos (dando lugar a conductos de bilis). El proceso de perpetración no se entiende en un nivel molecular. Más bien, se reconoce haber ocurrido solo empíricamente cuando los destinos de células se han reducido al de un predecesor.

[0047] Células hepáticas: una sub-población de células hepáticas, que incluye hepatocitos y células biliares.

[0048] Células del hígado: como se utiliza en este caso, el término "células del hígado" se refiere a todo tipo de células presentes en un hígado normal, independientemente de su origen o destino.

[0049] Células madre: como se utiliza en este caso, el término "células madre" se refiere a células inmaduras que pueden dar lugar a células hijas con más de un destino. Algunas células hijas son idénticas al progenitor y algún "cometido" a un destino específico. Células madre totipotentes tienen capacidad de autorenovación (auto-mantenimiento), mientras que células madre determinadas tienen capacidad de autorenovación discutible. Células madre se pueden regenerar durante un proceso regenerativo proliferativo.

[0050] Progenitores hepáticos: estas células dan lugar a hepatocitos y células biliares. Los progenitores hepáticos incluyen tres subpoblaciones: "células madre hepáticas", "progenitores hepatocíticos cometidos" y "progenitores biliares cometidos" siendo los dos últimos células inmaduras que son descendientes de las células madre hepáticas y que tienen un único destino, bien hepatocitos o células biliares, pero no ambos.

[0051] Células madre hepáticas: una sub-población de progenitores hepáticos.

[0052] Progenitores del hígado: una población celular de hígado, incluyendo progenitores hepáticos, progenitores hemopoyéticos y progenitores mesenquimales.

[0053] Célula oval: una pequeña célula (<15 micras) con núcleos formados ovales que proliferan en animales expuestos a insultos oncogénicos. Estas células se piensa que derivan de progenitores de hígado y son transformadas parcial o completamente.

[0054] El "hígado" es un órgano grande localizado en la parte más hacia adelante del abdomen, descansa contra la partición muscular entre las cavidades abdominal y del pecho. El hígado es esencial para toda la vida y ejecuta sobre 100 funciones importantes, tales como desintoxicación de venenos y fármacos, metabolización de grasas, almacenamiento de carbohidratos, fabricación de bilis, proteínas plasmáticas y otras sustancias, y asistencia en la coagulación de la sangre. La enfermedad hepática es frecuentemente difícil de detectar hasta que la enfermedad se vuelve severa porque hay una sobreabundancia de tejido del hígado, y el hígado puede regenerarse parcialmente él mismo. Las señales de enfermedad hepática varían con el grado y ubicación del daño. Varias pruebas de sangre son necesarias por descubrir la extensión y la naturaleza del daño del hígado.

[0055] El término "factor de crecimiento" como se utiliza en este caso se refiere a los factores requeridos para regular eventos desarrollables o requeridos para regular expresión de genes que codifican otras proteínas segregadas que pueden participar en la comunicación intercelular y coordinación de desarrollo e incluye, pero no se limita a, factor de crecimiento de hepatocito (HGF), factor-I de crecimiento de insulina tipo I y II (IGF-I y II), factor de crecimiento epidérmico, (EGF), factor de crecimiento de transformación tipo a y tipo b (TGF-beta y TGF-alfa), factor de crecimiento de nervio (NGF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF),

factor de crecimiento de sarcoma (SGF), factor de crecimiento estimulador de colonias de granulocito macrófago (GM-CSF), factor del crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de liberación de hormona de crecimiento y prolactina (GHRF) y varios factores de crecimiento hemopoyéticos tales como interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8; IL-10; IL-11, etc., factor de diferenciación eritroide (EDF) o proteína de liberación de folitropina (FRP), inhibina, factor de proliferación de células madres (SCPF) y fragmentos activos, subunidades, derivados y combinaciones de estas proteínas entre muchos otros conocidos en la técnica. Generalmente, como se usa de ahora en adelante, el factor de crecimiento se refiere a una proteína segregada que se selecciona del grupo que consiste en una citocina, una linfoquina, una interleucina, un factor estimulador de colonias, una hormona, un factor quimiotáctico, un factor anti-quimiotáctico, un factor de coagulación, una proteína trombolítica, una proteína de complemento, una enzima, una inmunoglobulina y un antígeno.

[0056] Hematopoyesis: producción de células sanguíneas con destinos celulares de linfocitos (B y T), plaquetas, macrófagos, neutrófilos y granulocitos.

[0057] Mesengénesis: producción de derivados mesenquimales con destinos celulares de endotelios, células de grasas, células estromales, cartílago, e incluso hueso (los dos últimos ocurren en el hígado solo bajo condiciones de enfermedad).

[0058] Terapia celular: como se utiliza en este caso, el término "terapia celular" se refiere a transferencia in vivo o ex vivo de poblaciones de célula definidas usadas como material alogénico o autólogo y transplantadas a, o en proximidad de, células diana específicas de un paciente. Células se pueden transplantar en cualquier medio adecuado, portador o diluyente, o cualquier tipo de sistemas de entrega de fármaco incluyendo microsoportes, microesferas, microsomas, microesferas, vesículas, etcétera.

[0059] Terapia genética: como se utiliza en este caso, el término "terapia genética" se refiere a la transferencia in vivo o ex vivo de material genético definido para células diana específicas para un paciente en necesidad de este, alterando así el genotipo y, en más situaciones, alterando el fenotipo de aquellas células diana para el fin definitivo de prevención o alterando un estado de enfermedad particular. Como esta definición declara, la premisa subyacente es que estos procedimientos terapéuticos genéticos se diseñan para, en última instancia, prevenir, tratar o alterar una condición patológica escondida o abierta. En más situaciones, el objetivo terapéutico definitivo de procedimientos de terapia genética es alterar el fenotipo de población de célula diana específica.

[0060] CD: "clúster de diferenciación" o "determinante común" como usado aquí se refiere a moléculas de superficie celular reconocidas por anticuerpos monoclonales. Expresión de algunos CD es específica para células de un linaje particular o vía de maduración y la expresión de otros varía según el estado de activación, posición, o diferenciación de las mismas células.

[0061] Ploidía: número de cromosomas dentro de una célula.

[0062] Diploide: dos conjuntos de cromosomas por célula.

[0063] Tetraploide: cuatro conjuntos de cromosomas por célula.

[0064] Octaploide: ocho conjuntos de cromosomas por célula.

[0065] Poliploide: más de dos conjuntos de cromosomas por célula.

[0066] Las células del hígado fetales normales o neonatales son diploides. En la etapa de adulto de los jóvenes, el hígado es una mezcla de células poliploides y diploides. En roedores, el hígado es aproximadamente 90% de células poliploides y solo aproximadamente 10% de diploides. En seres humanos, el hígado de adultos jóvenes se compone de 50% de células diploides y 50% de poliploides.

[0067] Sin limitación para hígado, otras células progenitoras de varios tejidos cadavéricos se describen y se reivindican por esta invención. Como se usa de ahora en adelante el término "tejido cadavérico" no incluye tejido de fetos muertos obtenidos por medios tales como terminación prematura de embarazo por un procedimiento quirúrgico. Seres humanos entregado por parto natural o asistido se consideran como neonatos o bebés pero no como fetos. Por consiguiente, la edad de un humano comienza a "0" con el nacimiento o parto y no el tiempo de concepción. Así, un neonato muerto en el momento del nacimiento se considerará como un cadáver y no como un feto. Tejidos fetales recientes obtenidos se han usado como fuente de algunas células progenitoras y como tal se excluyen de la amplitud de las reivindicaciones de esta invención. No obstante, el tejido fetal que se considera inadecuado para otro uso médico debido al efecto de isquemia que se presume, sigue siendo adecuado para los fines de esta invención.

[0068] Cuando los términos "uno", "un" y "una" se usan en esta descripción, significan "al menos uno" o "uno más" a menos que se indique lo contrario.

- [0069] Figuras 2a e 2b ilustran análisis PCR de AFP truncado en células hemopoyéticas. RT-PCR se lleva a cabo usando combinación de cebadores hAFP1, hAFP2, hAFP3 y hAFP4. Columnas 1-3 corresponden a células Hep3B; columnas 10-12 corresponden a células STO; columnas 13-15 no tienen ARN ni ADNc. Nota, hay una banda compartida, una isoforma de AFP truncada, en las columnas 2, 5 y 8. Hay una isoforma de AFP truncada única para células de hígado observada en las columnas 1 y 4. Las especies de AFP completas se observan en las columnas 3 y 6.
- [0070] Figura 3 ilustra la relación entre tiempo de almacenamiento a -170°C y viabilidad de células de hígado fetales descongeladas. Los datos se expresan como el cambio de porcentaje en la viabilidad medida en el momento del tratamiento frente al tiempo de descongelación. Estos datos indican que los métodos de crioconservación significativamente no afectan a la viabilidad de las células. No hubo ningún cambio significativo en la viabilidad sobre un periodo que se extiende hasta 550 días en almacenamiento.
- [0071] Figuras 4a y 4b ilustran histogramas típicos univariantes de suspensiones de células hepáticas fetales analizadas por selección de célula activada por fluorescencia (FACS). La suspensión celular se preparó para análisis de inmunofluorescencia de alfa-fetoproteína (AFP) usando anticuerpos conjugados en el tinte rojo, Cy5, y para albúmina usando anticuerpos conjugados en el tinte azul (AMCA). Treinta mil células se seleccionaron para fluorescencia roja (AFP) y azul (albúmina). Los resultados muestran un grupo claro de células positivas para cada proteína. Además, el análisis muestra que aproximadamente 80 % de las poblaciones positivas para cada proteína se representan por las mismas células (es decir, coexpresión de las dos proteínas).
- [0072] Figura 5 ilustra el porcentaje de células que expresan marcadores de superficie CD14, CD34, CD38 CD45 y glicoforina A (GA) en suspensiones de células hepáticas no-fraccionadas. Téngase en cuenta que los datos GA se trazan en el eje derecho para preservar escala.
- [0073] Figura 6 ilustra el porcentaje de células en la suspensión de células que expresan alfa-fetoproteína y otros marcadores antigénicos. Medio $\pm$ SEM para porcentaje de células positivas para alfa-fetoproteína (AFP) y marcadores de superficie de célula específicos (CD14, 34, 38, 45 y glicoforina A).
- [0074] Figuras 7a, 7b y 7c ilustran la expresión de alfa-fetoproteína antes y después de depleción de la glóbulos rojos. Figura 7a ilustra la expresión de alfa-fetoproteína y Figura 7b ilustra albúmina, en suspensiones de células de hígado fetales con o sin depleción selectiva de glóbulos rojos usando fraccionamiento Percoll. Figura 7c ilustra la proporción de expresión de células ambas alfa-fetoproteína y albúmina, expresada como un porcentaje de células AFP o positivas de albúmina. Los datos para células con depleción de glóbulos rojos se muestran usando fraccionamiento Percoll.
- [0075] Figuras 8a, 8b, 8c, 8d, 8e y 8f ilustran análisis FACS de suspensión de células hepáticas fetales para coexpresión de CD14, CD38 y AFP. El diagrama de dispersión bivalente (8a) muestra la distribución de coloración tricolor para CD14 (ordenada) frente a coloración FITC para CD38 (abscisa). Puertas se crearon para seleccionar reagrupamientos de células específicas según las señales CD14 y CD38. Estos se usaron luego para mostrar la intensidad de coloración AFP en cada uno de estos subgrupos (figuras 8b, 8c, 8d y 8e). Los resultados AFP muestran que se produce un alto nivel de enriquecimiento para AFP por células de selección positiva para bien CD38 o CD14. La señal AFP generada de la suspensión de célula entera (30,000 células) se muestra en la Figura 8f.
- [0076] Figura 9 ilustra el enriquecimiento CD14 y CD38 para células AFP positivas. La proporción de células AFP positivas en suspensiones celulares preparadas de hígado fetal se pueden mejorar espectacularmente por selección de células con etiquetado de superficie positiva para los marcadores CD38 y CD14. La combinación de los dos marcadores produce un enriquecimiento significativamente mejor de células con AFP de aquellas obtenidas con solo marcador.
- [0077] Figuras 10a, 10b, 10c y 10d ilustran microscopía de fluorescencia de células progenitoras hepáticas humanas. Las células progenitoras representativas hepáticas del hígado fetal se tiñeron para contenido de AFP. Los tamaños celulares indican que están presentes ambos progenitores tempranos y progenitores hepáticos más avanzados.
- [0078] Figuras 11a, 11b, 11c y 11d ilustran células representativas seleccionadas por expresión de AFP. Las células con coloración positiva para CD14 (11b y 11d) son características de hepatoblastos. Las células con coloración negativa para marcadores de superficie (figuras 11a y 11c) son más pequeñas y consistentes en tamaño y morfología con progenitores hepáticos tempranos.
- [0079] Figuras 12a a través de 12c son del mismo campo y muestran que hay dos células AFP positivas en este campo. Figura 12a ilustra una imagen de fase confocal. Figura 12b ilustra inmunofluorescencia con anticuerpo para AFP. Figura 12c ilustra superposición (a) y (b) indicando la morfología de células AFP positivas en un grupo de células del hígado.
- [0080] Células AFP positivas se encuentran por tener un tamaño de célula similar y morfología si se aíslan de hígados adultos o fetales.

[0081] Figuras 13a y 13b ilustran células que se marcan con calceína (a) para mostrar todos los tipos celulares. Figura 13 (b) consiste en la misma coexpresión de células AFP y muestra que solo dos células son de AFP positivas. El tamaño celular no es un factor para positividad AFP.

[0082] La capacidad del hígado para regenerar se conoce ampliamente, y esto se realiza normalmente por la introducción de hepatocitos normalmente proliferativamente inertes en el ciclo celular. No obstante, cuando la regeneración de hepatocito se perjudica, conductos de bilis pequeños proliferan e invaden la parénquima del hepatocito adyacente. En seres humanos y animales experimentales estas células ductales se refieren como células ovales, y su asociación con regeneración defectuosa ha llevado a la creencia de que ellos se transforman en células madre o progenitoras. Estas células son de gran interés biológico desde sus duplicados normales, los progenitores hepáticos se pueden usar como alternativa para trasplantes de hígado y pueden también aprovechar vehículos para terapia genética para la corrección de errores innatos de metabolismo. Mientras la capacidad de progenitores para diferenciarse en hepatocitos se ha demostrado inequívocamente, la demanda de dichas células no ha alcanzado el suministro deseado debido a la poquedad de tejido de hígado donante.

[0083] El aislamiento de progenitores de hígado del hígado humano del cadáver, como se describe aquí, es nuevo y inesperado debido a la opinión predominante en la técnica de que el hígado pierde su utilidad debido a isquemia.

[0084] El aislamiento de progenitores hepáticos humanos de donantes cadáveres como se describe en este caso se obtuvo a través de la aplicación de una combinación de métodos únicos, marcadores y parámetros que los inventores presentes usaron por primera vez a partir de cadáveres para conseguir la única población celular de esta invención.

[0085] Alfa-fetoproteína y albúmina, ambas proteínas citoplásmicas, se consideran ser marcadores especialmente fiables para linajes hepáticos. Estas han sido la base de la estrategia para identificar las subpoblaciones hepáticas de otros tipos celulares en el hígado. Ambas son guías críticas en la identificación de células hepáticas, pero alfa-fetoproteína es especialmente diagnóstico de las células progenitoras hepáticas después de su purificación por citometría de flujo. Alfa-fetoproteína, AFP, ha sido adoptada también para estimar la pureza de progenitores hepáticos después de cualquier tipo de estrategia de fraccionamiento.

[0086] No obstante, en controles rigurosos para comprobar la validez de estos dos marcadores en los linajes hepáticos de identificación, análisis PCR se hicieron para detectar expresión en múltiples tipos de célula que se conocen por estar en el tejido de hígado. Los análisis PCR son los ensayos más sensibles que detectan incluso cantidades ínfimas de expresión de especies de ARNm particulares. La invención como se describe aquí demuestra que isoformas específicas de ambos AFP y ARNm de albúmina se pueden encontrar en progenitores hemopoyéticos significando que cuando tales ensayos sensibles se usan, criterios adicionales, tales como el uso de una sonda de exón 1 para AFP, deben usarse para definir hepático de poblaciones de célula hemopoyéticas. Aunque los análisis PCR revelaron que progenitores hemopoyéticos pueden expresar ambos AFP y especies de ARNm de albúmina, los niveles de expresión ARNm son muy pequeños. De hecho, cuando AFP y albúmina se miden a niveles de proteína, ninguna AFP detectable o albúmina podrían encontrarse en los progenitores hemopoyéticos. Por lo tanto, para ensayos de proteína de rutina (inmunofluorescencia, transferencia Western, etc.) y para ensayos de expresión de nivel alto de ARNm (transferencia Northern), AFP y residuo de albúmina permanecen como marcadores valiosos que definen linajes hepáticos.

[0087] Esta invención también divulga el diseño y preparación de cebadores específicos de RT-PCR para determinar el modelo de expresión de isoformas de ARNm AFP en las poblaciones de célula hepática frente a hemopoyética. Tres combinaciones diferentes de cebadores para AFP RT-PCR humano se usaron en la expresión de ARNm AFP distintivo en linajes hemopoyéticos y hepáticos. Para probar la expresión de AFP en células hemopoyéticas, como se ejemplifica en el ejemplo 1, los inventores han seleccionado diferentes líneas de origen hepático frente a hemopoyético para formas completas contra truncadas del la AFP. RT-PCR, que es la técnica más sensible conocida para identificación particular de moldes de ARN, se usa en estos estudios. Los datos hasta ahora indican que AFP humana está presente en una forma completa en dos líneas celulares humanas (HepG2 y Hep3B) derivadas de progenitores hepáticos y en una forma truncada en una línea celular humana, K562, derivada de unas células progenitoras hemopoyéticas. El hecho de que exón 1 es único para subpoblaciones progenitoras hepáticas habilita a uno a usarlo como una sonda para identificación de tipos de célula progenitora hepática frente a hemopoyético. Esta prueba se utiliza para identificar subpoblaciones específicas de células progenitoras de hígado de esta invención.

[0088] Por consiguiente, los inventores han diseñado nueve cebadores de PCR para detectar la presencia de ARNm AFP humano en los progenitores de hígado. Todas las combinaciones de cebadores detectan ARNm AFP en las líneas celulares humanas hepáticas HepG2 y Hep3B. No obstante, todas las combinaciones de cebadores distintos de uno para hAFP ARNm en toda su longitud amplifican la parte del ARNm AFP en una línea celular de eritroleucemia humana, K562. Como se predice anteriormente, esto demuestra que una de las formas truncadas de AFP, pero no el de toda su longitud, se expresa en K562. El resultado sugiere que los únicos cebadores útiles para identificación de células hepáticas son aquellos que detectan el AFP en toda su longitud, la expresión del cual es más probablemente restringido en una manera tisular específica. Diferentes líneas y tejido primario de origen hepático frente a hemopoyético se seleccionan para formas completas contra truncadas del AFP. Aunque una forma truncada de AFP se encuentra en algunos tejidos hemopoyéticos, se desconoce qué tipo celular en el tejido expresaba este.

[0089] Porque una forma truncada de AFP se encuentra en algunas subpoblaciones de células hemopoyéticas, la albúmina se analiza también tanto en células hemopoyéticas como hepáticas. Cebadores para albúmina se desarrollan en cierto modo de forma análoga a AFP (ver arriba) y se usan para valorar expresión de albúmina en las líneas de célula hepática frente a hemopoyética (ver Figura 4). En cuanto a AFP, una forma truncada se encuentra en K562, la línea celular hemopoyética, y un transcrito que podría ser detectado por el cebador para exón 12-14.

[0090] Antes de los estudios descritos aquí, y en la vasta literatura en progenitores hemopoyéticos, nadie ha informado nunca de AFP truncado o maduro o albúmina en progenitores hemopoyéticos normales en humanos.

Tratamiento y crioconservación de progenitores de hígado humano

[0091] Con el fin de producir de manera óptima progenitores de hígado humano disociados de hígados adultos o fetales, el protocolo descrito aquí hace uso de las fracciones superiores de un gradiente de densidad y excluye el granulado. La variación novedosa respecto al centrifugado de gradiente de densidad, como se describe aquí, es que el granulado se descarta y células con una densidad inferior flotantes (es decir, células recogidas en la parte superior del gradiente) se usan y se retiene para estudios adicionales. Los inventores han encontrado que células más jóvenes (es decir, diploides) y células más robustas a crioconservación están presentes en la parte superior o en el gradiente de densidad Percoll.

[0092] Las metodologías de cultivo como se describen en este caso son únicas y se modifican además para células de hígado humanas y/o de roedor. Adicionalmente, los cultivos pueden incluir microesferas biodegradables revestidas con componentes de matriz purificados extracelulares, y podrían luego usarse para inocular las células unidas sobre las microesferas para uso en biorreactores.

[0093] Metodologías de crioconservación de esta invención son únicas y diferentes de los métodos usados en la técnica anterior. Distinciones más importantes se deben al uso de diferentes tampones y crioconservación de una población de células hepáticas diploides que pueden incluir una población de progenitores que es baja en densidad y así, flotan en el centrifugado de gradiente.

[0094] La crioconservación exitosa de células de hígado humano maduras es altamente deseada, pero nunca se ha conseguido en la técnica. Generalmente, la crioconservación exitosa se define como la capacidad para congelar las células a temperaturas de nitrógeno líquido (-160 a 180°C) y luego descongelarlas y observar viabilidades de >75% y con la capacidad para fijarse sobre placas. Líneas celulares de cualquier origen, tales como espermatozoides y ovarios y células de tejidos fetales, se pueden congelar exitosamente en un tampón acuoso (es decir, un medio tal como, medio Eagle modificado por Dulbecco, RPMI 1640) y complementado con 10% de suero + un crioconservante (más frecuentemente dimetilsulfóxido: DMSO) y producir viabilidades para descongelación de 70-90% y con excelente capacidad para fijarse.

