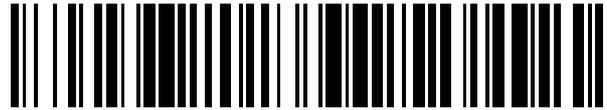


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 944**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2007 E 07706702 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1980613**

54 Título: **Procedimiento para mantener la función de las células de tejido hepático durante un tiempo prolongado**

30 Prioridad:

12.01.2006 JP 2006033057

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

01.03.2016

73 Titular/es:

**TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY
(100.0%)**

**8-1, KAWADA-CHO
SHINJUKU-KU, TOKYO 162-8666, JP**

72 Inventor/es:

**YAMATO, MASAYUKI;
OHASHI, KAZUO y
OKANO, TERUO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 561 944 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para mantener la función de las células de tejido hepático durante un tiempo prolongado

5 CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para mantener la función de las células de tejido hepático útil en los campos de biología, medicina, farmacia y similares durante un periodo de tiempo prolongado y a un procedimiento para producir células de tejido hepático para trasplante que permita el mantenimiento a largo plazo de la función de las células de tejido hepático que se van a usar en el procedimiento.

TÉCNICA ANTERIOR

El hígado es un órgano principal de la función metabólica tal como la gluconeogénesis, el almacenamiento de glucógeno, el metabolismo de los lípidos, la producción de proteínas plasmáticas, el metabolismo de la bilirrubina, el metabolismo hormonal y el metabolismo de las vitaminas y adicionalmente, tiene funciones complicadas de realizar la producción de bilis, detoxificación mediante diversas enzimas y también biofilaxia contra sustancias extrañas. Una vez que una enfermedad, tal como hepatitis, cirrosis hepática y cánceres de hígado aparece en el órgano, el organismo vivo con la función dañada descrita anteriormente está considerablemente afectado de forma adversa. Y cuando la enfermedad evoluciona, se deben adoptar medidas adecuadas para actuar por dichas funciones.

En un entorno de este tipo, se han considerado técnicas de acción para la función del hígado fuera del organismo vivo. Y estas técnicas actúan en su mayoría por parte de las funciones del hígado que son simplemente filtrar sustancias tóxicas en la sangre a través de una membrana plana o una membrana de fibra hueca [por ejemplo, la solicitud de patente japonesa n.º: H06-101775 (publicación de patente japonesa A n.º: H07-284531) y la solicitud de patente japonesa n.º: 2004-155864 (publicación de patente japonesa A n.º: 2004-35843)]. Recientemente, tal como para actuar aunque sea ligeramente por funciones complicadas del hígado, se ha avanzado el desarrollo de hígados artificiales de tipo híbrido obtenidos sellando las células hepáticas en el dispositivo de filtrado descrito anteriormente y haciendo circular la sangre a su través para actuar por la función del hígado [por ejemplo, la solicitud de patente japonesa n.º: H08-511686 (publicación de patente japonesa A n.º: H10-506806) y la solicitud de patente japonesa n.º: 2002-204967 (publicación de patente japonesa A n.º: 2004-41527)]. No obstante, la técnica en el presente documento que realiza la función del hígado mediante circulación extracorpórea de la sangre tuvo una eficiencia inferior y no necesariamente pudo cumplir la restricción del tiempo de la posible circulación extracorpórea. Adicionalmente, había un problema de que las células hepáticas extraídas fuera del organismo vivo tenían una estabilidad inferior y la función del hígado se atenuó considerablemente durante el uso.

Por otro lado, la publicación de patente japonesa A n.º: H05-192138 describe un procedimiento para cultivar células dérmicas que comprende cultivar células dérmicas en un soporte de cultivo celular donde la superficie de un material base se reviste con un polímero que tiene una temperatura de disolución crítica superior o inferior en agua de 0 a 80 °C a una temperatura por debajo de la temperatura de disolución crítica superior o por encima de la temperatura de disolución crítica inferior y a partir de ahí regular la temperatura del cultivo hasta una temperatura por encima de la temperatura de disolución límite superior o por debajo de la temperatura de disolución crítica límite inferior para desprender las células dérmicas cultivadas. De acuerdo con este procedimiento, las células se desprenden del material base del cultivo revestido con un polímero sensible a la temperatura pero este documento de patente no describió un procedimiento para producir células de tejido hepático que mantengan la función durante un largo periodo de tiempo con el uso de las células obtenidas mediante este procedimiento.

Okano et al. prepararon una lámina de células parenquimatosas hepáticas y una lámina de células endoteliales vasculares con el uso de la técnica de la publicación de patente japonesa A n.º: H05-192138, laminaron las dos láminas para unir las entre sí y construyeron un sistema de cocultivo en el que las células parenquimatosas hepáticas y las células endoteliales vasculares interaccionan fuera del organismo vivo y como resultado, tuvieron éxito en la producción de albúmina, una proteína plasmática hepática, como una función del hígado durante aproximadamente 40 días [Journal of Biomedical Material Research, 62, 464-470 (2002)]. Mediante este procedimiento, se permitió que las células parenquimatosas hepáticas que mueren fácilmente fuera del organismo vivo mantuvieran la actividad celular durante un largo periodo de tiempo. No obstante, no se realizó un examen de la prolongación adicional del periodo para mantener la función y de acuerdo con ello, se ha exigido el establecimiento de una técnica novedosa de mantener la función de las células de tejido hepático durante un periodo largo de tiempo que sea útil en los campos de biología, medicina, farmacia y similares.