[0095] La metodología especial de crioconservación de esta invención se consigue a través del uso de un tampón nuevo, una población de célula nueva y una variación de esta que incluye inserción de las células en formas de matriz extracelular. Esta metodología consigue por primera vez viabilidad después de la descongelación que no es diferente de la viabilidad medida antes de refrigeración, inmediatamente después de la dispersión celular (ver Figura 3). Las viabilidades reales son variables debido a la condición del tejido después de la llegada y, en los presentes estudios, calculadas según el promedio 77% para las células de hígado cadavéricas fetales. Las metodologías de crioconservación no producen ninguna pérdida significativa en la viabilidad por el proceso refrigerante y en células que podrían sujetarse y expandirse ex vivo después de descongelación.

Marcadores celulares y citometría de flujo

[0096] Usando nuestra presente definición de progenitores de hígado como poblaciones de células inmaduras que expresan alfa-fetoproteína con o sin expresión de albúmina, se evalúan marcadores que seleccionarán específicamente estas células. Un descubrimiento alarmante es que muchos de los marcadores (es decir, CD34) que son tradicionales para progenitores hemopoyéticos, también identifican subpoblaciones progenitoras hepáticas. Así, las clases de un solo color para CD34 dieron lugar al enriquecimiento significativo (al menos 9 veces) para células que expresan AFP. No obstante, no se puede verificar que todas estas células positivas AFP sean progenitores hepáticos. Basado en el porcentaje que son albúminas positivas, aproximadamente 80-90% de las células son progenitores hepáticos, y los otros son o bien progenitores hepáticos demasiado inmaduros para expresar aún albúmina o subpoblaciones posiblemente hemopoyéticas que expresan alfa-fetoproteína.

[0097] Esta invención usa una única estrategia de selección citométrica de flujo. Usando la combinación de AFP y expresión de albúmina, como dos únicas características que definen progenitores hepáticos, se identifican marcadores antigénicos y otros parámetros citométricos de flujo que definen las células progenitoras hepáticas. Las estrategias de clasificación hasta la fecha implican clases para células pequeñas (< 15 micras por medidas de dispersión hacia adelante), que son diploides (usando fluorescencia de tinte de Hoechst 33342), son agranulares por dispersión lateral, son negativos para antígenos hemopoyéticos determinados (es decir, glicoforina A, el antígeno de glóbulos rojos y CD45) seguido o procedido por marcadores positivos compartidos entre subpoblaciones de células hepáticas y subpoblaciones de células hemopoyéticas (es decir, CD14 y/o CD38.)

[0098] En los experimentos descritos aquí, los inventores identifican células progenitoras hepáticas por clasificación para aquellas células que expresan fuertemente alfa-fetoproteína, expresan CD 34, que se conoce por ser un marcador de célula madre específico hemopoyético, y opcionalmente expresan débilmente de albúmina. También descrito aquí está la evidencia de que células hemopoyéticas pueden expresar también AFP, aunque una forma truncada. Los inventores han descrito una población de célula novedosa y proceso de aislamiento, identificación, cultivo y un método del uso de tal población celular. El éxito en el aislamiento, identificación y cultivo de la población de células particular de la invención se consigue parcialmente a través de métodos avanzados de aislamiento, reducción de afinidad, clasificación de célula activada por fluorescencia de alta velocidad, teniendo velocidad superior y exactitud y crioconservación modificadas y técnicas de cultivo.

[0099] Estrategias de clasificación citométricas de flujo se conciben purificando progenitores de hígado de suspensiones de células reciente aislada o de células de hígado descongeladas crioconservadas y que implican 1) coloración de las células con diferentes anticuerpos marcados con Fluoroprobe para marcadores de superficie de célula específicos y 2) uso de una combinación de estrategias de clasificación positiva y negativa en las tecnologías citométricas de flujo multiparamétrico. Los métodos para purificación de estadios de linaje específico de poblaciones de células hepáticas humanas se pueden usar con hígados de donantes de cualquier edad, ya que los marcadores parecen ser posición de linaje específico.

[0100] Los métodos mejorados de etiquetación de las células y un citómetro de flujo espectacularmente mejorado (un citómetro de flujo "MoFlo" de Citomation que clasifica células a 40.000 células/segundo y ejecuta 8 clases de color) sobre el que se usó en el pasado (Becton Dickinson's FACSTAR PLUS que clasifica células a 2000-6000 células/segundo y ejecuta 2-4 clases de color) asisten en el aislamiento exitoso, e identificación de esta población de células novedosa.

[0101] La expresión de AFP y albúmina como inmunorreactividad es bien definida en las suspensiones celulares, con un grupo claro de células que muestran una diferenciación clara de la señal de fondo (Figura 6). Alfa-fetoproteína se expresa en $6,9 \pm 0,86\%$ de células en las suspensiones de célula no-fraccionadas mientras la albúmina estuvo presente en $7,7 \pm 1,1\%$. Entre células positivas AFP $75,6 \pm 4,9\%$ coexpresó albúmina mientras $80 \pm 5,5\%$ de células positivas de albúmina también expresaron AFP. Así, aproximadamente 25% de células que expresan alfa-fetoproteína no expresaron albúmina y 20% de células que expresan albúmina no expresaron alfa-fetoproteína.

[0102] La proporción de células que soportan los marcadores de superficie principales usados en este trabajo se muestran para suspensiones de células completas (es decir, incluyendo glóbulos rojos) en la tabla 1 (donde GA es glicoforina A, un marcador de superficie en los glóbulos rojos):

Tabla 1: Porcentaje de poblaciones positivas de CD en la suspensión de células hepáticas originales y porcentaje de estas que son positivas para AFP

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
No fraccionado					
% en la población	$3,7 \pm 0,8$ (8)	$2,8 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,5$	$36,8 \pm 5$
% AFP positivo	$81,7 \pm 2,2$	$72,6 \pm 4,2$	$57,6 \pm 4,6$	$22,2 \pm 4,4$	$2,3 \pm 0,6$

Claramente, células positivas de glicoforina A (GA) (es decir, células eritroides) representan un componente principal de la masa celular pero una fracción insignificante de las células positivas AFP. Así, cuando suspensiones celulares se agotan de glóbulos por fraccionamiento Percoll, la proporción de células que expresan AFP aumenta significativamente a $12,9 \pm 1,9\%$ y aquellas que expresan albúmina a $12,1 \pm 2,3\%$. El porcentaje de albúmina de células positivas que coexpresan AFP aumentó también a $80,5 \pm 8,2\%$ y la proporción de células positivas de albúmina que coexpresan AFP aumentó a $89 \pm 3,1\%$, aunque ningún cambio es estadísticamente significativo. El resultado de este procedimiento en la proporción de células que soportan los marcadores de superficie se muestran en la tabla 2, con la proporción de cada subgrupo que muestra coloración positiva para AFP.

Tabla 2: Porcentaje de poblaciones positivas de CD en la suspensión de células hepáticas después de depleción de glóbulos rojos y porcentaje de estas que son positivas para AFP

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
Glóbulos rojos deplecionados					
% en la población	$7,4 \pm 1,3$	$3,4 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,9$	$8,2 \pm 0,3$	$27,5 \pm 4,7$

% AFP positivo 89,8 ± 1,3 77,1 ± 2,9 53,5 ± 7,2 32,5 ± 1,3 1,8 ± 0,9

En la mayoría de los casos, la presencia de AFP en los subgrupos seleccionados por marcador de superficie celular se distribuye continuamente con un preponderancia clara de células que muestran intensidades de coloración en el intervalo positivo. No obstante, la distribución de células positivas CD38 respecto a la coexpresión de AFP es única. En células positivas CD38 una distribución bimodal para coexpresión de AFP es aparente en que dos grupos diferentes de células son aparentes, un grupo positivo para AFP, el otro negativo. Esto se ilustra en la Figura 8a que muestra un diagrama de dispersión de células teñidas para expresión de CD14 y CD38 junto con histogramas univariantes de expresión de alfa-fetoproteína en células positivas para CD14 y/o CD 38.

[0103] Los resultados muestran que alfa-fetoproteína (AFP) está presente en 7% de las células en las suspensiones de células únicas de tejido de hígado fetal (es decir, en la suspensión de célula original). Se ha descubierto que el anticuerpo para glicoforina A (un antígeno en glóbulos rojos, eritrocitos) se encuentra para identificar una sub-población de células que no expresan AFP. Así, células que expresan este antígeno (es decir, células eritroides) se excluyen de células destinadas para caracterización de progenitores hepáticos. El antígeno CD38 identificó una población de células que muestra mejora significativa en la proporción de células positivas AFP (es decir, más de 7 veces la proporción en muestras no-fraccionadas). Ambos antígenos tienen varias isoformas, dependiendo de si hay o no hay secciones de la molécula, codificadas por variantes de empalme, presentes. Están disponibles anticuerpos que identifican las varias isoformas.

[0104] El marcador clásico para células progenitoras hemopoyéticas, CD34, está presente en muchas células que también expresan AFP. La selección de células positivas para CD34 produce enriquecimiento de células positivas AFP al menos 9 veces que se encontraban en la suspensión de célula original (67%, en las células positivas CD34 frente a 7% en la suspensión de células original). No obstante, el único anticuerpo más eficaz para enriquecimiento de células positivas AFP es CD14, que produce más de 11 veces de aumento en la proporción de estas células en comparación con la población original (81% frente a 7%).

[0105] Por consiguiente, el rendimiento de células positivas AFP se mejora usando una combinación de marcadores de superficie. Así, la extensión de coexpresión de AFP con combinaciones seleccionadas de marcadores de superficie se determina para establecer la extensión a la que la selección el marcador intracelular aumenta. Los datos se expresan como la proporción de marcadores de superficie de expresión de células positivas AFP (denominados el "rendimiento" de células positivas AFP) y como la proporción de todas las células positivas AFP que aparecen en la población definida por el marcador de superficie (denominadas el factor de "enriquecimiento" para células positivas AFP). Resultados para combinaciones de CD14, CD34 y CD38 se muestran en la tabla 3 con los resultados de marcadores individuales para comparación.

Tabla 3

	CD14	CD34	CD38	CD14 ± CD38	CD14 ± CD34
Enriquecimiento	80.6 ± 2.6	66.7 ± 4.7	53.8 ± 4.5	66.9 ± 3.5	68.2 ± 3.9
Rendimiento	39.8 ± 2.6	26.9 ± 4.4	22.0 ± 2.7	50.6 ± 2.7	52.2 ± 5.5

Enriquecimiento. Porcentaje células que expresan o bien (o ambos) los marcadores de superficie que son también positivos para AFP.

Rendimiento. Porcentaje de todas las células positivas AFP que también expresaron una o ambas de la combinación de marcadores de superficie

[0106] Estos datos se muestran también para la combinación CD14/CD38 de marcadores en la Figura 9

[0107] La morfología de coloración de células positivas para AFP es variable y abarca el intervalo entero de tamaño celular y forma en la suspensión celular a partir de hígados fetales pero no hígado de adulto. La mayor de las células positivas AFP, aproximadamente 12-15 micras, es mucho más pequeña que hepatocitos maduros, que varían en tamaño de 20-50 micras). Esto se ilustra en la Figura 10, que muestra diferentes células positivas AFP seleccionadas para la expresión de anticuerpos específicos.

[0108] En cualquier caso, una cierta proporción de células positivas AFP no muestra ninguna expresión de ningún anticuerpo de superficie usado en este estudio. La apariencia de estas células "nulas" positivas AFP se ilustra en las figuras 11a y 11c donde se comparan con la apariencia de células positivas CD14/células positivas AFP (figuras 11b y 11d) clasificadas de la misma suspensión. Las figuras 11a y 11b son microscopía de contraste de interferencia diferenciales y las figuras 11c y 11d son inmunofluorescencia AFP. Está claro que mientras ambos tipos celulares son positivos para AFP, la coloración de células negativas para antígenos de superficie son consistentemente más pequeños y menos complejos que los de las células positivas CD14.

[0109] En resumen, los marcadores para clasificación de progenitores hepáticos son glicoforina A⁻, CD45⁻, ICAM⁺, CD14⁺ y/o CD38⁺, o nulo para todos estos marcadores salvo para ICAM⁺, diploide, agranular (por dispersión frontal), menos de 15 micras (dispersión adelante). El fenotipo de estas células clasificadas es células pequeñas (< 15 micras), con citoplasma pequeño (proporción de núcleo/citoplásmico alto), albúmina y/o AFP⁺⁺⁺. Para morfología de las células ver las figuras 10-12.

Caracterización Confocal de células que expresan alfa-fetoproteína en el hígado de un humano adulto y fetal.

[0110] La microscopía confocal se utiliza para obtener las imágenes de células humanas fetales, pediátrica, o adultas que expresan alfa-fetoproteína. Esta metodología habilita a uno para observar la morfología y tamaño de estas células y para mostrar directamente la ubicación de proteínas intracelulares, tales como AFP y ALB, y la de marcadores de superficie de membrana tales como CD34 y CD38. Células de expresión AFP se encuentran tanto en hígado fetal, pediátrico y adulto (Figura 12a). Hígados fetales, como se esperaba, tienen el porcentaje máximo (6-7%), mientras que hígados adultos tienen un pequeño porcentaje (<4% en adultos jóvenes) y con los números decrecientes con edad hasta <1% en adultos de mediana edad. Ninguna célula que expresa AFP se ha encontrado en un hígado de donantes mayores de 57 años de edad. Los pocos progenitores hepáticos encontrados en hígados cadavéricos se enriquecen significativamente a través del proceso de fraccionamiento Percoll para producir hasta 2% de las células en fracciones Percoll 1 y 2 de los hígados donantes (tabla 4). La tabla 4 muestra el tamaño celular y viabilidad de fracciones de tampón complementado con Percoll. Células más pequeñas (fracciones 1-3) tienen viabilidad más alta que células más grandes (fracción 4) después de ser aisladas bajo la misma condición.

Tabla 4

Percoll			
Fracción	Viabilidad(%)	Tamaño de célula(μm)%	Células AFP ⁺
Fracción 1	82	< 12	0,5-1 %
Fracción 2	84	10-15	2 %
Fracción 3	85	15-25	< 0,2 %
Fracción 4	56	25-50	< 0,01 %

[0111] Estos resultados indican que órganos donantes preferiblemente útiles para terapias de células hepáticas al igual que para trasplante de órganos incluyen aquellas de donantes jóvenes hasta 45 años de edad y tales hígados se aíslan preferiblemente en las primeras 30 horas de parada del corazón. Los hígados de pacientes geriátricos (>71 años de edad) son donantes inapropiados para terapias celulares y quizás también para trasplantes de órganos enteros, especialmente para niños, ya que ellos tendrán poca si no ninguna capacidad regenerativa de progenitores hepáticos y solo la capacidad regenerativa mínima conocida por estar disponible de las células maduras.

Linaje de maduración

[0112] Los inventores de esta invención han mostrado que hígados isquémicamente dañados contienen una población de células progenitoras hepáticas capaces de crecimiento y diferenciación en hepatocitos y células biliares bajo tanto condiciones normales como patológicas. Esta invención representa la proposición de que cada posición en el linaje de hígado es una fase madurativa diferente, y que hay poblaciones de células madre en el hígado.

[0113] Sorprendentemente, el hígado de la presente invención proporciona 3 linajes madurativos separados: uno responsable de hepatopoyesis, producción de tejido de hígado y con destinos celulares de hepatocitos y células biliares (conducto biliar); otro para hemapoyesis, producción de células sanguíneas con destinos celulares de linfocitos (B y T), plaquetas, macrófagos, neutrófilos y granulocitos; y un tercero para mesengénesis, producción de derivados mesenquimales y con destinos celulares de endotelios, células grasas, células estromales, cartílago, e incluso hueso.

[0114] La población de célula aislada de esta invención tiene gran potencial como célula exitosa dirigida a terapia del hígado y/o genética. Esta invención, como se describe en los ejemplos, ha hecho avances sustanciales en la identificación de condiciones en las que primates no humanos al igual que progenitores humanos hepáticos pueden colocarse exitosamente en el cultivo celular y mantenerse mientras todavía retienen su capacidad para diferenciar completamente o para madurar. Después de las instrucciones descritas aquí, es posible aislar de cadáveres y mantener progenitores hepáticos indiferenciados en el cultivo y luego intercambiarlos a unos medios asociados de diferenciación para trasplante.

[0115] Debido a la capacidad para expandir significativamente in vitro, la población celular de esta invención, similar a las células en el linaje hemapoyético, se puede usar como una célula semilla para expansión ex vivo. Esto eliminaría la necesidad de resección invasiva quirúrgico importante del hígado del paciente.

[0116] Una vez que los progenitores humanos hepáticos se establecen en el cultivo, se realiza la transferencia del gen. Esto se consigue con varios sistemas vectores de entrega de gen diferentes (véase el ejemplo proporcionado más adelante). Una consideración importante en este punto es que algunas formas de transferencia de gen requieren crecimiento rápido de células, y puesto que células humanas diploides y/o progenitores de la invención se dividen significativamente bajo condiciones fisiológicas normales, estas células son candidatos ideales para transferencia de gen para hígado. También, las características de crecimiento de la población celular de esta invención permite el uso en una transferencia de gen ex vivo usando determinados vectores víricos de entrega de gen que requieren proliferación celular para inserción y expresión de gen eficaz.

[0117] La población de célula progenitora es también adecuada para una célula autóloga o alogeneica dirigida al hígado o terapia genética. Claramente, el uso de progenitores autólogos hepáticos eliminará un interés significativo con relación a rechazo de las células trasplantadas. La población celular de esta invención es particularmente atractiva para transferencia de células alogénicas, porque su perfil antigénico sugiere fenómenos de rechazo inmunológico mínimos. Por otra parte, otros elementos celulares, tales como glóbulos rojos, células endoteliales, células de Kupffer, que se conocen por ser altamente inmunogénicos se eliminan sustancialmente a través del proceso de purificación.

[0118] Una vez que los progenitores alogénicos o autólogos hepáticos se aíslan y se purifican, son modificados genéticamente o usados intactos, expandidos si fuese necesario in vitro y luego trasplantados en el huésped. Si se desea modificación genética, después de la modificación genética y antes del trasplante, aquellas células genéticamente modificadas se pueden expandir y/o seleccionar basado en la incorporación y expresión de un marcador seleccionable dominante. El trasplante puede volver al compartimento hepático o un sitio heterotópico. Para trasplante en el compartimento hepático, podría usarse la infusión por vena portal o inyección intraesplénica. La inyección intraesplénica puede ser la vía de administración de elección porque la mayor parte de los progenitores hepáticos trasplantados por medio de una inyección intraesplénica se mueven en el hígado. Una vez en el compartimento hepático, los progenitores hepáticos trasplantados modificados genéticamente maduran a una morfología de hepatocito normal.

[0119] Procedimientos médicos adicionales pueden asistir en la eficacia del injerto hepático de los progenitores hepáticos trasplantados. Los modelos animales han demostrado que en la administración de hepatectomía parcial de factores de angiogénesis y otros factores de crecimiento ayudan en el injerto y viabilidad de los hepatocitos trasplantados. Un método alternativo es trasplantar los hepatocitos genéticamente modificados en un sitio heterotópico.

[0120] Hasta la fecha, los métodos de terapia celular respecto al hígado han mostrado solo eficacia modesta. Esto se puede deber al hecho de que las células donantes que se usan son células de hígado predominantemente adultas y tienen vida corta después de aislamiento y reinyección. Además, el uso de células adultas produce rechazo inmunológico fuerte. En el presente caso, las células hepáticas progenitoras ofrecen eficacia superior debido a su capacidad limitada para suscitar fenómenos de rechazo inmunológico y debido a su potencial regenerativo extensivo.

[0121] Respecto a la terapia genética, los esfuerzos actuales hacen uso de "vectores inyectables dirigidos", la vía más popular para terapias clínicas en desarrollo. Estas aproximaciones han tenido eficacia limitada debido a tanto problemas inmunológicos como expresión transitoria de los vectores. Terapia genética ex vivo con células progenitoras (o uso de vectores inyectables de alguna manera dirigidos a las poblaciones de células progenitoras) puede probar mayor eficacia, ya que los vectores pueden introducirse ex vivo en subpoblaciones purificadas de las células progenitoras; las células modificadas se seleccionan y se reintroducen in vivo. Las ventajas de las células progenitoras son sus enormes potenciales de expansión, sus inducciones de reacciones inmunológicas, si las hay, mínimas y su capacidad para diferenciar para producir el linaje entero de células maduras.

Linajes interdependientes o comunes

[0122] Las metodologías mejoradas permiten a los inventores estudiar de más cerca y caracterizar progenitores hepáticos. Estos estudios revelan una relación especialmente cercana entre progenitores hepáticos y progenitores hemapoyéticos que indica una relación cercana entre estos dos linajes. De hecho, estos estudios muestran que las células progenitoras de los linajes hepáticos y hemapoyéticos comparten numerosos marcadores antigénicos (CD14, CD34, CD38, c-kit, antígenos de célula oval), comparten propiedades bioquímicas (es decir, transferrinas, glutatona-S-transferasas, y una isoforma truncada de alfa-fetoproteína), y tienen recubrimiento extensivo en los requisitos de cultivo (formas de matriz extracelular y requisitos específicos hormonales) para expansión ex vivo. Las células progenitoras de ambos linajes se localizan en los mismos sitios en el ácido de hígado. Finalmente, señalización paracrina está presente en todas las células de los dos linajes madurativos; que son señales producidas por cada uno de los linajes que regula células en el otro linaje. De hecho, se concluye que hay un linaje común o como mínimo linajes interdependientes entre las células hemapoyéticas y hepáticas.

[0123] Las poblaciones celulares descritas aquí se pueden purificar y utilizar para producir células o bien mielo-hematopoyéticas o derivados hepáticos dependiendo de las condiciones bajo las que las células se aíslan y se cultivan. Así, si las células se reintroducen in vivo en la sangre, podrían dar lugar potencialmente a derivados mielo-hematopoyéticos; si se introducen en el hígado, deberían producirán células del hígado. Fenómenos paralelos deberían

ocurrir en células mantenidas ex vivo. Por lo tanto, sistemas de biorreactor inoculados con poblaciones celulares clasificadas para un conjunto de antígenos que define ambos progenitores hemapoyéticos y hepáticos (es decir, CD38⁺, C-kit⁺, CD45⁺) pueden dar como resultado poblaciones celulares con destinos múltiples.

[0124] Otro aspecto importante de la población celular es que alguna de las células en la población muestra un antígeno de superficie de célula progenitora específico CD34. CD34 ha sido usado como un marcador de selección positivo conveniente para células madre hemapoyéticas de médula ósea. Esta invención, como se describe aquí, sugiere mejores vías para purificar cualquier población de progenitores, tales como las poblaciones de células hemapoyéticas y las de progenitores hepáticos que pueden usarse posteriormente en los programas preclínicos y clínicos.

[0125] Los usos para progenitores humanos hepáticos son muchos y diversos. Ellos incluyen: 1) investigación en células humanas; 2) producción de vacunas o antivirales; 3) estudios toxicológicos; 4) desarrollo del fármaco; 5) fabricación de proteína (usando las células como huéspedes para varios factores específicos humanos); 6) terapias de células del hígado; 7) terapias genéticas del hígado; 8) hígados bioartificiales que se pueden usar en investigación, estudios antimicrobianos y toxicológicos de proteína, o clínicamente como un sistema asistente del hígado. Considerando la posibilidad de un linaje común entre hemapoyesis y hepatopoyesis, como se avanza por los inventores de esta invención, las mismas células son adecuadas tanto para destinos hemapoyéticos como hepáticos dependiendo del microambiente en el que se colocan.

[0126] La disponibilidad de células progenitoras hepáticas humanas altamente purificadas permiten investigación mucho más extensiva en células humanas, y ciertamente facilitan el desarrollo de formas exitosas de células hepáticas y terapia genética, y permiten el desarrollo de hígados bioartificiales humanos para uso tanto en investigación como en dispositivos de asistencia clínica. Actualmente, el suministro limitado de tejidos humanos saludables excluye programas clínicos en la terapia de células hepáticas o en hígados humanos bioartificiales. Las células diploides, incluyendo sus subpoblaciones de células progenitoras obtenidas de cadáveres, tienen potencial de expansión suficiente para aliviar inmensamente ese suministro limitado.

[0127] Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

6. Ejemplos

6.1 Obtención de hígados de cadáveres

[0128] Los hígados de cadáveres se cateterizan por la vena porta, vena cava, o por ambas, perfundidas con tampones para eliminar sangre; y luego perfundidas con tampones con collagenasas/proteasas para disociar enzimáticamente las células. Después de la digestión, tomando normalmente 15-30 minutos dependiendo del tamaño del hígado, el tejido se prensa a través de estopilla o un filtro de nilón o rastrillado con un peine para completar mecánicamente el proceso de disociación celular. Las células disociadas se enjuagan con un tampón con suero para inactivar la collagenasa y otras enzimas usadas en el proceso de perfusión.

[0129] Los tampones de perfusión, P1 y P2, se colocan al baño maría a 37°C. La perfusión se realiza en una caja de perfusión tipo Miller, que se mantiene a 37°C en toda la perfusión. Los tampones se oxigenan durante la perfusión. Todos los tubos en la caja se enjuagan con etanol 70%, seguido de agua destilada y luego con P1 para asegurar que el aire se ha quitado del sistema. El hígado se cateteriza usando una cánula de teflón de una aguja de calibre 16 fijada a una jeringa 60 ml para enjuagar el tampón P1 helado a través del hígado usando varios vasos sanguíneos disponibles en la superficie cortada del hígado para piezas grandes de hígado (100-300 g). Para los casos en que está disponible un lóbulo de hígado entero, los restos de la vena cava pueden cateterizarse. Varios vasos sanguíneos en trozos de hígado se evalúan para aprender qué ofrecerá perfusión óptima del tejido. Este procedimiento también retira cualquier exceso de sangre del hígado. El vaso sanguíneo elegido se cateteriza y se sella en posición usando adhesivo de calidad médica (p. ej. calidad médica "superglue"). Todos los otros vasos grandes y aberturas de superficie se sellan usando el adhesivo de calidad médica, y, si es necesario, usando Q-tips con el adhesivo para ayudar a sellar las aberturas. Una vez el adhesivo se ha secado, la muestra de hígado se coloca en una malla de nilón dentro de un bol de vidrio de tamaño apropiado. El tampón P1 se añade al bol y el hígado se sumerge en el tampón. El bol con el hígado se coloca dentro de la caja de perfusión y la tubería de salida de la cánula se une. El tampón P1 se recircula durante 15 minutos empezando a una baja velocidad de aproximadamente 24 ml/min y luego lentamente se aumenta a entre 58 ml/min y 90 ml/minutos para optimizar una velocidad de flujo con una contrapresión aceptable. Hay que controlar que no haya demasiadas filtraciones del perfusado del hígado. Después de 15 minutos, el tampón P1 se quita del bol y se sustituye con el tampón P2 con la collagenasa. El tampón P2 se recircula hasta que el hígado se digiere suficientemente (evaluado por conversión de color de hígado de marrón rojizo oscuro a marrón pálido y por adquisición de textura blanda para hígado). El tampón P2 se recircula durante no más de 20-25 minutos. Una vez la perfusión ha cesado, el tampón P2 se drena del bol y el hígado se transfiere al bol a un cubierta biológica.

[0130] El medio de cultivo celular (DMEM) se añade al bol, y la cánula y el adhesivo se quitan junto con cualquier región no digerida del hígado. La cápsula del hígado (cápsula de Glisson) se rompe usando los fórceps y tijeras de tejido. Esto permite la liberación del tejido digerido en el medio dejando detrás el tejido conjuntivo y cualquier material no digerido. El material digerido se pone en el DMEM y luego se filtra a través de una serie de filtros de diferentes tamaños. Los filtros se colocan dentro de un envasador para ayudar la filtración. El material digerido se filtra primero con un único estrato de

estopilla, seguido de un filtro de nilón 400 μ , y luego a través de un filtro de teflón 70 μ . El filtrado se divide igualmente en los tubos de centrifugado y se centrifuga a 70 g durante 4 minutos.

[0131] Después de centrifugado, antes de la adición de Percoll, el sobrenadante se refiere como la fracción 1 (F1). Al granulado de células, se añaden DMEM y Percoll isotónico para dar una proporción final de 3:1 respectivamente. Por ejemplo, un pequeño granulado de células embaladas de 5 ml de volumen se suspenden en 30 mls de DMEM y 10 mls de Percoll isotónico. La muestra se centrifuga a 100 g durante 5 minutos para producir un granulado referido como la fracción F4. El sobrenadante se centrifuga nuevamente durante 5 minutos a 200 a 400 g para obtener un granulado referido como la fracción F3. El sobrenadante se centrifuga nuevamente ahora a 600- 800g para obtener un granulado referido como la fracción F2. Una centrifugado final se realiza a 1200-1800 g para obtener un granulado referido como la fracción F1. Las células de las fracciones diferentes se suspenden y se evalúan para viabilidad usando el ensayo de exclusión de tinte de azul de tripán. Las viabilidades de estas fracciones diferentes se presentan en la tabla 4.

[0132] Las células que permanecen unidas al árbol vascular o biliar del tejido del hígado después de la perfusión de hígado se retienen. Estas células se encuentran en la suspensión original de células obtenidas después de perfusión enzimática, y se dejan normalmente sobre los tamices (p. ej. estopilla) después de pasar a través de las células en suspensión. Estos restos del árbol vascular y biliar se procesan nuevamente con enzimas y las células resultantes se agrupan con las otras células.

[0133] Fraccionamiento Percoll se usa rutinariamente en las perfusiones de hígado por la mayoría de los investigadores para eliminar lo que ellos seponen que son detritos y células muertas; solo el granulado final se conserva por aquellos investigadores. La variación nueva a la rutina de perfusión, como se describe aquí es que el primer granulado, aquí, denominado F4, contiene células que se descubrió eran más sensibles a isquemia, ya sea caliente o fría, y células con una densidad flotante inferior (es decir, células recogidas de gránulos obtenidos en centrifugado a velocidades más altas) son menos sensible a isquemia. Estas células en las fracciones F1, F2 y F3 son más pequeñas, células supuestamente más jóvenes parenquimales y tienen una facilidad muy superior de refrigeración (ver sección en crioconservación). Por otra parte, estas células son células sustancialmente diploides, mientras que las células en la fracción F4 de adultos comprenden células en gran medida poliploides. Las células poliploides puede ser binucleares o pueden ser mononucleares y tetraploides u octaploides, o incluso niveles más altos de ploidía.

6.2. Ploidía en relación con fraccionamiento de poblaciones celulares

[0134] Las fracciones de células de hígado adulto (F1-F4), anteriormente descritas, se descubrió que contienen poblaciones de células diferentes: F1 contiene detrito, glóbulos rojos, células hepáticas estrelladas y células pequeñas hepáticas (<12 μ m) que contienen poblaciones de células progenitoras (de linajes hemapoyéticos o bien hepáticos); la fracción F2 contiene células hepáticas más grandes (12-15 μ m) que son células diploides parenquimales pequeñas; la fracción F3 contiene aún células parenquimales más grandes (15-25 μ m) y que consisten en una mezcla de células tetraploides y diploides; y la fracción F4 (la usada por todos los otros investigadores) que consiste en las células parenquimales más grandes (25-50 μ m) y que son casi en su totalidad poliploides (p. ej. octaploide y tetraploide).

[0135] En general, las células parenquimales en la fracción F1-F3 tienen una viabilidad después de refrigeración de 79-95%; las células parenquimales en la fracción F4 tienen un 50-80% de viabilidad después de la refrigeración (dependiendo de las condiciones del hígado después de la llegada). Las variables identificadas que influyen en la viabilidad de las células parenquimales en la fracción F4 fracción: 1) edad del donante (la edad mayor del donante, lo peor, la prognosis para las células); 2) el tiempo entre parada del corazón y entrega al laboratorio (cuanto más corto mejor). Estos factores son interactivos de manera que la entrega rápida de tejido de un donante mayor puede ser más atractiva que el tejido de un paciente joven que ha gastado demasiado tiempo en tránsito.

6.3. Efecto de isquemia en el fraccionamiento celular

[0136] Resultados de viabilidad celular se examinan como función de tiempo y temperatura de isquemia. La condición en la que el hígado se mantiene a temperaturas ambiente o superiores se denomina isquemia caliente. La condición en la que el hígado se mantiene a temperaturas inferiores a la ambiente se denomina isquemia fría. En la práctica común, isquemia caliente corresponde a una temperatura entre temperatura corporal vital y temperatura ambiente mientras que isquemia fría corresponde a cualquier temperatura por debajo de la temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente 10 °C o aproximadamente 4 °C.

[0137] En la isquemia caliente, los hígados se mantienen a temperaturas por encima de ambiente y los hígados se perfunden luego. En una forma alternativa de isquemia caliente, los hígados se mantienen a temperaturas por encima de ambiente durante un tiempo, luego se enfrían, y posteriormente se perfunden con soluciones de disociación calientes. La única suspensión celular que resulta de cualquier perfusión se procesa para proporcionar fracciones celulares que tienen proporciones diferentes de células poliploides y diploides. Progenitores son una sub-población de células diploides. Por otra parte, se ha observado que, células poliploides diferenciadas son sensibles a isquemia a temperaturas por encima de la ambiente. En la siguiente tabla, células de hígado de rata viables se distinguen de células muertas por coloración con yoduro de propidio (PI), que mancha el núcleo de células muertas. Células

mononucleadas y binucleadas se contaron en vivo y fracciones muertas, se clasificaron por citometría de flujo después de la fijación, permeabilización y recoloración con PI para visualizar núcleos en todas las células.

Tabla 5

Duración de isquemia caliente	% Células vivas binucleadas	% Células muertas binucleadas
ninguna	32	30
2 hr	27	47

[0138] Un rendimiento de célula total de perfusión de hígado se mide como función de tiempo de isquemia caliente usando ratas como modelo. Ratas Sprague-Dawley masculinas de 250-300 g cada una, de aproximadamente 8 semanas de edad, se usaron. Animales no isquémicos se miden produciendo $>400 \times 10^6$ células aisladas por hígado. Se descubrió que el rendimiento de célula total cae rápidamente con tiempos de isquemia caliente inferiores a una hora para proporcionar 150 a 250×10^6 células por hígado. El rendimiento de células total en tiempos de aproximadamente 1 hora a cinco horas se descubrió que era relativamente estable a entre 50 y 150×10^6 células por hígado. El rendimiento de células vivas disminuye rápidamente con tiempos de isquemia caliente inferiores a una hora y a veces más de una hora es estable a aproximadamente 10×10^6 células por hígado. Así, la proporción de células viables se encuentra que es bimodal con isquemia caliente. A veces menos de una hora tanto células vivas como muertas se reducen precipitadamente de manera que la proporción de viabilidad es invariable. A veces más de una hora y hasta cinco horas se observa un porcentaje estable de células viables.

[0139] Las áreas de proyección de núcleos de células hepáticas se miden como función de tiempo de isquemia caliente que usa el modelo de rata anterior. Hígados se perfunden, las células se aíslan como una única suspensión celular, y se manchan con yoduro de propidio. Células vivas (PI-negativas) se recogen por citometría de flujo, luego se sujetan a una platina de vidrio, se fijan, permeabilizan y se retienen con PI para visualizar núcleos. Se descubrió que los animales de control que se perfunden sin isquemia tienen una distribución bimodal de áreas de núcleo correspondiente a la presencia de tanto células mononucleadas como binucleadas de hígado viable. Después de una hora y después de dos horas de isquemia caliente, se descubrió que la proporción de células binucleadas que se reduce. Como las células binucleadas son necesariamente poliploides, estos datos se consideran que indican que células poliploides son más sensibles a isquemia que células diploides.

[0140] La resistencia de células diploides a isquemia se soporta posteriormente por análisis de tamaño de núcleo en células mononucleadas. Células mononucleares puede ser bien diploides o poliploides con las células diploides con núcleos más pequeños que las células poliploides. El modelo de rata anteriormente descrito se utiliza para preparar células vivas para medición del área de los núcleos. El porcentaje de núcleos totales se presenta en la Figura 1a para indicar que células con núcleos pequeños son relativamente resistentes a isquemia. Como los núcleos poliploides tienden a ser más grandes que los núcleos diploides, se descubrió que estos datos indican que células diploides son relativamente resistentes a isquemia caliente. El cambio entre tamaños nucleares en los hígados de control e hígados después de dos horas de isquemia se descubrió que no difieren, como se ilustra en la Figura 1b.

[0141] La viabilidad celular se examina también ventajosamente como función de tiempo de isquemia de temperatura baja, ver las tablas 6 y 7. En esta forma de realización, el hígado se enfría rápidamente a aproximadamente 10 °C sustancialmente inmediatamente post-mortem. Incluso más ventajosamente, el hígado se enfría rápidamente a aproximadamente 4 °C sustancialmente inmediatamente post-mortem. El enfriamiento se puede conseguir por cualquiera de los diferentes métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitado al simple expediente de embalaje del abdomen del cadáver donante en hielo o bolsas de fluido enfriado. Los hígados se mantienen a una de las temperaturas anteriores por debajo del ambiente y se perfunden luego, como se describe, a veces hasta aproximadamente 30 horas, o más ventajosamente, a veces hasta aproximadamente 20 horas. La única suspensión celular que resulta de la perfusión se procesa para proporcionar progenitores. Se observó que las células poliploides son sensibles a isquemia aunque la temperatura se mantenga por debajo de la ambiente e incluso a 4 °C.

Tabla 6

Hígados humanos fetales		
#	Isquemia fría (hrs)	Viabilidad media +/- Desviación estándar (Error Std.)
139	18	75,4±15,9 (1,7)
5	66	24±8,9 (4)

Tabla 7

Hígados humanos pediátricos y adultos			
Fracción	# Hígados	Isquemia fría (hrs)	Viabilidad $\pm$ Desv.std. (Error std)
F1	9	<20	67,9 $\pm$ 18,3 (6,1)
F1	4	>20	62,5 $\pm$ 17,5 (8,8)
F2	7	<20	83,4 $\pm$ 10,3 (3,9)
F2	6	>20	73 $\pm$ 16 (6,5)
F3	8	<20	81,9 $\pm$ 8 (2,8)
F3	5	>20	75,2 $\pm$ 14,5 (6,5)
F4	16	<20	81,6 $\pm$ 7,4 (1,9)
F4	13	>20	21,2 $\pm$ 24,9 (6,6)

[0142] Progenitores obtenidos a partir de hígados donantes como se describe en uno o más de los métodos anteriores se adecúan para uso en crioconservación, en citometría de flujo, en coloración celular, en selección celular, en regeneración de hígado, en un biorreactor, en un hígado artificial y como tratamiento terapéutico, como se describe debajo.

6.4. Isquemia caliente en un donante humano

[0143] La muestra Ren # 200 se recibe el 21 de mayo de 1999 de un donante adulto macho. El donante es declarado con muerte cerebral y se evalúa como un donante para trasplantes de órganos. No obstante, antes el cirujano del trasplante es capaz de recuperar el órgano, el donante padece de parada del corazón. El cirujano es capaz de quitar el hígado dentro de los 30-60 minutos desde la parada del corazón, constituyendo este tiempo el "tiempo de isquemia caliente". El tiempo de sujeción cruzado es 21:19 el 20 de mayo de 1999. El hígado se enjuaga con tampón de transporte (Viaspan) y se pone en hielo y se transporta de nuevo a UNC. Se recibe la siguiente mañana a las 11 en UNC (constituyendo 13 horas y 41 minutos de isquemia fría) y se procesó inmediatamente. Se descubrió que el tratamiento supone las siguientes suspensiones celulares con viabilidades indicadas:

Tabla 6

Fracción	Viabilidad%	Rendimiento total, nº células viables	células, % total
F1	69%	1,5 x 10 ⁸	7,8
F2	65%	3,6 x 10 ⁸	18,8
F3	81%	5,5 x 10 ⁸	28,8
F4	83%	8,5 x 10 ⁸	44,5
Totales		19,1 x 10 ⁸	99,9

Así, el tratamiento de tejido de hígado humano que se sometió a isquemia caliente tal como para hacer este inadecuado para trasplante de órganos se descubrió que produce fracciones de células aisladas comprendiendo células diploides.

6.5. Expresión de alfa-fetoproteína en células diploides aisladas de hígado humano

[0144] En un paciente masculino, edad 37, recibido en la unidad de Shock Trauma después de una colisión vehicular y pronunciado DOA, muerte de asistolia se estima a 25 min. antes de aceptación en la unidad de Shock Trauma. El cadáver donante se prepara para donación de órganos por desinfección externa. El hígado se quita asépticamente, se embala en una bolsa aséptica y se enfría para el transporte al laboratorio de células cercano. La temperatura de núcleo de hígado donante se mide usando una sonda de temperatura de superficie estéril. Una temperatura de 10 °C se registra a 45 min. después de tiempo de muerte estimado. Se inicia la perfusión del hígado con solución de disociación caliente (ver arriba). Una suspensión de células hepáticas donantes se prepara, como se ha descrito anteriormente, y células viables diploides se aíslan por centrifugado en un tampón complementado con Percoll como anteriormente. Las células aisladas se dividen en partes alícuotas para crioconservación, para otra caracterización incluyendo tipificación del antígeno, y para expansión en el cultivo celular antes del trasplante a un receptor compatible con el antígeno.

[0145] En un segundo paciente masculino, edad 34, recibido en la sala de emergencia después de un accidente vehicular y pronunciada DOA, resultó muerte de exanguinación de laceraciones internas y asistolia consecuente se estima a 45 min. antes de aceptación en la sala de emergencia. El cadáver donante se prepara para donación de órganos por desinfección externa. El hígado se quita asépticamente, se embala en una bolsa aséptica y se enfría para transporte al laboratorio de células adyacente. La temperatura de hígado donante se mide usando una sonda de temperatura de superficie estéril. Una temperatura de 10 °C se registra a 80 min. después del tiempo de muerte estimado. Se inicia la perfusión del hígado con solución (ver arriba). Una suspensión de células hepáticas donantes se prepara, como se ha descrito anteriormente, y células viables diploides aisladas por centrifugado en un tampón complementado con Percoll como se ha descrito anteriormente. Las células aisladas se dividen en partes alícuotas para crioconservación, para otra caracterización incluyendo tipificación de antígeno, y para expansión en el cultivo celular antes de trasplante a un receptor compatible con el antígeno.

[0146] Muestras de las células aisladas de los dos donantes se preparan para coloración con anticuerpo para alfa-fetoproteína, como anteriormente, y se analizaron por selección celular en un citómetro FACStar. Subfracciones de células correspondientes a células parenquimales mononucleadas con núcleos pequeños que son células sustancialmente diploides se comparan con células correspondientes a células poliploides, que son, ambas células mononucleadas con núcleos grandes y células binucleadas. Comparación de las células de los donantes compatibles por sexo y edad que han experimentado duraciones diferentes de isquemia caliente se utiliza para evaluar susceptibilidad relativa de células de hígado poliploides y diploides al efecto de isquemia caliente. Progenitores hepáticos que expresan alfa-fetoproteína son una sub-población de las células diploides del hígado. La capacidad de células que expresan alfa-fetoproteína para sobrevivir a isquemia fría o caliente es igual o mejor que la que es evaluada de las otras poblaciones de células hepáticas diploides.

25 **6.6. Desarrollo de cebadores para estudios PCR**

[0147] Análisis de isoformas de alfa-fetoproteína (AFP) expresaron diferencialmente en células hepáticas frente a otros tipos celulares.

Líneas celulares: dos hepatomas humanos, Hep3B y HepG2, se mantienen en Eagle's MEM complementado con 1 mM de piruvato de sodio, 2mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 0,1 mM de solución de aminoácido no esencial MEM, 5 µg/ml de insulina y 10% de FBS.

Una línea celular de eritroleucemia humana, K562, y una línea celular de fibroblasto embrionario de ratón, STO, se mantienen en DMEM/F12 complementado con 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 5 x 10⁻⁵M 2-ME y FBS 10%.