60 DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMA QUE HA DE RESOLVER LA INVENCION

La presente invención se realiza para intentar resolver los problemas de las técnicas convencionales descritas anteriormente. En otras palabras, la presente invención tiene un objeto de proporcionar una lámina de células de tejido hepático para su uso en medicina y el uso de un animal no humano trasplantado con una lámina de células de

tejido hepático como se describe en el presente documento.

MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA

5 Con el fin de resolver el problema descrito anteriormente, los autores de la presente invención han realizado un examen desde diversos ángulos para llevar a cabo investigación y desarrollo. Como resultado, se ha encontrado que las funciones de las células de tejido hepático se pueden mantener durante un periodo prolongado de tiempo mediante el cultivo de las células de tejido hepático sobre un soporte de cultivo celular cuya superficie está revestida con un polímero que muestra un cambio en la fuerza de hidratación en el intervalo de temperatura de 0 a 80 °C
10 dentro del intervalo de temperatura en el que la fuerza de hidratación del polímero es débil, cambiando a partir de ahí la temperatura del medio de cultivo líquido hasta un nivel al que la fuerza de hidratación del polímero llega a ser fuerte para desprender las células de tejido hepático cultivadas y después trasplantar las células de tejido hepático obtenidas en un sitio definido *in vivo*. Además, se ha descubierto que las células de tejido hepático trasplantadas en el organismo vivo tienen la función de un hígado artificial. La presente invención se completa sobre la base de esta
15 fundamentación.

Se divulga un procedimiento para mantener la función de las células de tejido hepático durante un periodo de tiempo prolongado que comprende cultivar las células de tejido hepático sobre un soporte de cultivo celular cuya superficie está revestida con un polímero que muestra un cambio en la fuerza de hidratación en el intervalo de temperatura de
20 0 a 80 °C dentro del intervalo de temperatura en el que la fuerza de hidratación del polímero es débil, a partir de ahí cambiar la temperatura del medio de cultivo líquido hasta un nivel al que la fuerza de hidratación del polímero llega a ser fuerte para desprender las células de tejido hepático cultivadas y después trasplantar las células de tejido hepático obtenidas en un sitio definido *in vivo*.

25 Adicionalmente, se divulga un hígado artificial usando el procedimiento para mantener la función de las células de tejido hepático durante un periodo de tiempo prolongado.

Todavía más, se divulga un animal distinto a un ser humano en el que las células de tejido hepático se han trasplantado usando el procedimiento para mantener la función de células de tejido hepático durante un periodo de
30 tiempo prolongado.

Además, se divulga un sistema de evaluación de la función del hígado que comprende administrar una sustancia de ensayo a un animal al que se han trasplantado células de tejido hepático y juzgar la influencia de la sustancia de ensayo sobre la función del hígado.
35

Adicionalmente, se divulga un procedimiento para producir células de tejido hepático para trasplante que permite el mantenimiento a largo plazo de la función de las células de tejido hepático que comprende cultivar las células de tejido hepático sobre un soporte de cultivo celular cuya superficie está revestida con un polímero que muestra un cambio en la fuerza de hidratación en el intervalo de temperaturas de 0 a 80 °C dentro del intervalo de temperatura
40 donde la fuerza de hidratación del polímero es débil y a partir de ahí cambiar la temperatura del medio de cultivo líquido hasta un nivel al que la fuerza de hidratación del polímero llega a ser fuerte para desprender las células de tejido hepático cultivadas.

Específicamente, la presente invención proporciona:
45

1. Una lámina de células de tejido hepático que comprende al menos células parenquimatosas hepáticas obtenidas de tejido hepático para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o ayuda en la función del hígado, en el que la lámina se puede obtener mediante cultivo de las células de tejido hepático que comprenden al menos células parenquimatosas hepáticas obtenidas de tejido hepático en un soporte de cultivo celular cuya superficie se recubre con un polímero que muestra un cambio en la fuerza de hidratación en el intervalo de temperaturas de 0 a 80 °C dentro del intervalo de temperaturas donde la fuerza de hidratación del polímero es débil, a partir de ahí cambiar la temperatura del medio de cultivo líquido hasta un nivel al que la fuerza de hidratación del polímero llega a ser fuerte para desprender las células de tejido hepático cultivadas, que son adecuadas para el trasplante en un sitio bien definido en el organismo vivo de un animal, incluyendo un ser humano.
50
55

2. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con el punto 1 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o ayuda a la función del hígado, en el que la función del hígado se puede variar cambiando el tamaño y/o la forma de la lámina.
60

3. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con el punto 1 o 2 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o
65

ayuda a la función del hígado, caracterizada porque dicha lámina produce al menos uno de factor VIII de coagulación sanguínea humano, factor IX de coagulación sanguínea humano, alfa-1 antitripsina humana y albúmina.

4. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con el punto 3 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o ayuda a la función del hígado, en el que en el tratamiento de la hemofilia se introduce en la lámina de células de tejido hepático un gen eficaz para la producción del factor VIII de la coagulación sanguínea humano y/o el factor IX de la coagulación sanguínea humano.

5. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o ayuda a la función del hígado, en el que el sitio para el trasplante es tejido subcutáneo, tejido intraperitoneal, el hígado o un músculo dentro del organismo vivo.

6. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o ayuda a la función del hígado, en el que el sitio para el trasplante se proporciona anteriormente con un tratamiento de la inducción de la angiogénesis.

7. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con el punto 6 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o ayuda a la función del hígado, en el que el procedimiento de inducción de la angiogénesis se realiza mediante el tratamiento con FGF.