[0148] RT-PCR: ARN Totales se extraen de Hep3B, HepG2 y STO por el método estándar. Los ADNc se sintetizan por cebado de oligonucleótidos-dT y se someten a amplificación PCR usando conjuntos de cebadores diseñados por los inventores, y se preparan para alfa-fetoproteína humana (AFP). Las secuencias de cebadores son de la siguiente manera,

hAFP1:-5'-ACCATGAAGTGGGTGGAATC-3',
hAFP2:-5'-CCTGAAGACTGTTCATCTCC-3',
hAFP3:-5'-TAAACCCTGGTGTGGCCAG-3',
hAFP4:-5'-ATTTAACTCCCAAAGCAGCAC-3',
hAFPexon2:-5'-CTTCCATATTGGATTCTTACCAATG-3'
hAFPexon3:-5'-GGCTACCATATTTTTGCCCAG',
hAFPexon4:-5'-CTACCTGCCTTTCTGGAAGAAC-3',
hAFPexon5:-5'-GAGATAGCAAGAAGGCATCCC-3', y
hAFPexon6:-5'-AAAGAATTAAGAGAAAGCAGCTTG-3',

Las combinaciones de los cebadores son de la siguiente manera:

hAFP1 y hAFP2,
hAFP3 y hAFP4,
hAFP1 y hAFP4,
hAFPexon2 y hAFP4,
hAFPexon3 y hAFP4,
hAFPexon4 y hAFP4,
hAFPexon5 y hAFP4, y
hAFPexon6 y hAFP4.

[0149] PCR se realiza en un volumen total de 50µl que consiste en 1µM de cada cebador, 200µM de cada dNTP, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris HC1, pH8,3, y 1,25U de polimerasa Amplitaq (Cetus Corp). Las muestras se calientan a 94°C durante 3 min seguido de amplificación durante 30 ciclos de 2 min a 94°C, 2 min 62°C y 3 min a 72°C. Después del último ciclo, un paso de extensión final se realiza a 72°C durante 7 min. Luego 5µl de cada reacción PCR se ejecuta gel de agarosa 2% con 5 µg/ml de bromuro de etidio en el tampón de tris-acetato-EDTA. El gen humano AFP

consiste en 15 exones. Para distinguir transcritos truncados de ARNm AFP funcional completo, dos partes diferentes de secuencia de ADNc AFP se seleccionan como moléculas objetivo de RT-PCR. La combinación de cebador de hAFP1 y hAFP2 se usa para la amplificación de exón 1 con la iniciación encontrada para exón 3, mientras que de hAFP3 y hAFP4 amplifican exón 12 a exón 14 con el codón de terminación. Los resultados del PCR son que ambas combinaciones de los cebadores dieron como resultado las bandas de amplificación fuertemente detectadas en el ARN de Hep3B y HepG2 (columnas 1, 2, 4, y 5). En contraste, sólo la banda específica de la parte C-terminal se detectó por el conjunto de cebador de hAFP3 y hAFP4 en el ARN de K562 (columnas 7 y 8). Este resultado sugiere que la línea celular de eritroleucemia, K562, expresa solo una forma truncada de AFP sin el N-terminal. En el soporte de esta hipótesis, se realiza el PCR para la región de codificación entera AFP usando cebadores hAFP1 y hAFP4. Como se esperaba, el PCR de Hep3B y HepG2 ADNc mostró la única banda destacable de 2,1 Kb (columnas 3 y 6), mientras que no hubo banda en K562 (columna 9). Los controles son muestras sin ARN y una prueba derivado de la línea celular de fibroblasto embrionario de ratón (STO). Tampoco mostró ninguna banda detectable. Después, una serie de 5' cebadores de exón 2 a exón 6 se construyen para ver la diferencia entre forma auténtica y variante de hAFP ARNm. El resultado muestra que toda la región codificante excepto exón 1 se comparte en la forma variante de hAFP en K562. Las combinaciones de cebadores hAFP1 y hAFP4 para AFP RT-PCR humano que se adecúan para detectar expresión de ARNm AFP en linajes hepáticos, con las especies de ARNm AFP completas. El análisis RT-PCR usando esta combinación específica de cebadores puede eliminar la posibilidad de cualquier forma truncada expresada en células hepáticas o no hepáticas. Esta prueba se utiliza para identificar subpoblaciones específicas de células progenitoras de hígado o para dividir población hepática o hematopoyética población que comparten marcadores de superficie.

6.7. Procesamiento de hígados de donantes

[0150] Hígados cadavéricos: autopsia obtenida de hígados en tiempos diferentes pero preferiblemente dentro de al menos 24 horas, con un máximo de 30 horas. Los hígados se procesan usando una combinación de digestión enzimática y disociación mecánica, hígados fetales "cadavéricos" se preparan principalmente por disociación mecánica, mientras que los hígados adultos cadavéricos se disocian principalmente por digestión enzimática. Una descripción de cada proceso se proporciona más adelante. Ambos hígados adultos y fetales se digieren por longitudes variables de tiempo en un tampón enzimático que sirve para disolver las matrices extracelulares que unen las células juntas en un tejido. La enzima de colagenasas mezclada usada para aislamiento de células de hígado son preparación enzimática "Liberasa" de alta pureza fabricada por Boehringer-Mannheim, que consiste en una mezcla de colagenasa purificada y elastasa. Esta mezcla enzimática se usa en concentraciones mucho menores y con menos "efectos secundarios" deletéreos.

[0151] Solución enzimática: solución de colagenasa 60-70 mg/100 mls de tampón (colagenasa tipo IV de Sigma, catálogo #C5138 o tipo B de Worthington, catálogo # LS005273 ambos siendo preparaciones bacterianas enriquecidas con colagenasa pero con muchas impurezas enzimáticas) o Liberasa (preparación de colagenasa purificada / elastasa por Boehringer-Mannheim, catálogo 1814184) preparado en tampón P2 (ver debajo) y usado a 0,23 mg/ml.

[0152] Solución de lavado celular: RPMI 1640 (Gibco) complementado con insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), mezcla de ácido graso libre (ver debajo) unido 1:1 proporción molar para albúmina bovina purificada o de suero humano.

[0153] Mezcla de ácidos grasos libres: poblaciones de células inmaduras y células de hígado mayores dañadas, requieren lípidos para mantener y para sintetizar sus membranas. Aunque hepatocitos completamente maduros pueden sintetizar sus membranas de una única fuente de ácidos grasos (ácido linoleico) células parenquimales más jóvenes no pueden y requieren así una mezcla de muchos ácidos grasos diferentes para manejar sus requisitos lípidos. Proporcionamos una mezcla compleja que se une luego en una proporción molar 1:1 con una albúmina de suero bovino de albúmina altamente purificada o albúmina humana altamente purificada. En general, albúmina humana es preferible para evitar problemas relacionados con la "enfermedad de las vacas locas" o encefalopatía espongiforme bovina. Por consiguiente, una mezcla de ácidos grasos libres se usa a una concentración final de aproximadamente 7,6 µeq /L (7,6 µM) en los medios de cultivo celular.

[0154] Las soluciones madre se preparan de la siguiente manera, para un combinado total de 100 mM de ácidos grasos libres:

Palmítico 31,0 mM	oleico 13,4 mM
Palmitóico 2,8 mM	linoleico 35,6 mM
Esteárico 11,6 mM	linoléico 5,6 mM

Preparación de los componentes de ácidos grasos individuales:

[0155] Cada componente individual se disuelve en EtOH 100% de la siguiente manera:

Palmítico	1 M de materia prima, soluble en EtOH caliente
Palmitóico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH
Esteárico	151 mM de materia prima, soluble en EtOH calentado a 1 g / 21ml
Oleico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH

Linoleico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH
Linolénico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH

[0156] Estas materias primas individuales se mezclan luego para obtener la mezcla de 100mM de FFA. Partes alícuotas de los FFA individuales y la mezcla de FFA se realizaron con burbujeo de nitrógeno a través para reducir oxidación y aumentar estabilidad. Las materias primas se congelan a -20 °C.

[0157] Tampón de perfusión P1 -- tampón de perfusión libre de calcio y magnesio (pH 7.2) con concentraciones finales como se especifica para cada uno de los siguientes componentes: 11 S mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KPO₄, pH 7.4, 2,5 mM de NaHCO₃, 0,5 mM de EDTA, 5,5 mM de glucosa, 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA), ácido ascórbico (50 µg/ml), insulina (4 µg/ml), dexametasona (1 µM).

[0158] Tampón de perfusión P2 – medio Eagle modificado por Dulbecco o RPMI 1640 complementado con BSA 0,5%, ácido ascórbico (50 µg/ml), insulina (4 µg/ml) y dexametasona (1 µM).

[0159] DMEM -- medio Eagle modificado por Dulbecco (Dibco) con glucosa, piruvato de sodio y L-glutamina y además complementado con suero bovino fetal 5%, insulina (4 µg/ml) y dexametasona (1 µM). Medio Chee complementado con suplemento de cultivo ITS+TM (5 mls/500 mls) y dexametasona (0,1 µM). Percoll (Pharmacia) es diluido 9:1 con solución salina tamponada con fosfato 10X Dulbecco.

6.8. Experimentos de crioconservación

[0160] Los hígados usados para metodologías de crioconservación se derivan de donantes cadavéricos tan jóvenes como hígados fetales (edades de gestación 12 semanas a 25 semanas) y tan mayores como 77 años de edad. Un tampón crioconservante nuevo se usa de la siguiente manera: Viaspan (catálogo Dupont # 1000-46-06) complementado con 2% de suero humano (Gibco) o suero bovino fetal (Biowhittaker), crioconservante dimetilsulfóxido 10 % (catálogo Sigma #D5879 o D8779) usado exclusivamente para células parenquimales maduras o dimetilsulfóxido o glicerol (catálogo Sigma # G6279) usado para progenitores. El tampón se complementa además con antibióticos (penicilina a 200 U/ml; estreptomina a 100 µg/ml). El tampón se complementa posteriormente con hormonas y factores de crecimiento: insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), factor de crecimiento epidérmico (50 µg/ml), FGF (10 ng/ml), IGF II (10 ng/ml). El tampón se complementa posteriormente con lípidos: ácidos libres grasos (7,6 µM) unidos a albúmina de suero bovino (BSA) o albúmina de suero humano (HSA) y lipoproteína de densidad alta (10 µg/ml). El tampón se complementa además con elementos traza (selenio (10⁻⁹M), cobre (10⁻⁷M), zinc (5 X 10⁻¹¹M) y un antioxidante, AEOL 10112 (un antioxidante patentado, un forforina que es una superóxido-dismutasa mimética usada a 10 µg/ml), un producto preparado por AEOLUS, un subsidiario de Incara.

[0161] La variación en la composición, como se describe aquí, es combinar los nutrientes esenciales, lípidos, hormonas y factores de crecimiento que se identifican como parte de medios definidos hormonalmente sin suero confeccionados para células de hígado. El tampón novedoso produce viabilidades de las células de hígado para las fracciones F4 que son tan bajas como aproximadamente 10% o menos (de muestras muy pobres recogidas en el límite superior de tiempo de aproximadamente 30 horas post-mortem) hasta 80% (para muestras buenas recogidas en periodos de tiempo tempranos más cerca a una hora o por encima). Las viabilidades de las fracciones F1-F3 están consistentemente por encima de 40%, un hecho atribuido a estas fracciones que son células "más jóvenes" con estados de ploidía y actividad metabólica más propicias a síntesis de componentes de matriz extracelular y/o otros factores celulares necesitados para viabilidad y crecimiento; así, es más más probable que sea más fácil congelarlos. El uso de superóxido-dismutasa mimética en el tampón aumentó la viabilidad de las células en 5-10%.

[0162] Una alternativa a lo anterior es usar un tampón modificado en el que el Viaspan se elimina y el medio basal (tal como RPMI 1640) se complementa con insulina (5 µg/*l), transferrina (5 µg/ml), ácidos grasos libres (7,6 µM) unidos a BSA, lipoproteína de densidad alta (10 µLg/ml), elementos traza (selenio (10⁻⁹M), cobre (10⁻⁷M), zinc (5 X 10⁻¹¹M) y AEOL 10112. Revestir las células con una forma de matriz extracelular tal como colágeno tipo IV mezclado con laminina o colágeno tipo III mezclado con fibronectina.

[0163] Células de hígado fetal "cadavéricas", procesadas como se ha descrito anteriormente, se suspenden en el tampón de crioconservación, (anteriormente descrito) se dividen en partes alícuotas en crioviales 3 ml a 5-10 X 10⁶ células/ml y se mantienen bajo esa condición durante 1-2 horas. Las células se congelan luego a temperaturas de nitrógeno líquido de -160°C usando un congelador de índice de control informatizado (Forma Cryomed) y luego se almacenan en una fase de vapor grande, nitrógeno líquido (-160°C) tanque de almacenamiento. Células sobreviven al proceso bien y sin pérdida significativa de viabilidad se producen sobre períodos de almacenamiento que varía de 50-270 días (ver Figura 4).

[0164] El intervalo extremo de viabilidades de las fracciones F4 ambas después de tratamiento y después de refrigeración se deben a las longitudes variables de tiempo entre "tiempo de sujeción" y recepción de las muestras en el laboratorio y también a las condiciones variables del hígado, (fibrótico isquémico, etc.). En general, la fracción F4 es la más sensible a las variaciones de tratamiento de los hígados y la salud general del tejido. Notablemente, las fracciones F2 y F3 fueron viables rutinariamente y fácilmente crioconservadas incluso cuando se obtuvieron de muestras de hígado

pobre. Las fracciones F1 fueron más variables, con una gran cantidad de detrito, gotitas de grasa al igual que numerosas células pequeñas que incluyeron ambas pequeñas células parenquimales (asumidas para incluir progenitores hepáticos) y varias subpoblaciones hemopoyéticas (es decir, eritrocitos).

Tabla 7. Crioconservación: hígado fetal
Viabilidad media después de tratamiento: 75-85%

Viabilidad media después de tratamiento: equivalente a la de después del tratamiento

Tabla 8. Crioconservación: hígado adulto

Viabilidad (después de refrigeración)

F1-F3: >75% con buena fijación

F4: <60% con fijación pobre

6.9. Citometría de flujo

[0165] El siguiente método clasificador es opcional. Las células pasan en la hilera a través de una célula de flujo donde se exponen a luz láser. El próximo volumen de cada célula se determina por "dispersión hacia delante", o la cantidad de luz que se refracta mientras la barra se intersecta. Luz dispersada, "dispersión lateral" de estructuras internas celulares tales como el núcleo, retículo endoplasmático, cuerpos de Golgi, vesículas, etc., se utilizan para determinar la cantidad de complejidad interna (es decir, una célula activa y unas células más maduras contendrán más componentes internos que uno inerte o uno más joven). Información más selectiva en características celulares se obtiene por unión de antígenos altamente específicos característicos a complejos de proteína en la superficie celular. Estos anticuerpos pueden unirse de manera covalente a moléculas fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y conjugados en serie de PE y citocromo que se excita por las barras de láser, generando luz emitida a longitudes de onda específicas para cada fluoróforo. Por selección de un panel de cromóforos distintivos conjugados en anticuerpos específicos se seleccionan poblaciones de célula de interés.

[0166] Células se analizaron basadas en su entrada de parámetros. Una variedad de dispositivos de recogida se utilizan para recoger las células deseadas, incluyendo Eppendorf y tubos cónicos, y cualquier placa de tamaño multi-pocillo a la velocidad de hasta 40.000 eventos por segundo o mayor.

Tabla 9. Anticuerpos y reactivos usados en procedimientos de coloración

Anticuerpo	Proveedor, n° Cat,	n° lote
AFP anti-humano de cabra	Chemicon,	AB635, C4P168
X humano Thy monoclonal de ratón	Chemicon,	MAB1294,293CCD
Anti-humano de ratón monoclonal		
conjugado AFP-PE	Chromaprobe,	P41020, A45P7
Anti-cabra de ratón biotinilado	Vector Laboratories,	BA-5000,J0313
Anti-cabra de ratón biotinilado	Jackson Immunochemicals	200-152-096,25985
conjugado estreptavidina/AMCA,	Jackson Immunochemicals,	016-150-084,40001
Conjugado anti-oveja de burro AMCA,	Jackson Immunochemicals,	713-156-4732202
Conjugado anti-cabra de burro CY5,	Jackson Inimunochemicals,	705-156-147,38756
IgG de cabra,	Jackson Immunochemicals,	005-000-002, 38837
IgG de oveja	Jackson Immunochemicals,	013-000-002, 39945
albúmina antihumana de oveja,	Serotec,	ABP102,210498
anti-humano monoclonal de ratón:		
conjugado CD14/Tri Color	Pharmingen	
ICAM	Pharmingen	

conjugado CD34/FTTC	Pharmingen	34374X
conjugado CD38/PE	Pharmingen	31015X
conjugado CD38/FITC	Pharmingen	31014X
conjugado glicoforina A PE	Pharmingen	32591A
conjugado CD 45/PE	Pharmingen	31255X
conjugado CD 45/FITC	Pharmingen	31254X
Isotipo que controla IgG1 PE	Pharmingen	33815X
IgG2 FTTC	Pharmingen	33814X
conjugado Kit PE	Caltag	MHCK04
conjugado Ratón X Humano AFP-FITC	Accurate	
no conjugado AFP anti-humano de cabra	"	AXL625 061
7Amino actinomicina D (7AAD)	Mol Probes	A-1310,4981-1
Soluciones principales se usaron en preparaciones celulares para citometría de flujo		
BSA: albúmina de suero bovino (Pentex V)		
PBS = composición salina de fosfato tamponada;		
FBS = suero bovino fetal;		
AFP = alfa-fetoproteína		

Medio Eagle modificado por Dulbecco con hormonas: HC_DMEM

5 [0167]

500 mL de DMEM, alta glucosa sin rojo de fenol
 25 mL de suero bovino fetal (FBS)
 20 mL 5mM de EGTA
 10 Insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml)
 Elementos traza [selenio (10^{-5} M), cobre (10^{-7} M), zinc (5×10^{-11} M)]
 Antibióticos (Penicilina-100 µg/ml, estreptomycin-100 µg/ml)
 500 mg de albúmina de suero bovino (BSA) 30 mg de ADNsa
 38µl de solución de ácidos grasos libre unida a BSA.
 15 Filtrado estéril a través de una unidad de filtración Nalgene con poros 0,2 µm

Versión modificada de solución salina tamponada de Hanks: HBSS-mod

20 [0168]

50 mL de 10X HBSS
 10 mL de 1 MHepes
 Penicilina-100 µg/ml/Estreptomycin-100 µg/ml

25 500mg de BSA
 30 mg de ADNsa
 Completar hasta 400 mL
 pH a 7.3
 Máximo hasta 500 mL
 30 Filtro estéril a 0,2 µm

Tampón de bloqueo para inmunquímica

[0169]

100 mls de HBSS_mod
2,2 mL de gel de pescado de teleosteo 45% y
0,8g de BSA
0,5mL de saponina 1% en HBSS

Medio de montaje para microscopía de inmunofluorescencia

[0170]

0,5 mL de 2X PBS
0,25g de n-propil galato
5,7g de glicerol

6.10. Procedimientos para preparación de tejido de hígado congelado para citometría de flujo

[0171] Descongelar tejido de hígado congelado rápidamente a 37°C. Cada criovial de hígado (cada uno con aproximadamente 3 mL de tampón con $5-10 \times 10^6$ células/ml) se lleva hasta 10 mL a razón de 1 mL por min. en hielo con HC-DMEM. La muestra se centrifuga luego a 1200 r.p.m. durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se descarta, y el granulado de células se resuspende en 5 mL de HC-DMEM. El lavado de las células se repite hasta que el sobrenadante se vuelve claro. Luego las células se cuentan y las viabilidades se evalúan con un hemocitómetro que usa el ensayo de exclusión de tinte de azul de tripán. Las células se dividen en fracciones según el protocolo experimental. Tubos estándar se preparan para datos de control con entre 1 y 2×10^6 células, normalmente conseguidas tomando 200 μ L para cada de una suspensión celular de $5-10 \times 10^6$ /mL.

Los siguientes tubos estándar se necesitan:

1) OCS. Suspensión de célula original que consiste en células de control no manchadas.

2) FITC solo para ajustes de compensación.

Añadir 5 μ L de anti-glicoforina FITC-marcada a 200 μ L de suspensión celular.

Alternativo es un cóctel de CD34; CD38 y CD45, FITC-marcados 7 μ L de cada uno en 200 μ L de células.

3) PE solo para ajustes de compensación.

Usar una glicoforina-PE (2 μ L para 1 mL de HC_DMED y añadir 30 μ L de esta a 200 μ L de células).

4) 7AAD solo para compensación.

Una buena señal se genera por fijación de 200 μ L de suspensión celular con paraformaldehído 2% y luego añadiendo 5 μ L de 100 μ M de 7AAD y 5 μ L de detergente (saponina 1%) a un 1 mL de suspensión de estas células en HBSS-mod.

Las células permeabilizadas se manchan intensamente con 7AAD.

5) Cy5 solo para compensación de 200 μ L de células fijas (paraformaldehído 2%) se incuban durante 40 min en suero de cabra 2% para marcar las superficies celulares con oveja IgG. Las células se incuban luego con IgG de anti-cabra de burro conjugado Cy5 (1: 800) durante 40 min.

6) AMCA solo para compensación. Como con 7AAD, una señal artificialmente intensa se genera para ajustes de compensación. 200 μ L de células fijas (paraformaldehído 2%) se incuban durante 40 min en suero de oveja 2% para marcar las superficies celulares con IgG de oveja. Las células se incuban luego con IgG de anti-cabra de burro conjugado AMCA (1: 800) durante 90 min.

7) Controles AMCA/Cy5. Incubar células (paraformaldehído 2%) fijadas y (saponina 0,05%) permeabilizadas con LgG de anti-oveja de burro conjugado AMCA y IgG de anti-cabra de burro conjugado Cy5 durante 90 min.

8) Controles monoclonales isotipos. Incubar células con un conjugado IgG1 PE de ratón y un conjugado IgG2 FITC de ratón. Las concentraciones deberían corresponder con aquellas usadas para marcar tubos de analíticas y de clasificación.

9) Controles intracelulares isotipos. Incubar células (paraformaldehído 2%) fijadas y (saponina 0,05%) permeabilizadas con IgG de oveja no inmune y IgG de cabra durante 90 min como controles para anticuerpos usados para identificación de albúmina y alfa-fetoproteína. Continuar con incubación con IgG de anti-cabra de burro conjugado Cy5 y IgG de anti-oveja de burro conjugado AMCA durante 90 min.

[0172] Tubos de clasificación se preparan para la adquisición de poblaciones de células seleccionadas que expresan combinaciones particulares de marcadores CD. Normalmente estos tubos contienen $50-70 \times 10^6$ células. Las células se resuspenden en 1 mL de tampón de coloración compuesto de HC_DMED + BSA 1% + 500 pM de 7AAD (5 μ L de 100 μ M de materia prima). Entre 15 y 25 μ L de cada uno de CD 34 FITC, CD38 PE, o CD 45 PE se agregan al tampón de coloración según números celulares (normalmente 3 μ L de Pharmingen de anticuerpos por 10×10^6 células). Anticuerpo para c-Kit se añade a una dilución 1:60, glicoforina A se usa en una dilución 1:500. Manchar durante 40 min en hielo a oscuras. Después de la coloración, lavar las células dos veces con HBSS-mod y fijarlas con paraformaldehído 2% en PBS durante 30 min en hielo.

6.11. Coloración intracelular para selección celular

[0173] Para coloración intracelular de células para análisis de alfa-fetoproteína (AFP) por citometría de flujo la suspensión celular se permeabiliza con una solución de saponina (Sigma S4521) 0,05% en HBSS_mod durante 10 min en hielo. Las células se bloquean luego en una solución de HBSS mod con gel de pescado de teleosteo 1% y BS 0,8% y saponina 0,005% durante 20 min, seguido de incubación con anti-humano de cabra AFP y albúmina anti-humana de oveja (ambos 1:800 en el tampón de bloqueo) durante 90 min a temperatura ambiente a oscuras. Las células se lavan dos veces con HBSS_mod con saponina 0,01% seguido de incubación con IgG de anti-cabra de burro conjugado Cy5 y IgG de anti-oveja de burro conjugado AMCA durante 90 min.

[0174] Alternativamente, después del anticuerpo primario, las células se incuban con IgG de anti-cabra de conejo biotinilado (1: 500 en el tampón de bloqueo con suero humano 2% y saponina 0,01% durante 90 min a temperatura ambiente a oscuras). Esto se sigue de 2 lavados con HBSS_mod con saponina 0,01% y luego incubación con 9 µg/mL de conjugado de estreptavidina/Cy5 en saponina 0,01% / HBSS-mod durante 90 minutos a temperatura ambiente a oscuras. Finalmente, las células se lavan 2 veces con HBSS-mod y se resuspenden en HBSS-mod, se filtran a través de una criba 50 µm para eliminar acumulaciones de células para análisis y selección en el citómetro de flujo.

[0175] Si selección de progenitores hepáticos se pretende, la inmunoselección incluye eliminación de células que son poliploides y/o expresan marcadores asociados a células hemopoyéticas maduras del hígado tales como glicoforina A en glóbulos rojos. Adicionalmente, células que muestran CD45, que se expresa en todas las células hemapoyéticas maduras; células que muestran marcadores asociados con células hepáticas maduras tales como connexin 32, que se encuentra en todos los hepatocitos y células biliares; y células que expresan marcadores asociados a células mesenquimales maduras, tales como retinoides en células hepáticas estrelladas o factor de von Willebrand o factor 8 en endotelios, se quitan todos.

6.12. Coloración inmunohistoquímica de poblaciones de células clasificadas

[0176] Células se manchan para alfa-fetoproteína después de análisis y selección por el citómetro de flujo. Las fracciones de célula sclassificadas se recogen en HBSS-mod 0,3% con BSA 1%. Al regresar al laboratorio, el volumen de muestras recogidas se ajusta para proporcionar 0.5×10^6 células/ml y 200 µL de partes alícuotas se centrifugan sobre portaobjetos de microscopio con un aparato Shandon Cytospin. Las preparaciones cytopspin se secan al aire y se almacenan para coloración más tarde para alfa-fetoproteína y/o albúmina. El "disco" de célula fijada del portaobjetos del microscopio se rodea con una barrera de caucho para producir un "pocillo" para aplicación de reactivos inmunohistoquímicos. Los portaobjetos se mojan en tampón tris ("bajo en sal" 10 mM de Tris con NaCl 0,9% a pH 7.4) con Tritón X 0,3% durante 10 min, seguido de 10 min en Tris "bajo en sal" solo.

[0177] Las células se bloquean luego en 10% de suero de conejo contenido en una solución de bloqueo de gel de teleosteo anteriormente descrito durante 90 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados en Tris "bajo en sal", las células se incuban durante toda la noche a 4 grados C con anticuerpo AFP anti-humano de cabra diluido a 1:100 en el tampón de bloqueo con suero de conejo 2%. Dos lavados en tampón Tris son seguidos luego de una incubación de 90 min con IgG anti-cabra de conejo biotinilado (1:200) en el tampón de bloqueo a temperatura ambiente. Incubación final con complejo de estreptavidina/AMCA (9 µg/mL en el tampón Tris "bajo en sal") se utiliza para localizar inmunoreactividad tipo AFP a través de la unión de fluorocromo AMCA con el anticuerpo de conejo biotinilado. Después de 2 lavados con tampón Tris, a las preparaciones celulares se les permite acercarse a sequedad antes de cubrirlas bajo un medio de montaje antidesvanecimiento (0,25g de n-propil galato en 5,7g de glicerol con 1 mL de PBS). Cuando células apropiadas son doble manchadas para albúmina mediante la inclusión de un anticuerpo anti humano de conejo conjugado de rojo de Texas contra la albúmina con el anticuerpo de anti-fetoproteína primario.

[0178] Portaobjetos de control se preparan por omisión del anticuerpo primario o del secundario para no mostrar ningún etiquetado AMCA de células en ausencia del anti anticuerpo de anti alfa proteína o el anticuerpo secundario biotinilado. Los portaobjetos se inspeccionan con microscopia de epifluorescencia usando excitación UV del tinte AMCA que emite luz en la región (450 nm) azul.

6.13. Regeneración de hígado mediante terapia celular y/o genética

[0179] Esta invención tiene aplicación práctica inmediata para tratar enfermedades tales como síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Dubin-Johnson, tirosinemia, cirrosis, fibrosis, hígado graso, hepatitis, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica, hepatocolangitis, hepatomalacia, hepatomegalia, hepatocarcinoma, hepatoblastoma, o combinación de estos. Otras enfermedades de hígado de este ejemplo y otros ejemplos pertinentes de enfermedades de hígado son igualmente elegibles como candidatos para la presente terapia e incluyen síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, enfermedad Byler, cánceres tales como carcinoma de conducto biliar extrahepático y carcinoma hepatocelular, enfermedad de Caroli, galactosemia, síndrome de Gilbert, enfermedad de almacenamiento de glicógeno i, hemangioma, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis E, hepatitis G, trasplante de hígado, porfiria cutánea tardía, cirrosis primaria biliar, protoporfiria, eritrohepático, síndrome de Rotor, colangitis esclerosante y enfermedad de Wilson. Enfermedades genéticas innatas del hígado son también corregibles. Por

ejemplo, la enfermedad genética de fenilcetonuria (PKU) es causada por una incapacidad del bebé para usar el aminoácido fenilalanina. Si no se trata pronto, PKU conduce a daño cerebral y nervioso y retraso mental. Una dieta baja en proteínas especial que comienza en las primeras semanas de vida es el único tratamiento disponible actualmente. Ejemplos de otros genes diana y sus enfermedades de hígado relacionadas que son susceptibles a esta forma de terapia incluyen, pero de forma no limitativa, el gen receptor LDL en hipercolesterolemia familiar, los genes de factor de coagulación para factores VIII y IX en hemofilia, el gen de alfa-1-antitripsina en efisema, el gen de fenilalanina hidroxilasa en fenilcetonuria, el gen de ornitina-carbamoiltransferasa en hiperamonemia, y genes de proteína de complemento en varias formas de deficiencias de complemento.

[0180] Ya que activador plasminógeno de uroquinasa humano (uPA) puede activar plasminógeno a través de especies de un vector recombinante adenoviral que expresa uroquinasa humana del promotor RSV-LTR, Ad-RSV-uPA se construye con el objetivo de inducir regeneración de hígado. Este gen se selecciona solo a modo de ilustración como cualquier otro gen de interés es igualmente adecuado incluyendo, pero limitado a, carbamoil sintetasa I, ornitina-carbamoiltransferasa, argininosuccinato-sintasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetoacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, receptor de lipoproteína de densidad baja, hidroximetilbilano-sintasa, factor VIII, factor IXa, cistationa beta-sintasa, decarboxilasa de cetoácido de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-CoA-deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metílico malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, transferrina, beta-glucosidasa, piruvato-carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa-cinasa, glicina-deshidrogenasa, proteína H, proteína T, proteína de la enfermedad de Menkes, el producto del gen de la enfermedad del Wilson pWD y/o CFTR.

[0181] Para construcción y producción de los vectores recombinantes adenovirales, el ADNc para uPA humano se prepara de la siguiente manera. El fragmento 1,326 kb HindIII/Asp718 uPA que contiene la secuencia codificante de proteína se inserta en los sitios Hind111/Asp718 de pXCJL.1 bajo el control transcripcional del promotor del virus del Sarcoma de Rous LTR (RSV), y upstream de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Un experto en la técnica puede seleccionar promotor específico de célula de hígado tales como promotores de hepatitis B, promotores de hepatitis A, promotores de hepatitis C, promotores de albúmina, promotores de alfa-1-antitripsina, promotores de piruvato-cinasa, promotores de fosfoenol piruvato carboxiquinasa, promotores de transferrina, promotores de transtiretina, promotores de alfa-fetoproteína, promotores de alfa-fibrinógeno y promotores de beta-fibrinógeno entre muchos otros promotores adecuados.

[0182] El virus se prepara después de co-transfección con pJMI7 y el vector designado Ad-RSV-uPA. La selección para Ad-RSV-uPA se realiza por amplificación de placas individuales en 293 células. Tres días después de la infección, el sobrenadante se evalúa para uPA reactivo inmunológico por ELISA y actividad fibrinolítica por ensayo de placa de fibrina que demuestra la actividad catalítica de uPA producido sobre infección de Ad-RSVuPA. El virus purificado se almacena en partes alícuotas a -80 °C y se diluye frescamente con medios HgDMEM antes de la inyección. Los títulos víricos se determinan por mediciones OD y ensayo de placa estándar. La construcción de los vectores se realiza esencialmente como se describe en la patente US nº 5,980,886. Los virus se concentran en células 208F.

[0183] Los ratones C57BL/6 hembra de edades de 5 a 6 semanas (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) se alojan en un entorno libre de patógeno específico. Muestras de hígado isquémico a varios períodos de tiempo se obtienen de ratones eutanasiados y progenitores de hígado se aíslan como se describe anteriormente. Para canulación de vena porta, ratones receptores se anestesian por una administración intraperitoneal de 0,5 ml de 20 mg/ml de 2,2,2-tribromoetanol. Una incisión abdominal de línea media se realiza y la piel se separa del peritoneo para crear una bolsa subcutánea. El peritoneo se abre y se expone la vena porta. Un tubo de silicona (0.02" I.D., 0.037" O.D., S/P Medical Grade, Baxter, Ill.) se inserta en la vena porta y se perfunde con solución salina heparinizada. Luego, en la cánula se abre un túnel a través del peritoneo y se fija con una sutura de seda 4,0. La cánula de 3cm de longitud se ata al extremo distal y se coloca subcutáneamente en la bolsa previamente creado. A los ratones se les dan las células progenitoras infectadas por virus no antes de 24 hrs más tarde. En algunos ratones la canulación de vena porta se realiza junto con un 2/3 hepatectomía. La hepatectomía parcial se realiza luego. Para perfundir la vena porta, los ratones se anestesian, la piel se abre en el sitio proximal de la incisión abdominal ya existente. La cánula se expone y conecta a una bomba de jeringa. Para infusión de virus, las preparaciones de adenovirus en DMEM se inyectan sobre 5 a 10 min en la vena porta a través de la cánula. Para los fines de terapia celular, cualquier población celular se usa como un material alogénico o autólogo y se trasplanta a o en la proximidad de un órgano de objetivo específico de un paciente tal como un caso en este ejemplo. Células se pueden trasplantar en cualquier medio, portador o diluyente, o cualquier tipo de sistemas de entrega de fármacos adecuados, incluyendo microsoportes, microesferas, microsomas, microesferas, vesículas, etcétera.

[0184] Todos los análisis histológicos y bioquímicos se realizan después de inyección de progenitores infectados por adenovirus hepáticos en la vena porta a través de la cánula. El ensayo de ELISA para uPA se basa en dos anticuerpos monoclonales diferentes dirigidos contra el dominio catalítico y dominio de unión de receptor de uPA. Uno de los anticuerpos monoclonales se marca con peroxidasa. Proteína de suero y albúmina se analizan por métodos automatizados de rutina en los laboratorios de ciencias de laboratorio clínico. La instilación de adenovirus en la vena porta de ratones C57BI/6 se conoce por suponer transducción de 100% de hepatocitos con más de 1 copia de ADN adenoviral por célula. La misma dosis de Ad-RSV-uPA produce 90% de mortalidad que al menos en parte se relacionó con hemorragia. Cuando se usa dosis inferior de Ad-RSV-uPA, el índice de mortalidad es inferior a 5% y esta dosis se

selecciona para los experimentos de regeneración de hígado. La instilación de Ad-RSV-uPA da lugar a elevaciones transitorias de uroquinasa de suero que alcanza un valor máximo de aproximadamente 350 ng/ml (70 a 100 veces superior que niveles endógenos) cuatro días más tarde antes de caer a concentraciones de fondo el día 12. El aumento en uPA se asocia también a un aumento en las concentraciones de SGPT de suero. A tiempos variables después de la instilación de adenovirus, a los animales se instila ³H-timidina, y la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN de hígado se determina como unos medios para cuantificar la proliferación celular. Los animales tratados con Ad-RSV-uPA tienen un periodo aumentado de comprensión de timidina que empieza el día 3 y persiste durante 8 días. Así, el periodo de absorción de ³H-timidina hepático con tratamiento de células de Ad-RSV-uPA-oval es mucho mayor del que obtenido con hepatectomía parcial solo. Los receptores del adenovirus de control negativo muestran valor máximo de absorción de ³H-timidina hepática en el día 4 que vuelve a niveles de línea base 24 h más tarde y un mínimo aumento en absorción de ³H-timidina en el día 11. En resumen, la reacción hepática como medida por niveles de SGPT e índices altos de absorción de ³H-timidina se atribuyen a producción de uroquinasa intrahepática indicando que ocurre regeneración biosintética de hígado significativa. Células hepáticas progenitoras infundidas sin uPA son mejores que adenovirus sin inserto uPA.

[0185] Conclusiones microscópicas histológicas de animales tratados con adenovirus/progenitores recombinantes derivados de donantes de cadáveres de corazón parado indican que ratones tratados el día 3 tienen un infiltrado inflamatorio moderado que contiene macrófagos y neutrófilos. Cambios degenerativos en hepatocitos incluyen vacuolización, picnótico y pocos núcleos mitóticos. De ocho a 10 días después de administración de células Ad-RSV-uPA-oval hay evidencia de recuperación hepática que incluye la presencia de regeneración multifocal, tamaño heterogéneo de núcleos y una reacción inflamatoria muy disminuida con poca degeneración de hepatocitos. Durante tres a cuatro semanas, el infiltrado se resuelve y el hígado aparece normal.

[0186] En total, estos estudios demuestran que expresión de uroquinasa en combinación con progenitores hepáticos indujeron regeneración significativa de célula parenquimal de hígado.

6.14. Biorreactor

[0187] Un biorreactor de alto rendimiento (HPBR) se emplea para cultivar progenitores de hepatocito humano aislado de un donante de cadáver. Este proceso proporcionará un gran número de células útiles para otros fines médicos o biorreactor por sí mismo sirve como una unidad de producción para proteínas segregadas por células biológicamente útiles y factores que puede incluir, pero de forma no limitativa, factor de crecimiento de hepatocito (HGF), factor de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I y II), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de transformación tipo a y tipo b (TGF-beta y TGF-alfa), factor de crecimiento de nervio (NGF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de sarcoma (SGF), factor de crecimiento estimulador de colonias macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), prolactina y factor de liberación de hormona de crecimiento (GHRF) y varios factores de crecimiento hemapoyéticos tales como interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, etc., factor de diferenciación eritroide (EDF) o proteína de liberación de folitropina (FRP), inhibina, factor de proliferación de células madre (SCPF) y fragmentos activos, subunidades, derivados y combinaciones de estas proteínas entre muchos otros conocidos en la técnica. Generalmente, como se utiliza en este caso, estos factores celulares se refieren a una proteína segregada que se selecciona a partir del grupo que consiste en una citocina, una linfoquina, una interleucina, un factor estimulador de colonias, una hormona, un factor quimiotáctico, un factor anti-quimiotáctico, un factor de coagulación, una proteína trombolítica, una proteína de complemento, una enzima, una inmunoglobulina y un antígeno. Entre tales proteínas biológicamente activas un experto en la técnica puede seleccionar Factor VIII, factor IXa, factor VII, receptor IL-2 y sus antagonistas, superóxido-dismutasa, modificadores de respuesta inmunitaria, hormona paratiroidea, los interferones (IFN alfa, beta, o gama), factores de crecimiento de nervio, glucocerebrosidasa, factor estimulador de colonias, interleucinas (IL) 1 a 15, factor estimulador de colonias de granulocito (g-CSF), granulocito, factor estimulador de colonias macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias macrófagos (m-CSF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), adenosina-desaminasa, factores de crecimiento de tipo insulina (IGF-1 y IGF-2), promoción de megacariocito ligando (MPL), trombopoyetina, o combinaciones de estos.

[0188] Sin limitación para este protocolo particular de células de crecimiento en un biorreactor, son igualmente adecuados otros procedimientos bien conocidos en la técnica y pueden adoptarse fácilmente de las patentes publicadas US nº 6,001,585; 5,998,184; 5,846,817; 5,622,857; 5,571,720; 5,563,068; 5,512,474; 5,443,985; 5,342,781; 5,330,915; 5,320,963; 5,202,254; 4,833,083 y 4,760,028 .

[0189] El presente dispositivo contiene fibras de polipropileno 540 de fibras celulósicas 450 10 kD y detalles en otros parámetros se encuentran por ejemplo en la patente US nº 5,622,857 incorporada aquí a modo de referencia. Las células se aíslan como se describe anteriormente. Todos los materiales necesarios se obtienen de o bien Sigma Chemical Co. o Life Technologies. Los medios de fijación para medios de cultivo a largo plazo son como sigue: RPMI 1640 (500 mL); 50 mL (10%) FBS; 4 mM de l-glutamina; 1x penicilina/estreptomycin; gentamicina; 15 mM de HEPES; 10 mU/mL de insulina; 10 mU/mL de transferrina; selenio; el sistema HPBr se enjuaga con medios durante un día antes de que fijación medios se aplique. 500 mg de microsoportes Citodex 3 preaumentados se inoculan en el espacio interno anular del HPBr. Las fibras oxigenadoras acunaron los microsoportes y evitaron que estos se distribuyeran en todo el

ECS. Progenitores de hepatocito humano viables son también inoculados en el espacio interno anular, y el dispositivo se sacude y se rota a mano para conseguir la mezcla uniforme de células y microsoportes. Asumiendo que los hepatocitos están entre 10-20 μm de diámetro, la proporción de célula-a-microsoporte inoculada es aproximadamente 500. La viscosidad aparente de células y microsoportes aumenta rápidamente, indicando que célula-a-microsoporte y conexiones de célula-a-célula proceden rápida y normalmente. Dentro de 2-3 minutos de esta mezcla, un gel específico de células y microsoportes se forma en el espacio interno anular. Después de una incubación durante toda la noche a 37 °C en los medios de fijación (en una posición fija), los medios se cambian a medios de cultivo a largo plazo (2 L). Estos volúmenes no están limitando de ninguna manera, ya que un experto en la técnica puede escalar fácilmente la producción al nivel deseado. Los hepatocitos se cultivan durante 5 semanas, con medios frescos aplicados al sistema semanalmente. La función metabólica de las células se monitorea por análisis de muestras diarias. Después de 5 semanas, >90% de recuperación de células viables y microsoportes se consigue por el siguiente procedimiento: colagenasa 0,1% en PBS mezclado con 0,44 mL (0,23 M) de EDTA se utilizan para enjuagar el ECS y el HPBr se incuban durante 10 minutos; el contenido del ECS se expulsa con aire estéril de un tambor de reloj de jeringa; este proceso se repite con medios de cultivo a largo plazo y los materiales recogidos se lavan y se separan.