8. Uso de un animal no humano trasplantado con una lámina de células de tejido hepático según se define en uno cualquiera de los puntos 1 a 7 para evaluar la función del hígado que comprende juzgar la función del hígado sometido a la influencia de una sustancia de ensayo después de haberse administrado dicha sustancia de ensayo al animal no humano.

9. Uso de acuerdo con el punto 8, en el que el animal es una rata, un ratón, una cobaya, un tití, un conejo, un perro, un cerdo, un chimpancé o un animal inmunodeficiente de los mismos.

EFFECTO DE LA INVENCION

El procedimiento para mantener la función de las células de tejido hepático durante un periodo de tiempo prolongado descrito en el presente documento permitiría el mantenimiento prolongado de la función de las células de tejido hepático cultivadas, permitiría llevar a cabo una investigación fundamental a largo plazo en relación con la función del hígado como un todo y además permitiría la producción de hígados artificiales y animales a los que se han trasplantado células de tejido hepático que requieren la expresión de la función del hígado durante un periodo de tiempo prolongado.

BREVE EXPLICACION DE LAS FIGURAS

La figura 1 es fotografías que muestran secciones del tejido trasplantado 120 días después del trasplante en el ejemplo 1.

La figura 2 es fotografías que muestran secciones del tejido trasplantado 120 días después del trasplante en el ejemplo 1.

La figura 3 es una serie de gráficos que muestran el resultado de medir las concentraciones de hAAT séricas en el ejemplo 1.

La figura 4 es una serie de gráficos que muestran la cantidad de alfa-1 antitripsina humana (hA1AT) producida, la cantidad de albúmina producida y la cantidad de lidocaína metabolizada por la lámina de células de tejido hepático de la presente invención y por las células individuales obtenidas mediante el procedimiento convencional en el ejemplo 2.

La figura 5 es una serie de vistas de tinción tisular que muestran la inducción de CYP1A de una enzima metabolizante de fármacos con o sin inoculación de 3-MC (3-metilcolantreno) en el ejemplo 4.

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de los niveles de hAAT en suero en el ejemplo 4.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Las células de tejido hepático que se usan en la presente invención son células recolectadas del tejido hepático que pueden contener células parenquimatosas hepáticas para expresar la función del hígado. Las otras células pueden ser bien células no parenquimatosas dentro del tejido hepático o bien otras células e incluyen, por ejemplo, células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer, células estrelladas, células trampa, células epiteliales de las vías biliares, células endoteliales vasculares, fibroblastos y células madre mesenquimales y no están particularmente limitadas. Adicionalmente, estas células incluyen células recogidas directamente de tejidos y líneas celulares y sus tipos no están limitados. El origen de estas células no está particularmente limitado e incluye, por ejemplo, una rata, un ratón, una cobaya, un tití, un conejo, un perro, un gato, una oveja, un cerdo, un chimpancé y un animal inmunodeficiente de los mismos y en el caso del uso de células de tejido hepático en el tratamiento de seres humanos, deseablemente se usan células procedentes de un cerdo y un chimpancé. El medio para cultivar células en la presente invención no está particularmente limitado si el medio es el usado convencionalmente para las células que se van a cultivar.

El número de células sembradas al cultivar en la presente invención varía en función de la especie animal de las células usadas y normalmente no es inferior a $1 \times 10^4/\text{cm}^2$, preferentemente no inferior a $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ y más preferentemente, no inferior a $6 \times 10^4/\text{cm}^2$. Con concentraciones de siembra de menos de $1 \times 10^4/\text{cm}^2$, la proliferación de las células de tejido hepático es inferior para deteriorar la extensión de la expresión de la función de las células de tejido hepático obtenidas y dichas concentraciones no se prefieren en la presente invención.

En la presente invención, las células descritas anteriormente se cultivan en un soporte de cultivo celular cuya superficie está revestida con un polímero que cambia en la fuerza de hidratación en el intervalo de temperaturas de 0 a 80 °C en el intervalo de temperaturas donde la fuerza de hidratación del polímero es débil. Normalmente, la temperatura para cultivar las células es preferentemente 37 °C. El polímero sensible a la temperatura que se usa en la presente invención puede ser bien un homopolímero o bien un copolímero. Un polímero tal incluye, por ejemplo, polímeros descritos en la publicación de patente japonesa A n.º: H02-211865. Específicamente, por ejemplo, el polímero se puede obtener mediante homopolimerización o copolimerización de los siguientes monómeros. Los monómeros que se pueden usar incluyen, por ejemplo, un compuesto de (met)acrilamida, un derivado de (met)acrilamida sustituido con N-(o N,N-di)alquilo y un derivado de éter de vinilo y en el caso de un copolímero, se pueden usar cualesquiera dos o más tipos de estos compuestos. Además, se pueden usar copolímeros con monómeros distintos a los monómeros descritos anteriormente, polímeros de injerto o copolímeros de los polímeros unos con otros y mezclas de los polímeros con los copolímeros. Adicionalmente, es posible reticular el polímero dentro de la gama sin dañar las propiedades inherentes del polímero. El procedimiento para que diversos tipos de polímeros estén revistiendo sobre la superficie de un material base no está particularmente limitado y puede seguir el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa A n.º: H02-211865. Específicamente, dicho revestimiento se puede realizar sometiendo el material base y el monómero o polímero descrito anteriormente a uno cualquiera de irradiación con haces de electrones (EB), irradiación con rayos γ , irradiación con rayos ultravioleta, tratamiento con plasma, tratamiento con corona y reacción de polimerización orgánica o mediante adsorción física, tal como revestimiento y amasado. La cantidad del polímero hidrófilo inmovilizado en el sitio de adhesión celular puede ser una cantidad suficiente para mover las células y no está particularmente limitada y dado que las células que se van a usar son células de tejido hepático, su cantidad de inmovilización no es inferior a $0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, preferentemente no inferior a $0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y más preferentemente, no inferior a $1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. La cantidad del polímero inmovilizado se puede medir de acuerdo con el procedimiento convencional que incluye, por ejemplo, un procedimiento para medir directamente el sitio de adhesión celular con el uso de FT-IR-ATR y un procedimiento para inmovilizar un polímero marcado previamente del mismo modo que se ha descrito anteriormente y estimar la cantidad del polímero inmovilizado a partir de la cantidad del polímero marcado inmovilizado en el sitio en el que se adhiere la célula y se puede usar cualquier procedimiento.