[0190] El HPBr es igualmente apto en el cultivo y transformación genética de células (p. ej., expresión de gen HGF). Lo siguiente es un protocolo genético no vírico para anclaje de células dependientes (p. ej., SW 480 P3 ATCC #CCL228), que puede modificarse apropiadamente y optimizarse de procedimientos publicados usando pocillos y placas de cultivo, por aquellos expertos en la técnica. Fibra media con propiedades 10 kD se prefiere en el HPBr. El biorreactor se acciona casi de la misma manera como se describe anteriormente. Microsoporte Cytodex 1 (Pharmacia, vSigma Chemical Co.) se usan ampliamente para cultivo de células dependientes de anclaje. Un intervalo ancho de densidades celulares se puede inocular en el ECS del HPBr, que varía de: 1×10^4 a 1×10^{15} células o más según se desee. La proporción de célula-a-microsoporte inoculada recomendada está en el intervalo de aproximadamente 10, aunque un experto en la técnica pueden modificar esto según desee. El dispositivo se rota suavemente en todo el experimento a aproximadamente 10 cpm (o más). Después del cultivo de las células durante aproximadamente un día (o más, dependiendo de la célula específica), confluencia óptima se logra para obtener transfección eficaz. La proporción de inoculación de célula-a-microsoporte es ajustable para impactar positivamente este marco de tiempo para eficiencia económica y terapéutica. En el día de la transfección, se prepara la solución de plásmido de ADN (por ejemplo, pCMV), y solución de lípido catiónico (p. ej., reactivo LIPOFECTIN, Life Technologies). Estos reactivos en su mayoría están libres de suero, incluso aunque el proceso total requiera la presencia de suero. Cantidades apropiadas de mezcla de ADN y soluciones lípidas, luego se inyectan en la mezcla en el ECS del dispositivo. Después de aproximadamente unas (o incluso varias) horas de transfección, se reanuda el uso de suero, si adecuado, y se continúa para cultivar células como antes durante aproximadamente unos días. Periodos más largos se pueden usar cuando se expanden células transformadas permanentemente. La recogida de células de modo similar al descrito previamente.

6.15. Hígado artificial

[0191] Como una extensión de ejemplo de arriba, un experto en la técnica puede fácilmente adoptar el biorreactor como un sistema de soporte extracorpóreo hepático. La xenotransplantación (el trasplante de órganos entre especies) puede ayudar a aliviar la escasez de hígados donantes usando órganos animales. Un peligro potencial de trasplante de órganos animales en seres humanos, no obstante, es que el virus que ha infectado a los animales donantes pueden infectar a los receptores. Como los receptores de trasplante de órganos estarían tomando fármacos para suprimir el sistema inmunológico y prevenir rechazo de órgano, pueden ser incapaces de luchar contra la infección del virus animal. Alternativamente, el virus animal puede mutar en una forma que puede infectar contactos humanos con sistemas inmunológicos normales. Como resultado, un nuevo virus humano patógeno puede surgir. Un sistema de soporte extracorpóreo hepático supera estos inconvenientes. Especies de animales favoritas para trasplante humano de órganos son el cerdo y primates. Sin embargo, está claro que si un hígado artificial de célula humana está disponible, es preferible a hígados animales.

[0192] Después de tiempo deseado en el cultivo madurado, se obtienen hepatocitos derivados de progenitores de hígado cadavéricos. Rutinariamente se obtienen de 2 a 5 billones células de viabilidad alta (por encima de 80%). En general, el medio de cultivo usado es el medio Waymouth complementado con hormonas. Para alojar 2 a 5 billones células, el biorreactor se escala hasta dos vasos de contenido, cada uno con un diámetro interno de 40 mm y una altura de 100 mm. En particular, se usan estas microesferas de vidrio de aproximadamente 2 mm de diámetro y un volumen total de 250 ml por vaso de contenido. Medio se suministra a un índice de reciclaje de 360 ml/min. La alta viabilidad de los hepatocitos se resalta por el índice de consumo de oxígeno estable. El biorreactor se fija luego a un receptor humano hepático cuyo hígado se quita por cirugía debido a insuficiencia hepática total. Alternativamente, el hígado no se quita, pero el biorreactor de instante quitado ayudará a mejor recuperación de hígado disfuncional.

[0193] Un experto en la materia conocerá los procedimientos para fijar del biorreactor como un sistema de soporte extracorpóreo hepático o conocerá medios alternativos conocidos en la técnica tales como se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 6,008,049; 5,981,211; 5,976,870; 5,891,713; 5,827,729; 5,643,794; 5,622,857; 5,605,835 y 5,270,192. Es evidente a partir de tales referencias que células de hígado donante artificial no se limitan necesariamente a especies humanas y el uso de especies de cruce de tales células es ahora posible. Por ejemplo, células de hígado de cerdos o primates son igualmente adecuadas para uso humano.

[0194] Sangre de la arteria femoral izquierda se dirige en un hemoconcentrador Minntech. Una cánula de elecath 12 se inserta en la arteria femoral y se conecta a un tubo 1/4" de PVC al hemoconcentrador. El hemoconcentrador separa la sangre en una fracción ultrafiltrada sin células y una fracción de célula de sangre. La fracción de célula sanguínea se retorna a la vena femoral vía un tubo similar. El ultrafiltrado sale del hemoconcentrador vía un tubo 1/4" de PVC y se introduce en el sistema biorreactor de hepatocito con la velocidad de flujo ajustada a 40 ml/min. usando una bomba rotativa. Después de perfusión a través del biorreactor, el ultrafiltrado se retorna al paciente vía la vena yugular izquierda. Para demostrar la provisión de metabolismo extracorpóreo hepático, dos productos químicos diferentes conocidos por ser metabolizados por el hígado, 7-etoxicumarina y lidocaína, se administran en el ultrafiltrado en la entrada del biorreactor. Los metabolitos respectivos, 7-OH-coumarina y monoetilglicinaxilidida (MEGX), se miden en las salidas de los biorreactores antes de que el ultrafiltrado se retorne al paciente. Se observa metabolismo significativo de tanto 7-etoxicumarina como lidocaína. Los resultados, por lo tanto, demuestran la aplicación del biorreactor como un sistema de soporte, proporcionando metabolismo extracorpóreo hepático. La separación de los glóbulos rojos del plasma minimiza la reacción inmunológica del receptor a los hepatocitos extranjeros. Hepatocitos de donantes humanos como en nuestras células de hígado de ejemplo obtenidas de cadáveres y no humanas, fuentes tales como cerdo, son así útiles en el biorreactor para proporcionar soporte hepático extracorpóreo.

6.16. Células cadavéricas de progenitor distintas de células de hígado

[0195] Esta invención también se refiere a métodos de obtención de poblaciones de célula enriquecidas con células progenitoras de tejidos distintos de hígado. Ejemplos de tales tejidos incluyen, pero de forma no limitativa, glándula suprarrenal, vaso sanguíneo, médula ósea, córnea, islotes de Langerhans, conducto biliar, lente, pulmón, riñón, corazón, intestino, ovario, páncreas, paratiroides, pineal, glándula pituitaria, piel, testículo, vejiga, cerebro, médula espinal, timo, o tiroides.

[0196] Los siguientes ejemplos se proveen como una estrategia general que se puede modificar según necesidades particulares pero sin alterar el alcance y espíritu de la invención. En una forma de realización ejemplar, se proveen las presentes células progenitoras que son útiles para pacientes que padecen cualquier trastorno de deficiencia de insulina.

[0197] Se usan en estos estudios tanto cadáveres no fetales como fetales. Después de la exanguinación, el conducto biliar común (CBD) se identifica *in situ*, se quita y se coloca en una solución de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). El tejido acinar pancreático asociado e islote, al igual que los vasos sanguíneos fijados, se quitan luego por disección con fórceps. El CBD, con sus derivaciones asociadas, los conductos principales pancreáticos, se cortan luego transversalmente en aproximadamente 300 μ m explantes de micro-órgano largos o células dispersadas individualmente únicas. Estos especímenes se cultivan luego en DMEM con la adición de factores de crecimiento, bien en la presencia o ausencia de colágeno tipo 1 o matrigel, como sustrato de crecimiento. La eficacia de los factores de crecimiento en estimulación de la proliferación se juzga por la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN por la respuesta de las células. Anticuerpos para BrdU se utilizan para visualizar y caracterizar las respuestas a corto plazo (24-48 hr). La respuesta a largo plazo se juzga por la capacidad de estas poblaciones de células para crecer y expandirse en el cultivo celular como resultado de la adición del factor de crecimiento específico. Tres factores de crecimiento diferentes (EGF, TGF- α y bFGF) se usan para diferenciar células progenitoras a concentraciones 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml. La activación de proliferación como se evalúa por etiquetación BrdU ocurrió con administración de 10 ng/ml de factor de crecimiento EGF dentro de una extensión de 24 hr. No hay ninguna diferencia observada entre 10 y 100 ng/ml de dosis. La adición de EGF a los explantes de tejido CBD producen proliferación de células diferentes y el agrupamiento de estas células. Experimentos de crecimiento preliminares a largo plazo indican que no existe un potencial proliferativo grande en el tejido cadavérico CBD que se pueda mantener en el cultivo durante al menos 21 días.

6.17. Células progenitoras para tratar enfermedades del hígado

[0198] D-galactosamina es un compuesto capaz de inducir herida que es similar a la lesión de hepatitis vírica en seres humanos, y se utiliza para inducir un modelo de hepatitis. El tetracloruro de carbono genera radicales libres con una reactividad muy alta por la acción del fármaco metabolizando sistemas enzimáticos en las células del hígado, y estos radicales libres pueden deprimir fuertemente la actividad celular por combinación con proteína de las membranas de células del hígado o pueden causar peroxidación de lípidos de la membrana de los orgánulos, llevando así a necrosis de células de hígado y acumulación de grasas en el hígado. Por consiguiente, estos compuestos se usan mucho como modelos de prueba de hepatitis aguda inducida por fármacos en seres humanos, por ejemplo, hígado graso, hepatitis crónica y cirrosis hepática.

[0199] Por lo tanto, en este ejemplo, los presentes inventores llevan a cabo pruebas según el método proporcionado en detalle en la patente US n1 4,898,890 para confirmar la eficacia de células progenitoras cadavéricas según la presente invención. Ratas de cepa Wistar mach pesando cada una 180 a 200 g se inyectan intraperitonealmente con 250 mg por kilogramo de peso corporal de d-galactosamina disuelta en 5 ml por kilogramo de peso corporal de soluciones salinas fisiológicas. El suero de las muestras de sangre se examina por medición glutámico-oxaloacético-transaminasa (GOT), glutámico- piruvico-transaminasa (GPT), y ALP por un analizador automático. Un grupo de control de placebo con herida de hígado inducida se trata en exactamente la misma manera como aquel grupo en el que aproximadamente $1-5 \times 10^4-10^7$ células cadavéricas progenitoras de hígado se administran directamente en el hígado deteriorado excepto que

ratas en el grupo de placebo se administran con una solución de placebo de medio en lugar de las suspensiones de células progenitoras. En otra serie de experimentos, los hígados de ratas se deterioran con tetracloruro de carbono en su lugar. Los animales con heridas de hígado inducidas muestran el aumento obvio en GOT, GPT y ALP cuando se comparan con un grupo de control no deteriorado. Las ratas que se tratan con células progenitoras demuestran supresión marcada de aumento en GOT, GPT y ALP, cuando se compara con el control con herida de hígado inducida no tratado con progenitores hepáticos. Los resultados muestran que células progenitoras suprimen o incluso invierten y ciertamente protegen de d-galactosamina y herida inducida por el tetracloruro de carbono al hígado.

[0200] Una niña de 11 años que presentaba una enfermedad hepática, hiperbilirrubinemia, que causa exceso de cantidades de bilirrubina, una sustancia producida por el hígado, para acumular en ella sangre tiene que pasar de 12 a 15 horas al día bajo luces ultravioleta como tratamiento, un proceso llamado fototerapia. Después del trasplante de célula hepática de un donante cadáver directamente en el hígado (vena porta), sus niveles de bilirrubina se nota que han bajado espectacularmente, y ahora ella está funcionando aunque todavía tiene que pasar aproximadamente de cuatro a seis horas en fototerapia.

[0201] Así, esta aplicación de progenitores cadavéricos hepáticos es útil en la prevención y terapia de malfuncionamiento de hígado y herida incluyendo, pero no limitado a, hepatitis vírica, hígado graso, hepatitis crónica, fibrosis y cirrosis hepática. Está también claro que el presente método permite prevenir y/o tratar la disfunción metabólica del hígado y/o herida provocada por otra causa tal como quimioterapia, o abuso de fármacos, o abuso de alcohol, por ejemplo. Hay muchos fármacos y sustancias que poseen la tendencia de causar herida en el hígado y estas comprenden, sin limitación, analgésicos, antipiréticos, fármacos anti-inflamatorios y fármacos anti-reumáticos tales como acetaminofén, aspirina, fenilbutazona, sulindac, ibufenaco, compuestos de oro, etc. Antibióticos: aminoglicósidos, polipéptidos, cefalosporinas, penicilinas, tetraciclina, etc. Agentes quimioterapéuticos: sulfa fármacos, isoniazidas, etc. Fármacos anti-cáncer: mitomicina C, cis-platino, 6-MP, nitrosoureas, etc. Anestésicos: halotano, metoxiflurano, etc. Fármacos psicotrópicos: clorpromazinas, diazepam, barbitol, etc. Diuréticos: tiazidas, etc.

[0202] Estas y otras aplicaciones útiles son obvias para los expertos en la técnica. Los ejemplos específicos de enfermedades del hígado previsto incluyen, pero de forma no limitativa, síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, atresia biliar, ductopenia biliar, fallo de médula ósea, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad de Byler, síndrome de Crigler-Najjar, enfermedad de Caroli, prurito colestático, colestitis, hiperbilirrubinemia conjugada, enfermedad crónica de injerto contra-huésped, enfermedad hepática criptogénica, diabetes, síndrome de Dubin-Johnson, protoporfiria eritrohepática, carcinoma de conducto biliar extrahepático, hipercolesterolemia familiar, galactosemia, síndrome de Gilbert, enfermedad de almacenamiento de glicógeno, hemangioma, hemocromatosis, encefalopatía hepática, hepatocolangitis, hepatomalacia, hepatomegalia, hepatocarcinoma, hepatoblastoma, hemocromatosis hereditaria, ictericia, colestasis intrahepática, quistes de hígado, trasplante de hígado, insuficiencia hepática asociada a *Bacillus cereus*, crioglobulinemia mezclada, deficiencia de ornitina-carbamoyltransferasa, peliosis hepatis, porfiria cutánea tardía, cirrosis primario biliar, ascites refractario, Síndrome de Rotor, sarcoidosis, colangitis esclerosante, esteatosis, síndrome de Summerskill, trombocitopenia, tirosinemia, sangrado variceal, enfermedad venoclusiva del hígado y enfermedad de Wilson.

6.18. Preparación de células progenitoras

[0203] Este ejemplo proporciona pasos para un aislamiento de células progenitoras de hígado cometidas y no cometidas. Mientras varias técnicas se conocen en la técnica, una de las formas de realización preferidas se describe en detalle con la comprensión de que otras técnicas de preparación son igualmente adecuadas cuanto están de acuerdo con los objetivos deseados. Para ejemplos de técnicas preferidas no limitativas ver, por ejemplo, las patentes US nº 5,807,686, 5,916,743, 5,672,346, 5,681,559, 5,665,557, 5,672,346 y 5,663,051.

[0204] Células del hígado de densidad hepáticas cometidas o pluripotentes pueden ser aisladas de manera preliminar usando bien Percoll u otros gradientes de densidad adecuados tales como Histopaque y después de centrifugado, aislarse dos veces con medios y resuspenderse en 10 ml de medios de elutriación. Para elutriación de contraflujo, las células mononucleares de densidad baja lavadas se inyectan vía un acoplador de sitio de muestreo en la corriente de entrada de un centrifugador Beckman J6M/E equipado con un rotor JE-5 y cámara estándar. No obstante, cualquier número de centrifugadores de flujo continuo comerciales y elutriadores que preferiblemente emplean insertos plásticos incluyendo medios de cámara desechables para facilitar separación basada en densidad pueden usarse, tal como el "Fenwal Models CS 3000" y "Autopheresis C" vendidos por Baxter Internacional Inc, de Deerfield, IL; "IBM Model 2997" vendidos por Cobe manufacturing of Lakewood, CO. La elección de instrumentos depende de un experto en la técnica. Una bomba peristáltica (Cole Palmer Instruments, Chicago, IL) proporciona flujo continuo de medio de elutriación, que es solución salina 0,9% normal con 100 mg/dl de D-glucosa, 0,3 mM de ácido etilendiaminetetraacético disodio (EDTA) y 50 mg/dl de albúmina de suero bovino con pH ajustado a 7.2. El medio es esterilizado antes del uso. Las células se entregan a una velocidad de flujo total de 15 ml/min, velocidad de rotor de 900g y a temperatura ambiente. Después de recoger 100 ml de eluato, la velocidad de flujo aumenta a 25 ml/min. Con la velocidad del rotor mantenida constante, los índices de flujo se aumentan consecutivamente a 29 ml/min, 33 ml/min y 37 ml/min, recogiendo 200 ml con cada incremento. Las células que permanecen en la cámara se capturan por del giro rotor y enjuague de la cámara con 100 ml de medios de elutriación. Cada fracción celular se lava y se centrifuga a 300g durante 10 minutos. Las fracciones

adecuadas se recogen, viabilidad se determina por exclusión de tinte de azul de tripán y recuperaciones celulares se determinan con contador celular (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

[0205] Alternativamente células de hígado no se procesan a través de separación de gradiente de densidad y se suspenden en el suero salino tamponado con fosfato (PBS), pH 7.4, con suero fetal de ternera 5%, EDTA 0,01% peso/vol. y 1,0 g/l de D-glucosa y se inyecta directamente en un sistema de elutriación por centrifugación de contraflujo Beckman a 10°C a una velocidad de rotor de 1,950 r.p.m. usando un rotor JA-17 y cámara de separación estándar (Beckman Instruments) y las muestras se eluyen a índices de flujo entre 12 y 14 ml/min. Así, este método es versátil y necesariamente no debe depender de la separación de gradiente de densidad.

[0206] Las células progenitoras obtenidas en las fracciones adecuadas generalmente tienen diámetros celulares en un intervalo de 8,0 a 9,4 micras; la mayoría de las células tuvieron diámetros que entraron dentro de un intervalo de 8,3 a 9,2 micras. Estos diámetros se miden según técnicas conocidas en la técnica. Si es necesario, se realiza otra selección o bien negativa o positiva, basada en marcadores celulares.

[0207] Una variedad de otros anticuerpos conocidos por los expertos en la técnica puede usarse sola o en combinación con marcadores progenitores de hígado anteriores. La elección dependerá del celular tipo deseado para ser aislado o enriquecido e incluye, pero de forma no limitativa, anticuerpos específicos a antígenos linfoides y hematopoyéticos tales como anti-CD2, anti-CD2R, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5 y anti-CD8 específico para T células, anti-CD6 específico para subconjunto de células T y subconjunto de linfocito B, anti-CD7 específico para subconjunto de células T principales, anti-CD12, anti-CD19 y anti-CD20, anti-CD72, anti-CDw78, específicos para B células; anti-CD13 y anti-CD14 específicos para monocitos; anti-CD16 y anti-CD56 específico para células asesinas naturales, anti-CD41 para plaquetas, anti-CD1a, CDb y CD1c específicos para timocitos corticales y células de Langerhans, anti-CD9 específico para pre-B células, monocitos y plaquetas, anti-CD10 específico para células progenitoras linfoides, C-All y granulocitos; anti-CD11a específico para leucocitos; anti-CD11b específico para granulocitos, monocitos y células asesinas naturales, anti-CD11c específico para monocitos, granulocitos, células asesinas naturales y leucemia de célula velluda, anti-CD15 específico para granulocitos, anti-CDw17 específico para granulocitos, monocitos y plaquetas, anti-CD18 específico para leucocitos, anti-CD21 específico para células B maduras; anti-CD22 específico para citoplasma de células B y células B maduras; anti-CD23 específico para células B activadas; anti-CD24 específico para células B y granulocitos, anti-CD25 y anti-CD26 específico para células T y B activadas y macrófagos activados, anti-CD27 y anti-CD28 específicos para subconjunto de células T principales; anti-CD30 específico para células B y T activadas y células de Sternberg Reed, anti-CD31 específico para plaquetas, monocitos/macrófagos, granulocitos y células B, anti-CDw32 específico para macrófagos, granulocitos, células B y eosinófilos, anti-CD33 específico para monocitos, células progenitoras de mieloides y leucemias de mieloides, anti-CD34 específico para células precursoras hematopoyéticas, anti-CD35 específico para granulocitos, monocitos, células B, algunas células NK y eritrocitos; anti-CD36 específico para monocitos/macrófagos y plaquetas, anti-CD37 específico para células B maduras, anti-CD38 específico para células de plasma, timocitos y células T activadas, anti-CD39 específico para células B maduras, anti-CD40 específico para células B y carcinoma, anti-CD42 y 42b específicos para plaquetas y megacariocitos, anti-CD43 específico para leucocitos excepto células B circulantes, anti-CD44 específico para leucocitos y glóbulos rojos, anti-CD45 específico para leucocitos, anti-CD45RO específico para células T, subconjunto de células B, monocitos y macrófagos, anti-CD45RA específico para células B, monocitos y subconjunto de células T, anti-CD45RB específico para células B, subconjunto de células T, macrófagos de monocitos y granulocitos; anti-CD46, CD55, CD58 y CD59 específicos para células no hematopoyéticas y hematopoyéticas, anti-CD47 específico para todos los tipos celulares, anti-CD48 específico para leucocitos y neutrófilos, anti-CDw49b específico para plaquetas, células T activadas y cultivadas a largo plazo, anti-CDw49d específico para monocitos, células T y células B; anti-CDw49f específico para plaquetas y megacariocitos, anti-CDw50 y CDw52 específicos para leucocitos, anti-CD51 específico para plaquetas, anti-CD53 específico para leucocitos incluyendo células de plasma neoplásico y normal, anti-CD54 específico para células endoteliales, anti-CDw60 específico para subconjunto de células T y plaquetas; anti-CD61 específico para plaquetas y megacariocitos; anti-CD62 específico para plaquetas activadas, anti-CD63 específico para plaquetas activadas, monocitos/macrófagos, anti-CD64 específico para monocitos (interferón desregulado.gamma.), anti-CDw65 específico para granulocitos y reactividad heterogénea con monocitos, anti-CD66 y 67 específicos para granulocitos, anti-CD68 específico para monocitos y macrófagos, anti-CD69 específico para células B y T activadas, macrófagos activados y células asesinas naturales; anti-CDw70 específico para células B y T activadas, células de Sternberg-Reed y linfoma de célula anaplásica grande, anti-CD71 específico para células B y T activadas, macrófagos, células proliferantes, anti-CD73 específico para subconjunto de linfocito B y subconjunto de células T, anti-CD74 específico para células B y monocitos/macrófagos, anti-CDw75 específico para células B maduras, anti-CD76 específico para células B maduras y subconjunto de células T, anti-CD77 específico para células B foliculares centrales; anticuerpos para citocinas y factores de crecimiento (p. ej. IL1-IL13, eGF IGF I y II, TGF-alfa y beta, TNF-alfa y beta, FGF NGF, CIF, IFN-alfa y beta, CSF), antígenos víricos (p. ej. proteínas de revestimiento de virus de la hepatitis B o proteínas de revestimiento de VIH), hormonas, antígenos asociados celulares o tumorales o marcadores, moléculas de adhesión, moléculas de hemostasis y células endoteliales. Otros marcadores y procedimientos de enriquecimiento conocidos en la técnica son igualmente adecuados tales como los descritos, por ejemplo, en la patente US nº 5,840,502.

[0208] Todas las referencias ya citadas y publicaciones son cada una por la presente incorporadas por referencia en su integridad respectiva.

[0209] Mientras formas de realización preferidas de la invención se han ilustrado y descrito, se apreciará que varios cambios pueden hacerse en estos. Expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de averiguar usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descrita aquí.

REIVINDICACIONES

1. Método de tratamiento de un tejido de hígado de donante no fetal para obtener una población enriquecida de células progenitoras de hígado comprendiendo:
5 (a) provisión de tejido de donante no fetal obtenido entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 30 horas post-mortem; y
(b) tratamiento de dicho tejido de donante no fetal para obtener una población enriquecida de células progenitoras de hígado.
10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el tejido donante se obtiene dentro de aproximadamente 2 horas y tres o seis horas después de que el latido del corazón se pare.
15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el tejido donante se enfría.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el tejido donante se enfría a aproximadamente 4 °C.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el donante es un adulto.
20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el donante es un cerdo o un primate.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el paso de tratamiento proporciona una suspensión de célula sustancialmente única o un explante.
25 8. Método según la reivindicación 7, en el que el paso de tratamiento comprende adicionalmente la selección de la suspensión de aquellas células que expresan al menos un marcador asociado positivamente o negativamente con al menos un linaje de célula progenitora de hígado.
30 9. Método según la reivindicación 7, en el que el paso de tratamiento comprende adicionalmente un paso de reducción, para proporcionar una suspensión celular reducida enriquecida en progenitores de hígado que muestran al menos un marcador asociado a al menos un linaje de célula progenitora de hígado.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que al menos un linaje de célula progenitora de hígado incluye linaje de célula hepática.
35 11. Método de procuración de células progenitoras de hígado, comprendiendo:
(a) provisión de un donante de corazón parado entre aproximadamente 2 horas y 30 horas post-mortem como fuente de tejido de hígado;
40 (b) obtención de tejido de hígado de dicho donante; y
(c) tratamiento del tejido de hígado para obtener las células progenitoras de hígado.
12. Método según la reivindicación 11, en el que el donante es un mamífero.
45 13. Método según la reivindicación 12, en el que el mamífero es un humano.
14. Método según las reivindicaciones 11-13, en el que las células progenitoras de hígado tienen capacidad para desarrollarse en hepatocitos, células biliares, o una combinación de estos.
50 15. Método según las reivindicaciones 11-14, en el que las células del donante expresan al menos uno de alfa-fetoproteína, albúmina, sialoproteína de hueso, CD14, CD34, CD38, CD90, CD45, CD117, ICAM-1, colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, glicoforina A, u osteopontina.
16. Método de tratamiento de un tejido de hígado con al menos una población de célula progenitora de hígado como fuente de células progenitoras de hígado, comprendiendo:
55 (a) recogida del tejido de hígado de un donante con un corazón parado entre aproximadamente 2 horas y 30 horas post-mortem, el tejido de hígado con al menos una población de célula progenitora de hígado; y
(b) tratamiento posterior del tejido recogido para obtener células progenitoras de hígado.
60 17. Método de tratamiento de tejido de hígado de donante fetal para obtener una población enriquecida de células progenitoras de hígado comprendiendo:
(a) provisión de tejido de hígado humano fetal obtenido entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 30 horas post-mortem; y
65

(b) tratamiento de dicho tejido humano fetal para obtener una población enriquecida de células progenitoras de hígado.

18. Método de tratamiento de un tejido de hígado con al menos una población de célula diploide como fuente de células diploides, comprendiendo:

(a) recogida de un tejido de hígado de un donante con un corazón parado y entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 30 horas post-mortem en un momento en que se recoge el tejido del hígado, sospechándose que el tejido de hígado tiene al menos una población de célula diploide;

(b) tratamiento del tejido de hígado recogido para obtener una población de células enriquecida con células diploides.

19. Método según la reivindicación 18, en el que el donante no es un feto.

20. Método según la reivindicación 18 o 19, en el que el donante es un adulto.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en el que las células diploides incluyen progenitores de hígado.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en el que el paso de tratamiento comprende el tratamiento del tejido de hígado recogido para proporcionar una única suspensión celular.

23. Método según la reivindicación 22, en el que el paso de tratamiento comprende además la separación de la suspensión celular única en dos o más fracciones.

24. Método según la reivindicación 23, en el que el paso de separación separa células más grandes de células más pequeñas, células de densidad más alta de células de densidad inferior, o ambos.

25. Método según la reivindicación 24 en el que una o más fracciones que consisten esencialmente en células más pequeñas, células de densidad inferior, o ambos, son procesadas posteriormente para proporcionar una población de células enriquecida con células diploides.

26. Método según la reivindicación 21, en el que las células diploides incluyen progenitores de hígado que expresan alfa-fetoproteína.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en el que el tejido se recoge dentro de aproximadamente 2 horas y aproximadamente tres o seis horas después de que el latido del corazón se pare.

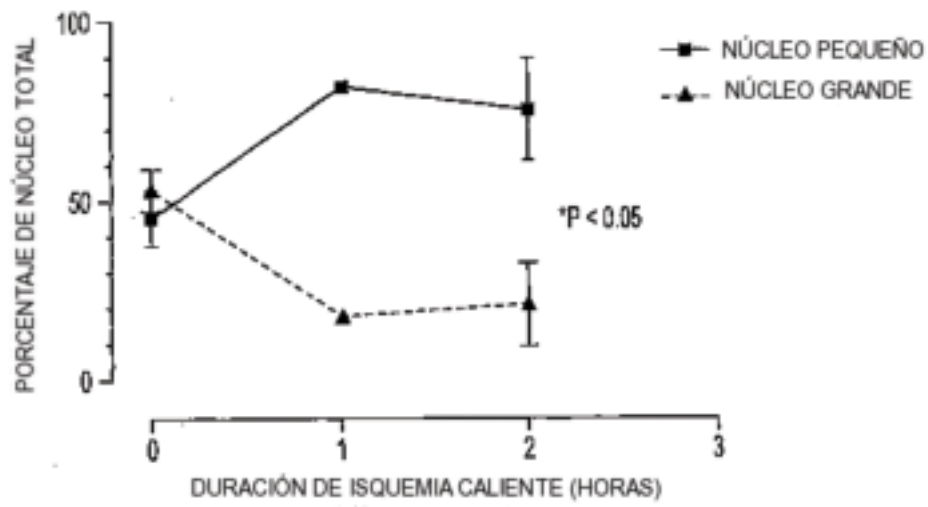


FIG. 1A

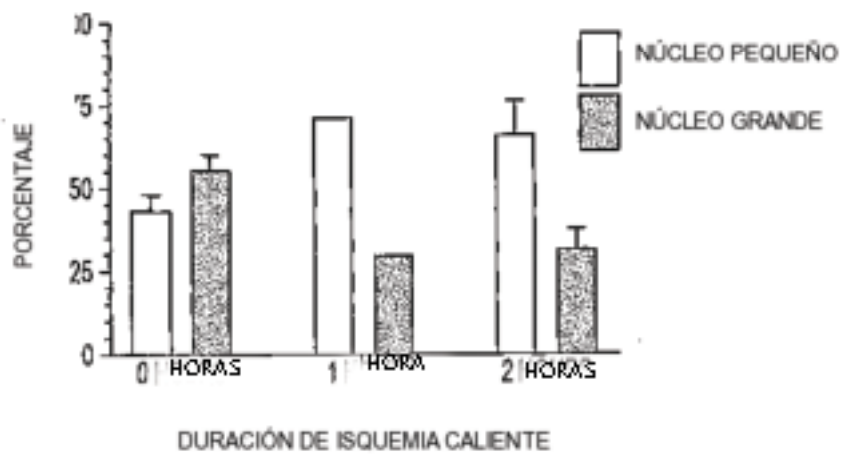


FIG. 1B

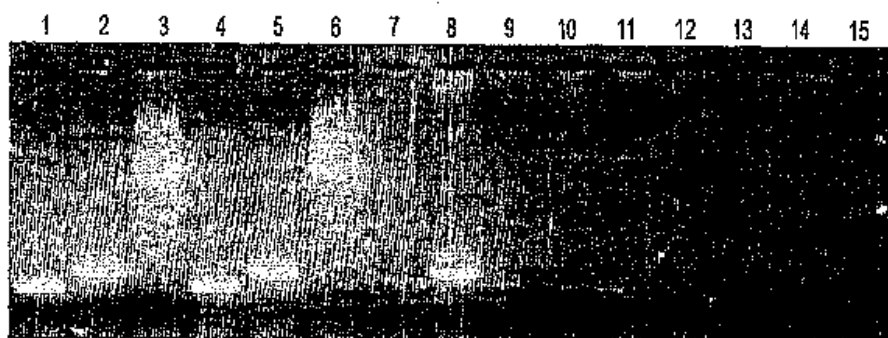


FIG. 2A

CEBADOR 5'	hAFP1	hAFP3	hAFP1
CEBADOR 3'	hAFP2	hAFP4	hAFP4
EXONES OBJETIVO (LONGITUD DE ADN)	1 ~ 3 (257 bp)	12 ~ 14 (355 bp)	1 ~ 14 (1836 bp)
Hep3B	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
HepG2	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
K562	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
STO	10	11	12
NO ADNc	13	14	15

FIG. 2B

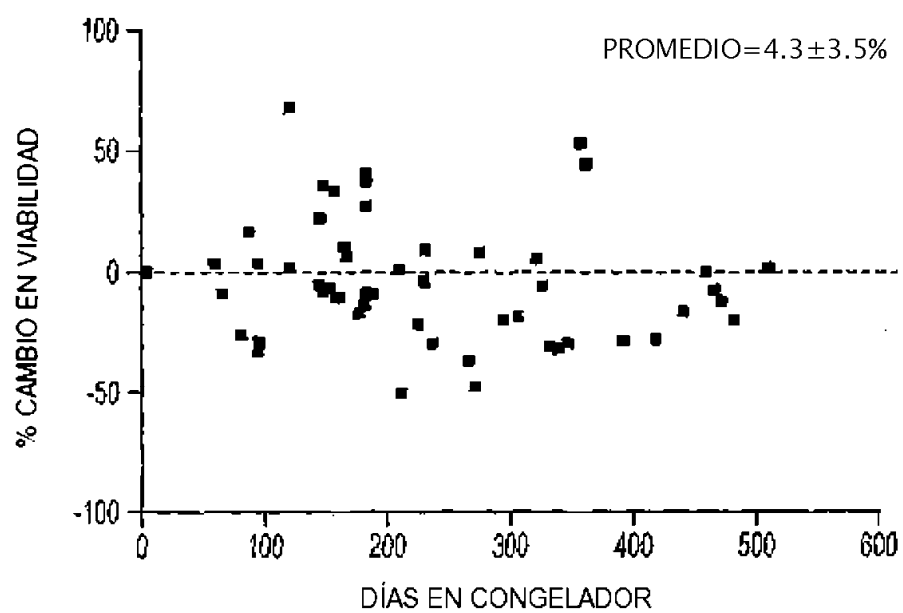
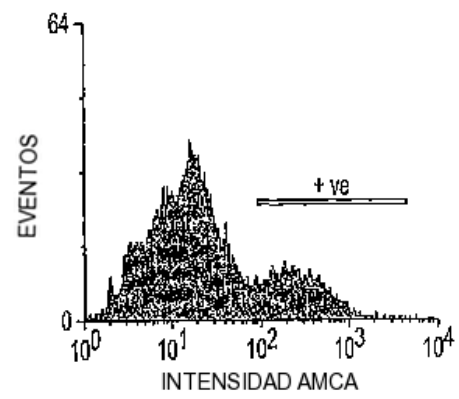
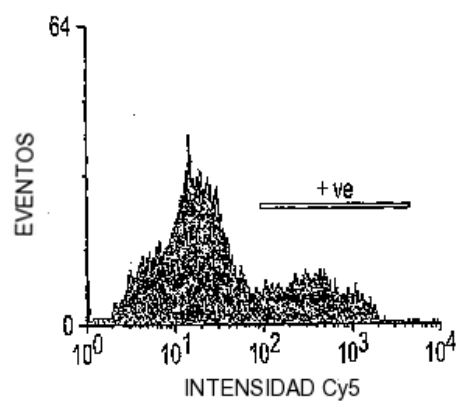