La forma del material base para cultivo en la presente invención no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, una forma de una placa, una multiplaca, un matraz o un inserto celular y una forma de membrana plana. Como el material base al que se proporciona revestimiento, sustancias capaces de dar en general una forma tal como un compuesto polimérico y una cerámica, incluyendo vidrio, vidrio modificado, un compuesto tal como poliestireno y metacrilato de polimetilo que se usan convencionalmente en el cultivo celular se pueden usar todas.

En el soporte para cultivo celular de la presente invención, el polímero sensible a la temperatura que está revistiendo sobre el material base produce hidratación y deshidratación cambiando la temperatura y el intervalo de temperatura se encuentra que es 0 °C a 80 °C, preferentemente 10 °C a 50 °C y más preferentemente, 20 °C a 45 °C. A temperaturas superiores a 80 °C, existe una posibilidad de que las células de tejido hepático mueran y por tanto dichas temperaturas no se prefieren. Adicionalmente, a temperaturas inferiores a 0 °C, en general, bien la velocidad de proliferación de las células se reduce extremadamente o bien las células de tejido hepático mueren y tales temperaturas no se prefieren, .

Cuando las células cultivadas se desprenden y se recuperan del material de soporte en el procedimiento de la presente invención, se permite a las células de tejido hepático cultivadas adherirse a un vehículo, si es necesario y se pueden desprender ya que están junto con el vehículo fijando la temperatura del material base del soporte al que

las células se adhieren a una temperatura de la hidratación del polímero con el que se ha revestido el material base del soporte. En este caso, se puede aplicar un flujo de agua entre la lámina celular y el soporte para realizar el desprendimiento suavemente. Adicionalmente, el desprendimiento de la lámina se puede realizar en el medio de cultivo líquido donde las células se han cultivado o en otras soluciones isotónicas y el procedimiento de desprendimiento se puede seleccionar de acuerdo con el objeto.

Las células de tejido hepático cultivadas en la presente invención no son susceptibles al daño por una enzima proteolítica representada por dispasa, tripsina o similares al cultivar. Por tanto, las células de tejido hepático desprendidas del material base tienen una proteína adherente y cuando las células de tejido hepático se desprenden en forma de una lámina, la estructura desmosómica célula – célula se debe mantener en cierta medida. A causa de esto, la lámina de células de tejido hepático se puede adherir bien al tejido de una parte afectada en el trasplante y el trasplante se puede realizar con eficacia. Se sabe que en general, con respecto a la dispasa de una enzima proteolítica, la estructura desmosómica célula – célula se puede desprender manteniendo del 10 al 40 % de la misma pero una proteína de tipo membrana basal del material célula - base o similar se destruye en su mayoría y de acuerdo con lo anterior, la resistencia de las láminas celulares obtenidas se debilita. Por el contrario, la lámina de células de tejido hepático de la presente invención está en el estado en que no menos del 60 % de la estructura de desmosoma y la proteína de tipo membrana basal permanece y se pueden obtener diversos efectos como se ha descrito anteriormente.

Cuando las células de tejido hepático en la presente invención están en forma de una lámina, la lámina puede ser un laminado de una pluralidad de láminas y el número de laminación no está particularmente limitado. La laminación de la lámina de células de tejido hepático mejora la densidad celular por área de unidad de lámina para mejorar la función como una lámina de células de tejido hepático y por tanto se prefiere.

Lo anterior se explicará tomando poli(N-isopropilacrilamida) como un ejemplo. Se sabe que la poli(N-isopropilacrilamida) tiene una temperatura de disolución límite menor a 31 °C y produce deshidratación en agua a una temperatura no menor de 31 °C si está en un estado libre y la cadena polimérica está coagulada para llegar a estar turbia. Por el contrario, a temperaturas no superiores a 31 °C, la cadena polimérica produce hidratación para llegar a un estado disuelto en agua. En la presente invención, este polímero está revistiendo e inmovilizado sobre la superficie de un material base tal como una placa de petri. De acuerdo con lo anterior, a temperaturas no inferiores a 31 °C, el polímero sobre la superficie del material base produce deshidratación del mismo modo pero la cadena polimérica está revistiendo e inmovilizada sobre la superficie del material base y por tanto la superficie del material base muestra hidrofobicidad. Por el contrario, a temperaturas no superiores a 31 °C, el polímero sobre la superficie del material base produce hidratación pero la cadena está revistiendo e inmovilizada sobre la superficie del material base y por tanto la superficie del material base debe mostrar hidrofiliidad. La superficie hidrófoba en este momento es una superficie adecuada a la que las células se pueden adherir para proliferar y adicionalmente la superficie hidrófoba llega a ser una superficie a la que las células no se pueden adherir y las células o la lámina celular durante el cultivo deben desprenderse únicamente mediante refrigeración.