FIG. 3



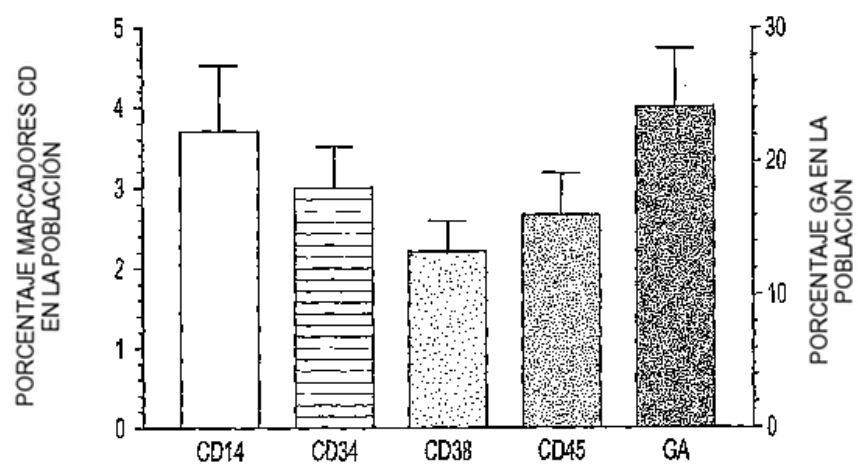


FIG. 5

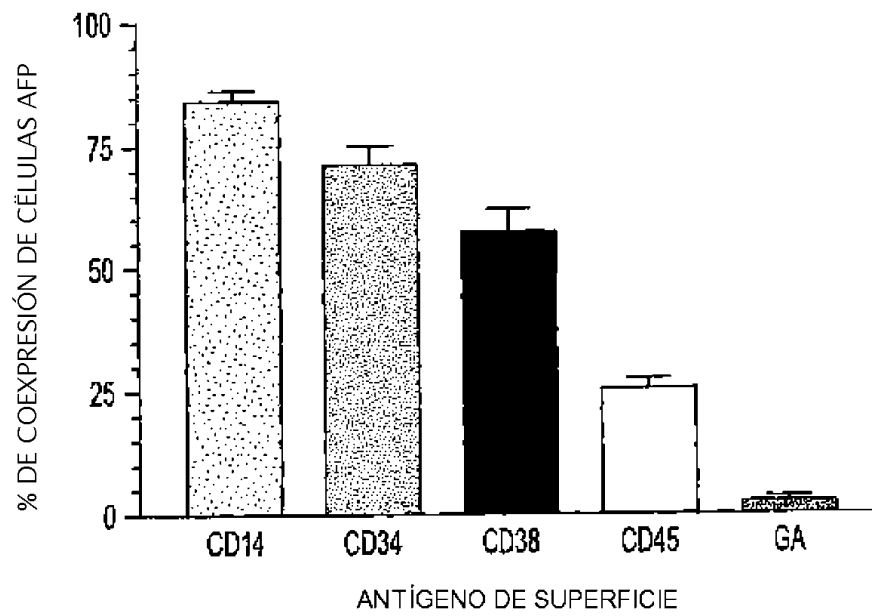


FIG. 6

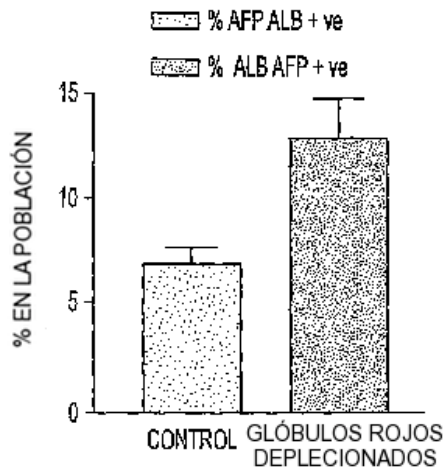


FIG. 7A

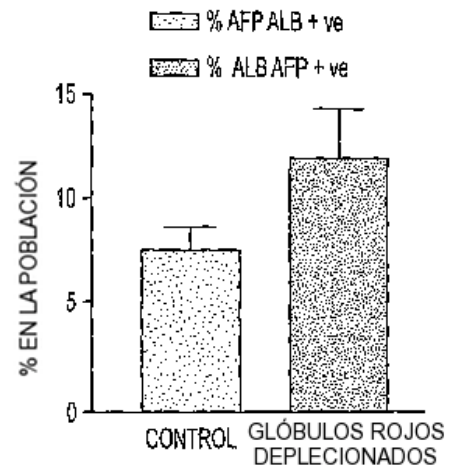


FIG. 7B

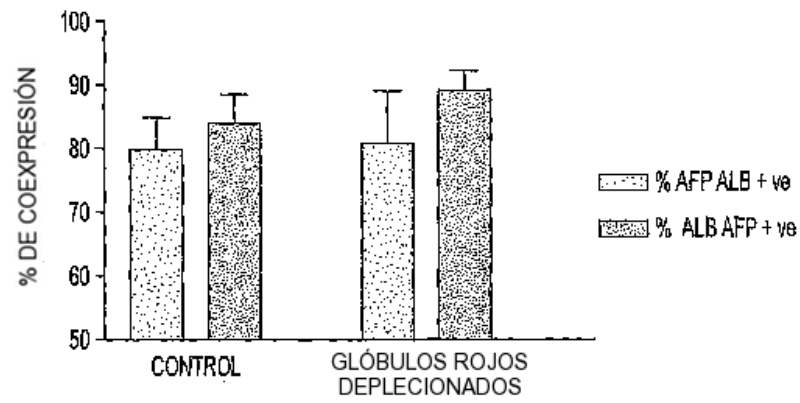


FIG. 7C

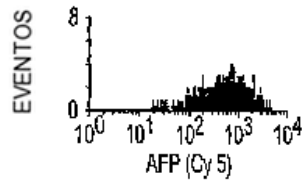


FIG. 8B

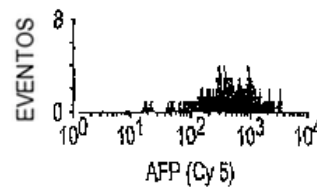


FIG. 8C

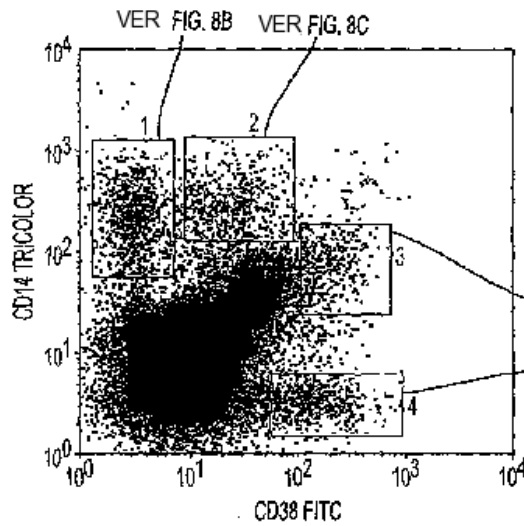


FIG. 8A

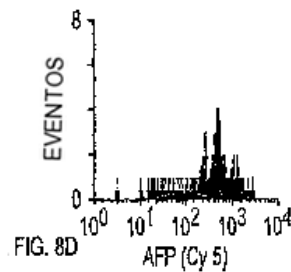


FIG. 8D

FIG. 8D

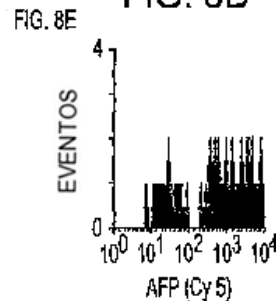


FIG. 8E

FIG. 8E

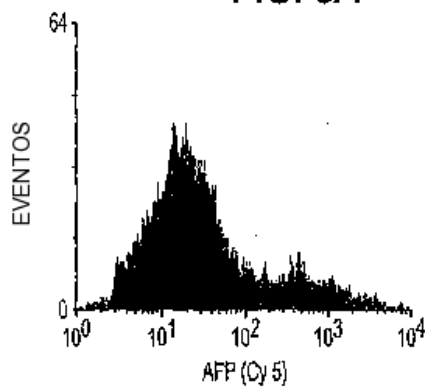


FIG. 8F

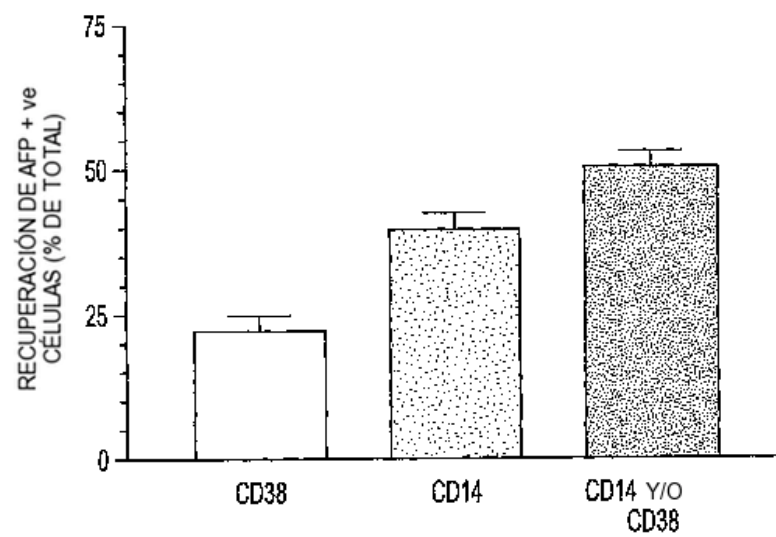


FIG. 9

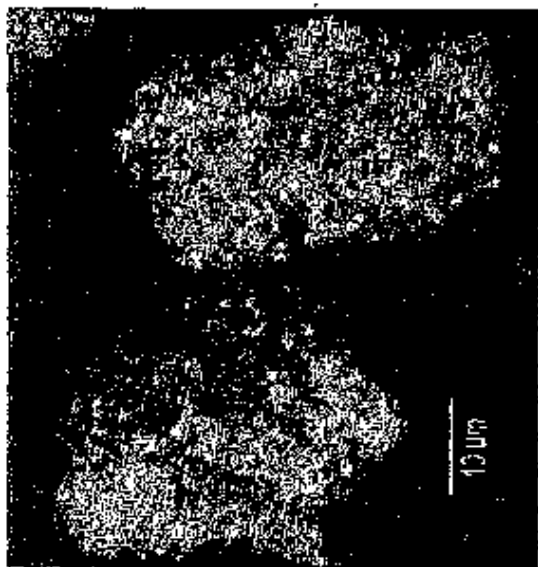


FIG. 10B

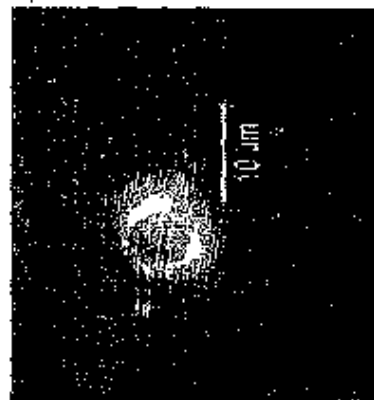


FIG. 10D

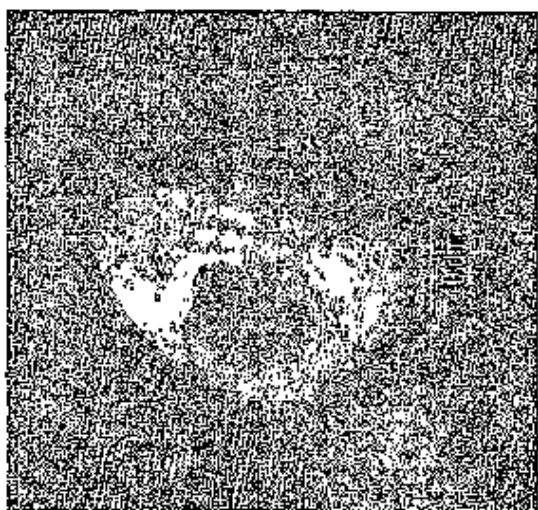


FIG. 10A

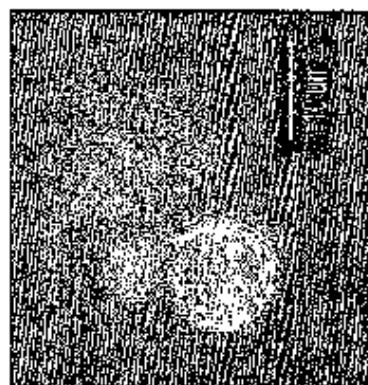


FIG. 10C

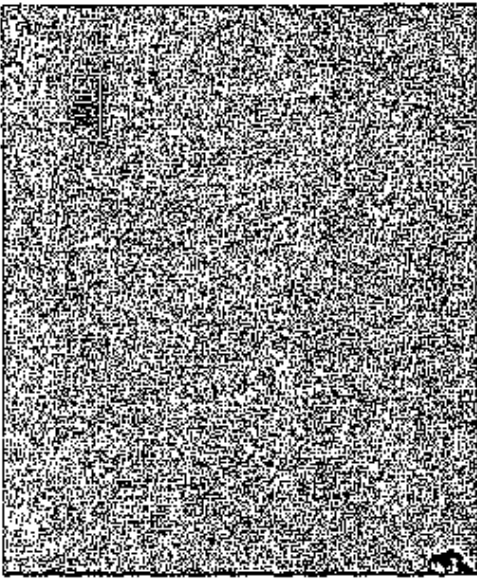


FIG. 11B

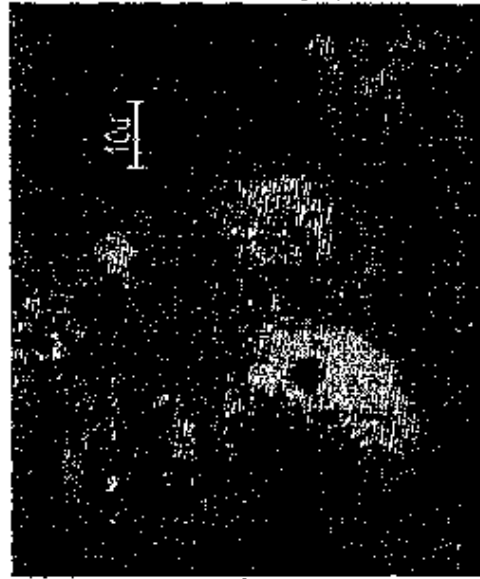


FIG. 11D

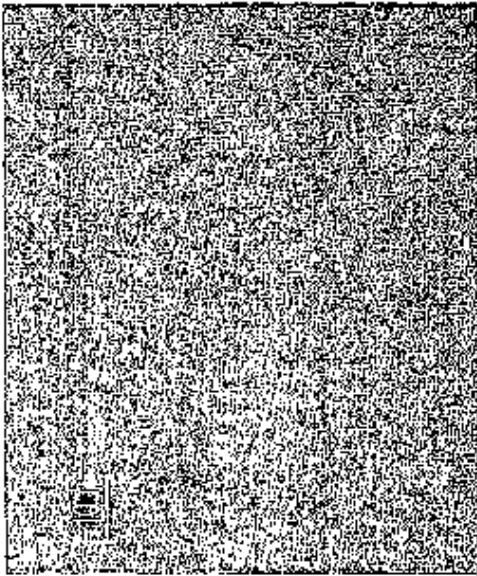


FIG. 11A

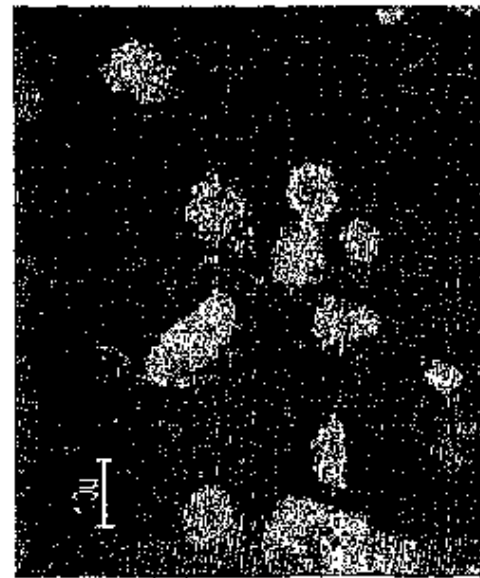


FIG. 11C

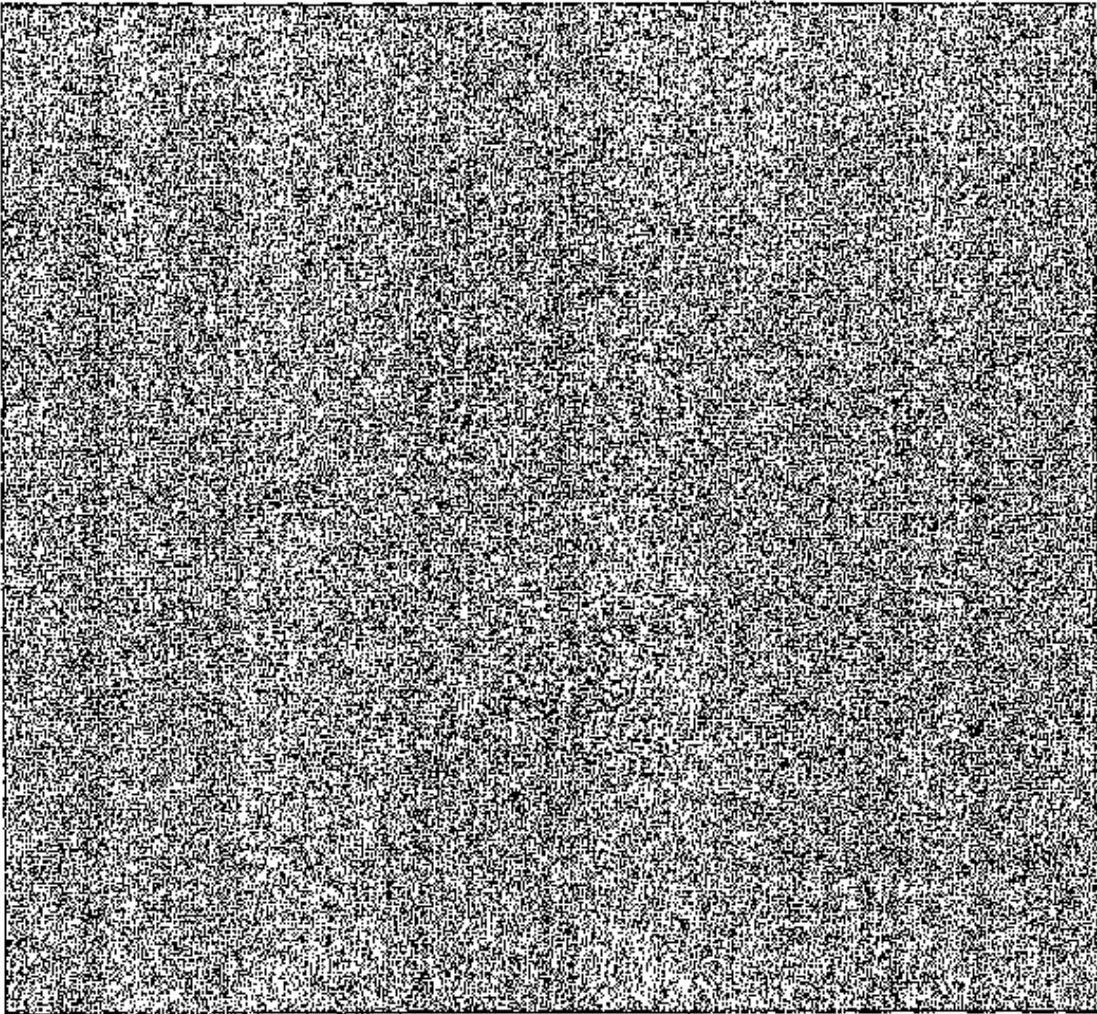


FIG. 12A

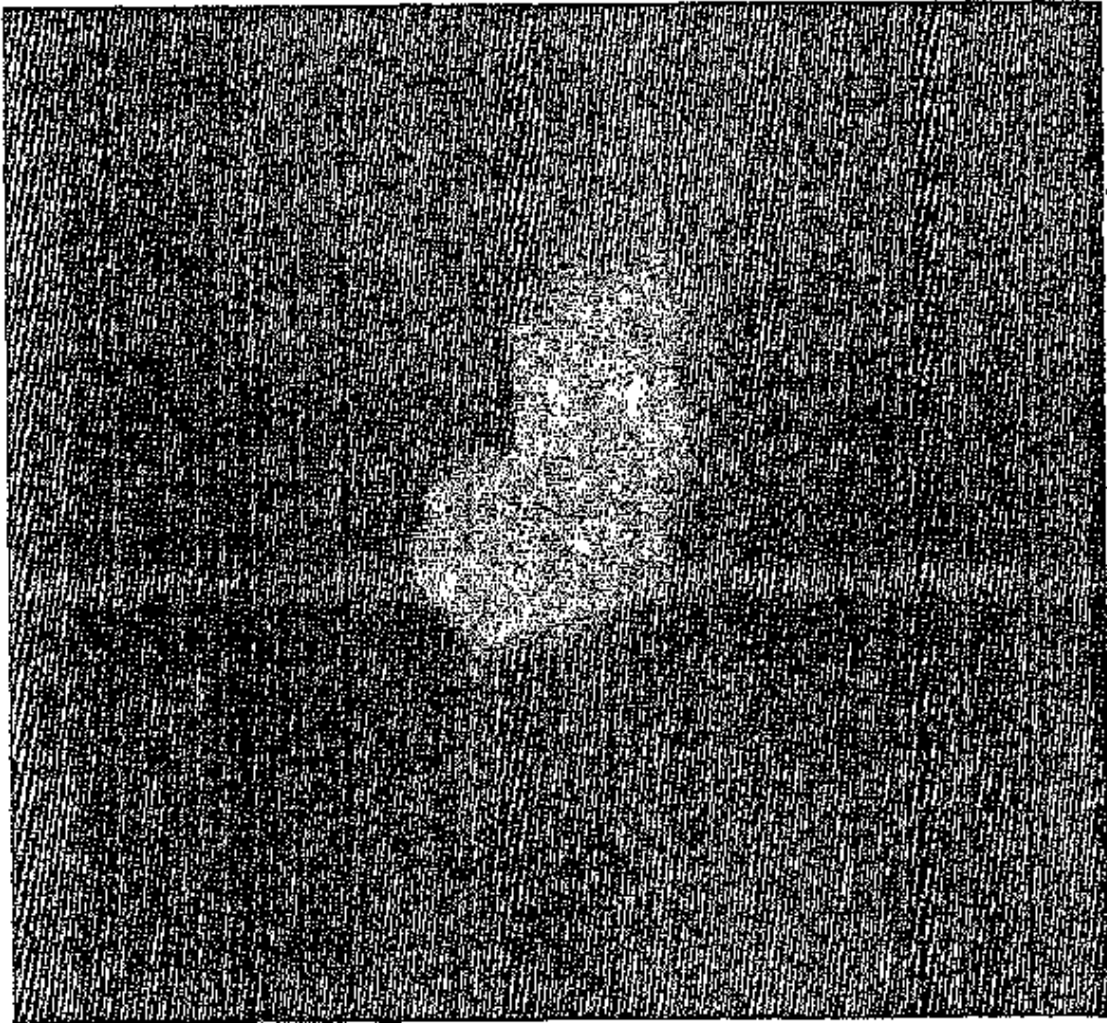


FIG. 12B

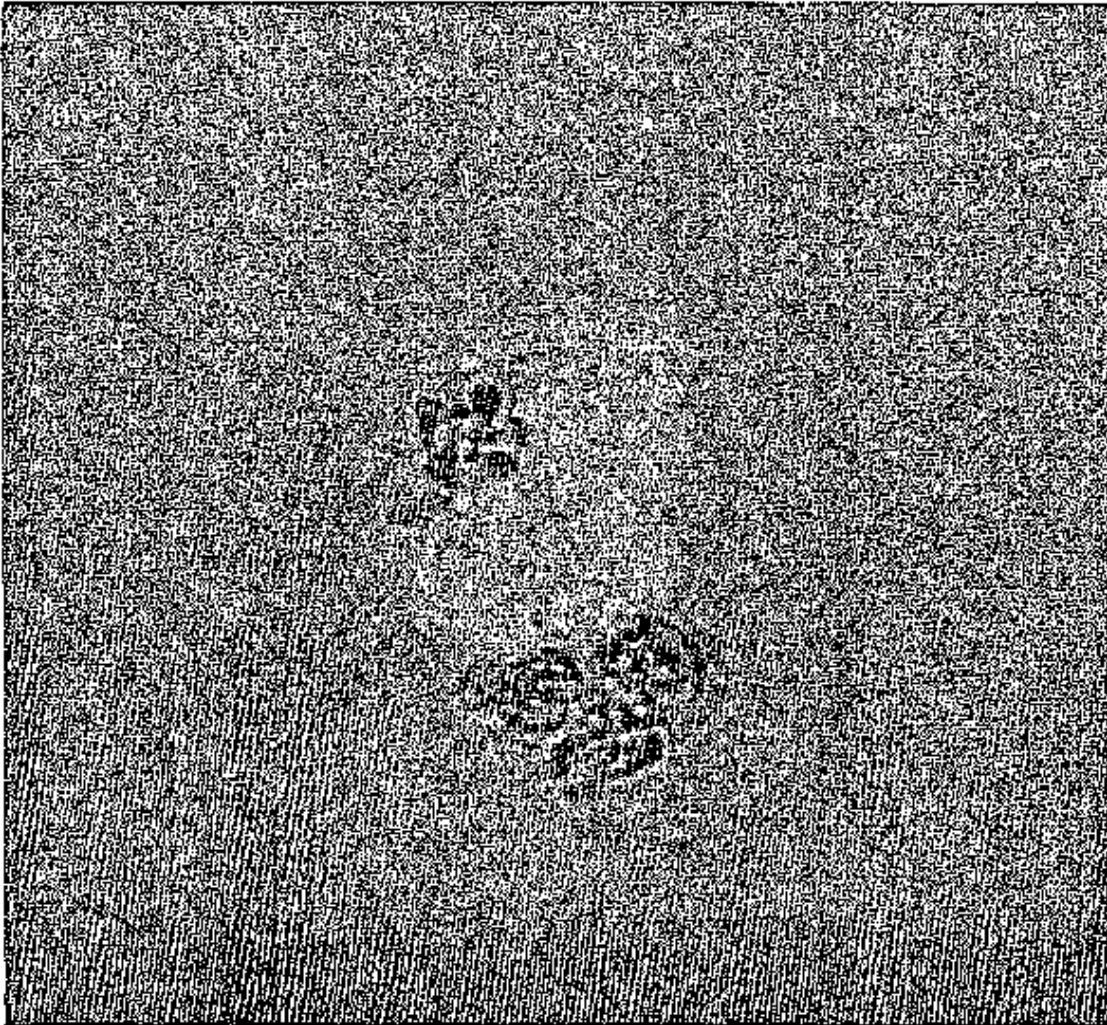


FIG. 12C

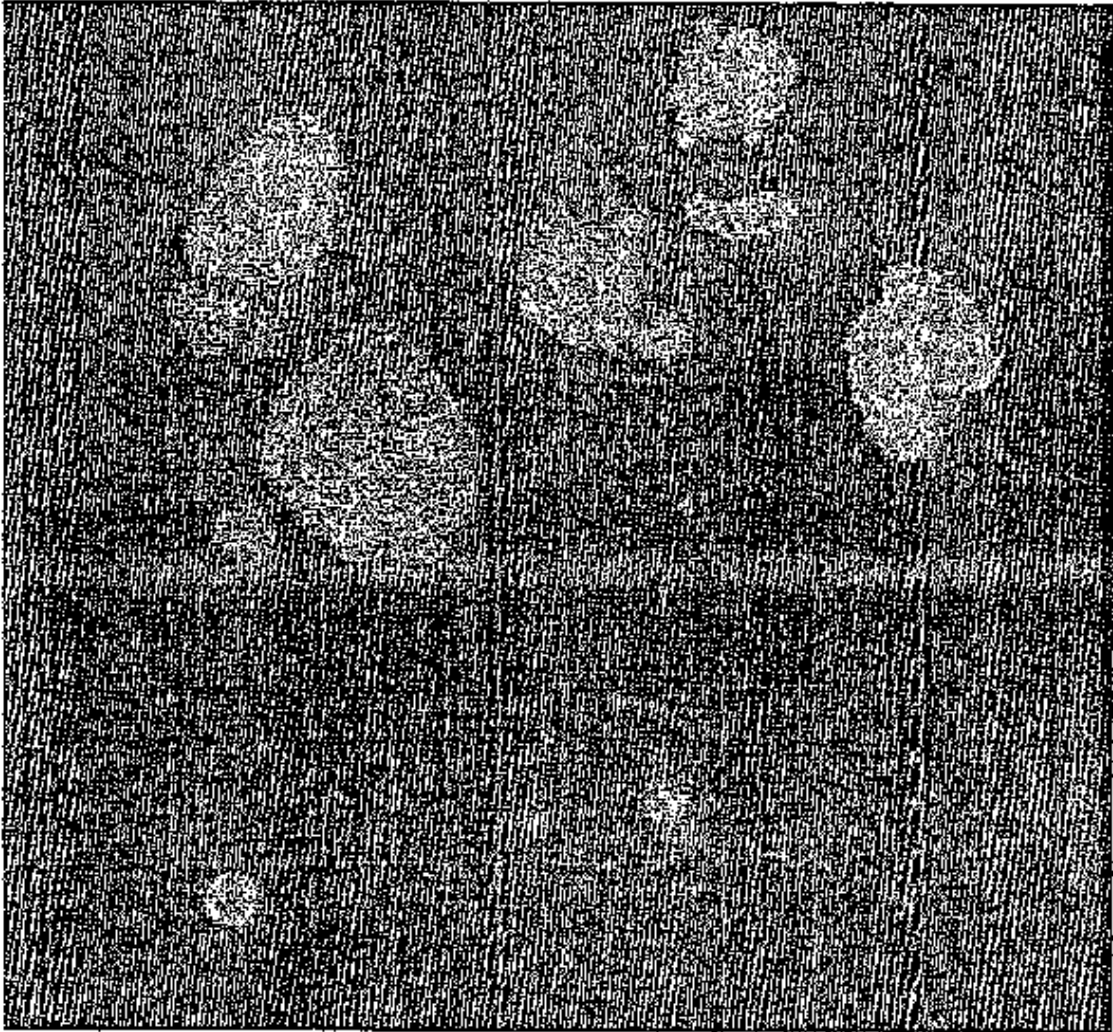


FIG. 13A



FIG. 13B