El vehículo que se usa para permitir que las células de tejido hepático o una lámina de células de tejido hepático se adhieran al mismo es una estructura para sujetar las células de la presente invención y por ejemplo, se puede usar una membrana polimérica o una estructura moldeada a partir de la membrana polimérica, una plantilla metálica o similares como el vehículo. Por ejemplo, en el caso del uso de un polímero como el material del vehículo, los materiales específicos incluyen, por ejemplo, difluoruro de polivinilideno (PVDF), polipropileno, polietileno, celulosa y su derivado, papel, quitina, quitosano, colágeno y uretanos. La forma del vehículo no está particularmente limitada.

En la presente invención, las células de tejido hepático obtenidas o la lámina de células de tejido hepático deben trasplantarse en un sitio predeterminado dentro del organismo vivo. El sitio del trasplante puede ser cualquier sitio dentro del organismo vivo y no está particularmente limitado. El sitio del trasplante incluye, por ejemplo, tejido subcutáneo, tejido intraperitoneal, el hígado y un músculo. El sitio del trasplante puede proporcionarse anteriormente o no con la inducción de la angiogénesis y no está particularmente limitado. En el presente documento, el procedimiento de inducción de la angiogénesis no está particularmente limitado e incluye, por ejemplo, un procedimiento para incluir el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) de un factor de crecimiento sanguíneo en una microesfera y permitir que la microesfera actúe dentro del organismo vivo durante de 8 a 10 días al tiempo que se cambia la composición, el tamaño y el intervalo de inyección de esta microesfera, un procedimiento para cortar una malla de tereftalato de polietileno a cualquier tamaño para preparar una bolsa, situando una solución de agarosa de concentración alta disolviendo el FGF en la bolsa y a partir de ahí eliminando la bolsa después de 8 a 10 días para preparar un espacio inducido por angiogénesis.

Las células de tejido hepático que se van a trasplantar en la presente invención mantienen la proteína de tipo membrana basal y tienen una bioadherencia extremadamente buena. El número de células puede variar en el trasplante en función del objeto y cuando las células que se van a trasplantar están en forma de una lámina, la actividad total de la función del hígado se puede variar cambiando el tamaño o la forma de la lámina.

Cuando el procedimiento para mantener las células de tejido hepático durante un periodo de tiempo largo de la presente invención se usa para seres humanos, las células de tejido hepático trasplantadas o la lámina de células de

- tejido hepático trasplantada van a expresar la función del hígado en el organismo vivo humano durante un periodo de tiempo largo para llegar a un hígado artificial como tal. Cuando las células de tejido hepático desprendidas están en forma de una lámina, la cantidad de expresión de la función se puede controlar con el tamaño o la forma de la lámina o ambos. Dicho hígado artificial se usa con el objeto del tratamiento sustancial de cada enfermedad ilustrada
- 5 por deficiencia de enzima hepática, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa o ayuda en la función del hígado y su uso no está particularmente limitado. Cuando la hemofilia se explica aquí, la deficiencia de factor VIII de coagulación de la sangre humano y/o de factor IX de coagulación de la sangre humano es la causa del inicio sustancial de hemofilia y el hígado artificial de la presente invención es para producir estos factores para
- 10 suplementarlos. En este caso, con el fin de aumentar su capacidad de producción, por ejemplo, se puede introducir un gen eficaz para la producción del factor VIII de coagulación de la sangre humano y/o del factor IX de coagulación de la sangre humano en la lámina de células de tejido hepático de la presente invención como la técnica convencional y su procedimiento no está particularmente limitado.
- 15 Cuando el procedimiento para mantener las células de tejido hepático durante un periodo de tiempo prolongado de la presente invención se usa para animales, las células de tejido hepático trasplantadas o la lámina de tejido hepático trasplantada van a expresar la función del hígado en los organismos vivos de los animales, en otras palabras, van a llegar a los animales trasplantados con células de tejido hepático como tales. Cuando las células de tejido hepático desprendidas están en forma de una lámina, la cantidad de expresión de la función se puede
- 20 controlar por el tamaño o la forma de la lámina o ambos. Los animales que se usan en el presente documento incluyen, por ejemplo, una rata, un ratón, una cobaya, un tití, un conejo, un perro, un cerdo, un chimpancé y un animal inmunodeficiente de los mismos y no están particularmente limitados. Dichos animales trasplantados con células de tejido hepático se usan, por ejemplo, con el objeto del sistema de evaluar la función del hígado administrando una sustancia de ensayo a este animal al que se han trasplantado las células de tejido hepático para
- 25 juzgar la influencia de la sustancia de ensayo sobre la función del hígado o similares, pero su uso no está particularmente limitado a ello.

EJEMPLOS

- 30 La presente invención se explicará ahora en detalle en base a ejemplos que de ningún modo limitan la presente invención.

Ejemplo 1

- 35 Un material base de cultivo celular, se revistió con poli(N-isopropilacrilamida) de un polímero sensible a la temperatura a $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y sobre ello se cultivaron células de tejido hepático (número de células de siembra: 2×10^4 , 37°C , 5 % de CO_2). Tras tres días se confirmó que las células de tejido hepático sobre el material base de cultivo celular llegaban a ser confluentes y a partir de ahí se seleccionó papel de pergamino (SS-25) como un vehículo para
- 40 mover las células cultivadas y dejar reposar sobre la lámina de células cultivadas. Se permitió que las células de tejido hepático cultivadas se adhirieran al SS-25 y el material base de cultivo celular se enfrió a 20°C durante 60 minutos. Después de enfriar, la lámina de células desprendidas se recogió del vehículo y se trasplantó por vía subcutánea en un ratón de acuerdo con el procedimiento de trasplante de células de tejido hepático como se muestra más adelante.

- 45 Procedimiento para trasplantar lámina de células hepáticas

(1) Se somete a un ratón a anestesia general. Un dispositivo de liberación sostenida obtenido disolviendo bFGF en agarosa se inserta por vía subcutánea en el ratón y se somete a inducción de angiogénesis en diez días.

- 50 (2) Las células hepáticas se separan y se cultivan durante tres días para producir un estado de confluencia.

(3) La circunferencia de las células hepáticas confluentes se desprende con la punta de una pipeta.

- (4) Tras aproximadamente 20 minutos (que varían en función del lote de la placa), el SS-25 que se ha cortado hasta un tamaño ligeramente más grande que el tamaño de la lámina de células hepáticas y se ha humedecido ligeramente con el medio se coloca en la lámina de células hepáticas y se deja reposar durante 30 segundos.
- 55

(5) Solo se eleva parte de la lámina de células hepáticas en el lado externo del SS-25 y desde ahí se inicia cuidadosamente el desprendimiento de la lámina de células hepáticas.

60

(6) Se somete al ratón a anestesia general. Se retira el dispositivo y las células hepáticas desprendidas con el SS-25 unidas se colocan en el espacio subcutáneo del ratón que ha sufrido inducción de angiogénesis y después de esperar durante aproximadamente 20 segundos, se inicia cuidadosamente el desprendimiento del SS-25 de la lámina de células hepáticas.

65

(7) La herida se cierra.

La sección del tejido de la parte trasplantada 120 días después del trasplante se muestra en la figura 1 y la figura 2. La fotografía aumentada en la figura 1 es un aumento de tamaño del interior de un rectángulo en la figura. Adicionalmente, la parte teñida con HE, la parte que tiñe hAAT y la parte que tiñe albúmina se muestran en figura 2, respectivamente. La función del hígado se confirmó midiendo las concentraciones de hAAT en suero murino de acuerdo con el procedimiento convencional. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3. Se puede entender que de acuerdo con la técnica de la presente invención, la lámina de células de tejido hepático trasplantada en el sitio que ha sufrido la inducción de angiogénesis con bFGF expresa la función del hígado durante un periodo de tiempo largo.

Ejemplo comparativo 1

Se llevó a cabo el mismo experimento que en el ejemplo 1 salvo que el dispositivo de liberación sostenida obtenido disolviendo bFGF en agarosa no se insertó por vía subcutánea en el ratón y el ratón no sufrió la inducción de angiogénesis. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.

Ejemplo 2 y ejemplo comparativo 2

Un material base de cultivo celular, se revistió con poli(N-isopropilacrilamida) de un polímero sensible a la temperatura a $1,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y sobre ello se cultivaron células de tejido hepático (número de células de siembra: 2×10^4 , 37°C , 5 % de CO_2). Tres días después de cultivar, la temperatura del material base de cultivo se fijó a 20°C y se enfrió durante 15 minutos para recuperar una lámina de células de tejido hepático. La lámina de células de tejido hepático se aplicó a una nueva placa de cultivo y se volvió a cultivar para preparar un grupo de láminas tisulares hepáticas (Fig. 4a) (Ejemplo 2). Adicionalmente, tratando las células cultivadas en las mismas condiciones con colagenasa de una enzima proteolítica al mismo tiempo para dividir individualmente las células, las células se recuperaron en un estado dividido y a partir de ahí se volvieron a cultivar en una nueva placa de cultivo para preparar un grupo de hepatocitos individual (ejemplo comparativo 2). La cantidad de alfa-1 antitripsina humana (Fig. 4c) y la cantidad de albúmina (Fig. 4b) que se produjeron en el medio de cultivo 24 horas después de iniciar la repetición del cultivo se evaluaron comparando ambos grupos. En cuanto a la figura 4c, se añadió 1 mg de lidocaína al medio de cultivo 24 horas después de iniciar la repetición del cultivo y se midió la cantidad de lidocaína que queda en el medio de cultivo cuatro horas después de la adición de lidocaína y la evaluación se realizó midiendo la cantidad de lidocaína metabolizada mediante las células cultivadas de ambos grupos. Los valores respectivos se proporcionan en base al número de las células recultivadas de 1×10^5 . En todas las evaluaciones de a a c, el grupo de la lámina de tejido hepático obtuvo un resultado significativamente bueno ($P < 0,01$) Se entiende que de acuerdo con la técnica de la presente invención, la lámina de células de tejido hepático expresa la función del hígado en un periodo de tiempo prolongado.

Ejemplo 3 y ejemplo comparativo 3

La lámina de células de tejido hepático murino como se obtiene en el ejemplo 1 se trasplantó mediante aplicación en un sitio subcutáneo murino que ha sufrido la inducción de angiogénesis de acuerdo con el procedimiento de trasplantar una lámina de células hepáticas como se muestra en el ejemplo 1. Ciento veinte días después del trasplante, se administró 3-metilcolantreno (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) por vía intraperitoneal una vez al día y de forma continua durante tres días y 24 horas después de la administración final, se sacrificó al ratón y el tejido hepático preparado se sometió a tinción del tejido (ejemplo 3). Con el tejido hepático subcutáneo murino preparado (ejemplo comparativo 3) sin administrarse 3-metilcolantreno, no se indujo CYP1A de una enzima metabolizadora de fármacos mientras que con el tejido hepático subcutáneo murino preparado administrado con 3-metilcolantreno, se indujo fuertemente CYP1A. Se puede entender que de acuerdo con la técnica de la presente invención, la lámina de células de tejido hepático expresa la función del hígado durante un periodo de tiempo prolongado. Adicionalmente, CYP1A significa actividad de CYP1A.

Ejemplo 4

Se preparó una lámina de tejido hepático más grande de acuerdo con el procedimiento según se muestra en el ejemplo 1 laminando las láminas de células de tejido hepático murino en trasplante. Específicamente, se prepararon un grupo (marca Δ en la Fig. 6) obtenido trasplantando una lámina de tejido hepático murino en el sitio subcutáneo murino que ha sufrido la inducción de angiogénesis y un grupo (marca \circ en la Fig. 6) obtenido trasplantando las dos láminas. Con los dos grupos, la concentración de alfa-1 antitripsina humana en sangre de los ratones trasplantados se midió hasta 140 días después del trasplante y la evaluación se realizó examinando la estabilidad del tejido trasplantado y el cambio de la cantidad del tejido. Se ha encontrado que con el grupo al que se han trasplantado las dos láminas de células de tejido hepático, se preparó un tejido significativamente grande en comparación con el grupo al que se ha trasplantado una lámina y además el tejido existe de forma estable.

UTILIDAD INDUSTRIAL

El uso del procedimiento para mantener la función de las células de tejido hepático durante un tiempo prolongado

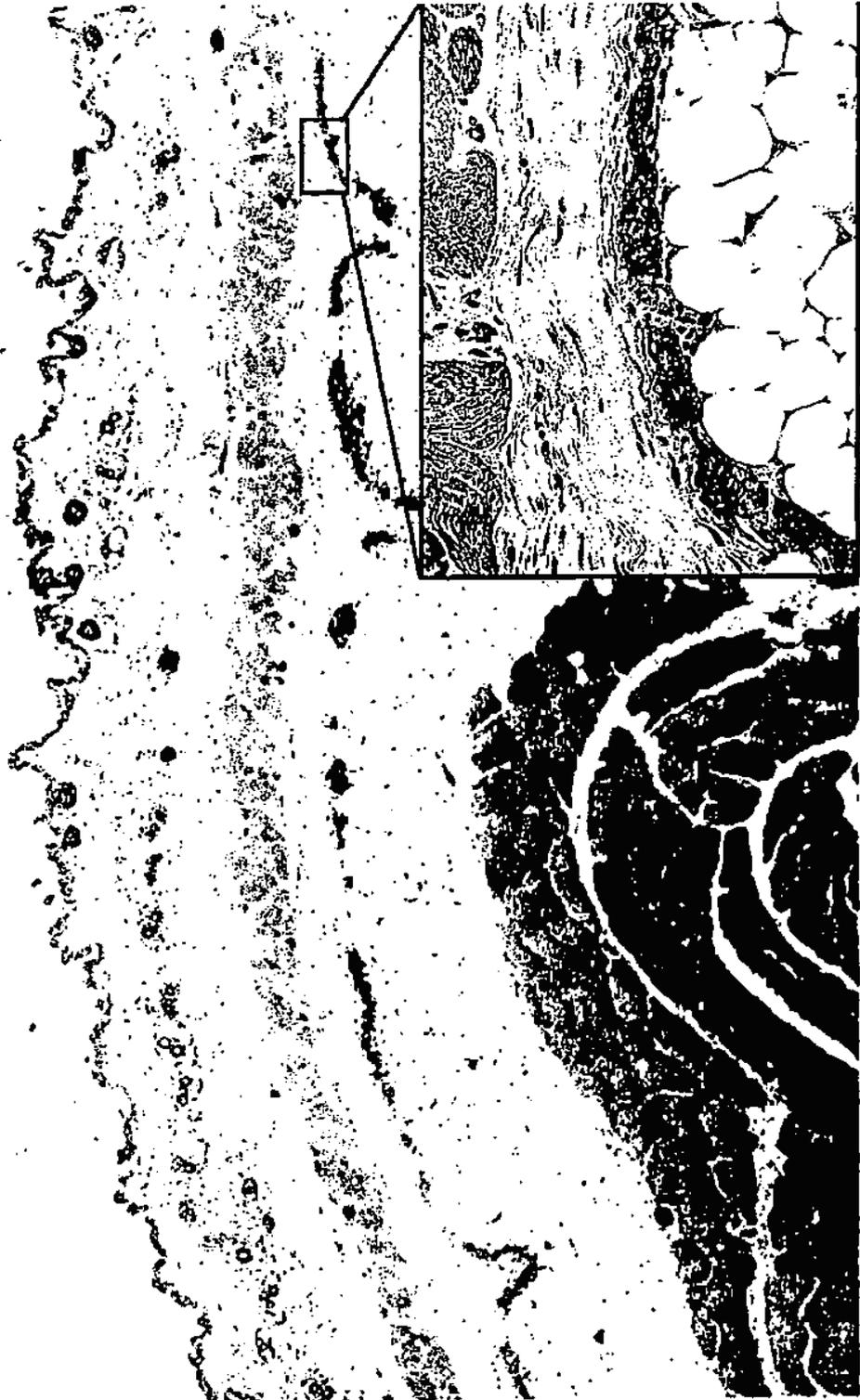
como se muestra en el presente documento permitiría el mantenimiento prolongado de la función de células de tejido hepático cultivadas, permitiría llevar a cabo investigación fundamental a largo plazo en relación con la función del hígado y también permitiría la producción de hígados artificiales y animales a los que se han trasplantado células de tejido hepático que requieren la expresión de la función del hígado durante un periodo de tiempo prolongado.

5

REIVINDICACIONES

1. Una lámina de células de tejido hepático que comprende al menos células parenquimatosas hepáticas obtenidas de tejido hepático para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o para su uso en la ayuda en la función del hígado, en el que la lámina se obtiene mediante cultivo de las células de tejido hepático que comprenden al menos células parenquimatosas hepáticas obtenidas de tejido hepático en un soporte de cultivo celular cuya superficie está revestida por un polímero que muestra un cambio en la fuerza de hidratación en el intervalo de temperaturas de 0 a 80 °C dentro del intervalo de temperaturas donde la fuerza de hidratación del polímero es débil, a partir de ahí, cambiar la temperatura del medio de cultivo líquido hasta un nivel al que la fuerza de hidratación del polímero llega a ser fuerte para desprender las células de tejido hepático cultivadas, que son adecuadas para el trasplante en un sitio bien definido en el organismo vivo de un animal incluyendo un ser humano.
2. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o para su uso en la ayuda a la función del hígado, en el que la función del hígado se puede variar cambiando el tamaño y/o la forma de la lámina.
3. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o para su uso en la ayuda a la función del hígado, caracterizada porque dicha lámina produce al menos uno de factor VIII de coagulación de la sangre humano, factor IX de coagulación de la sangre humano, alfa-1 antitripsina humana y albúmina.
4. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o para su uso en la ayuda a la función del hígado, en la que en el tratamiento de la hemofilia se introduce en la lámina de células de tejido hepático un gen eficaz para la producción del factor VIII de la coagulación de la sangre humano y/o el factor IX de la coagulación de la sangre humano.
5. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o para su uso en la ayuda a la función del hígado, en la que el sitio para el trasplante es tejido subcutáneo, tejido intraperitoneal, el hígado o un músculo dentro del organismo vivo.
6. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o para su uso en la ayuda a la función del hígado, en la que se proporciona previamente un tratamiento de la inducción de la angiogénesis en el sitio para el trasplante.
7. La lámina de células de tejido hepático de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de cada enfermedad ilustrada por deficiencia de enzimas hepáticas, hemofilia, coagulopatía, insuficiencia hepática, hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática, un paciente con resección hepática y una enfermedad infecciosa, o para su uso en la ayuda a la función del hígado, en la que el procedimiento de inducción de la angiogénesis se realiza mediante tratamiento con FGF.
8. Uso de un animal no humano trasplantado con una lámina de células de tejido hepático según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para evaluar la función del hígado que comprende juzgar la función del hígado sometido a la influencia de una sustancia de ensayo después de haberse administrado dicha sustancia de ensayo al animal no humano.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el animal es una rata, un ratón, una cobaya, un tití, un conejo, un perro, un cerdo, un chimpancé o un animal inmunodeficiente de los mismos.

Fig. 1



Tinción HE

Fig. 2

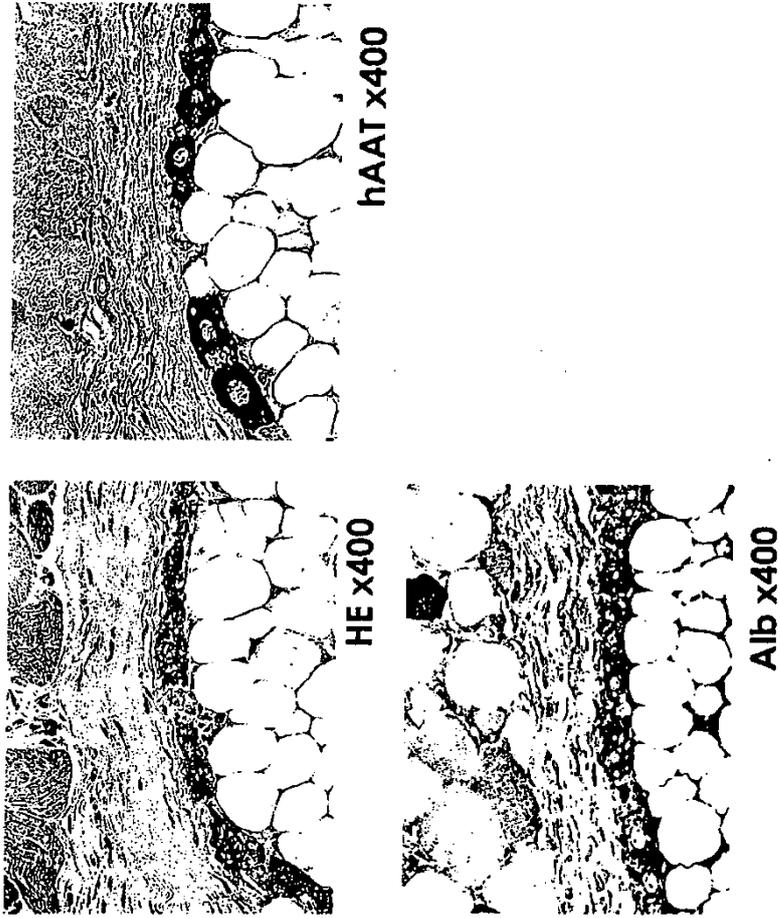


Fig. 3

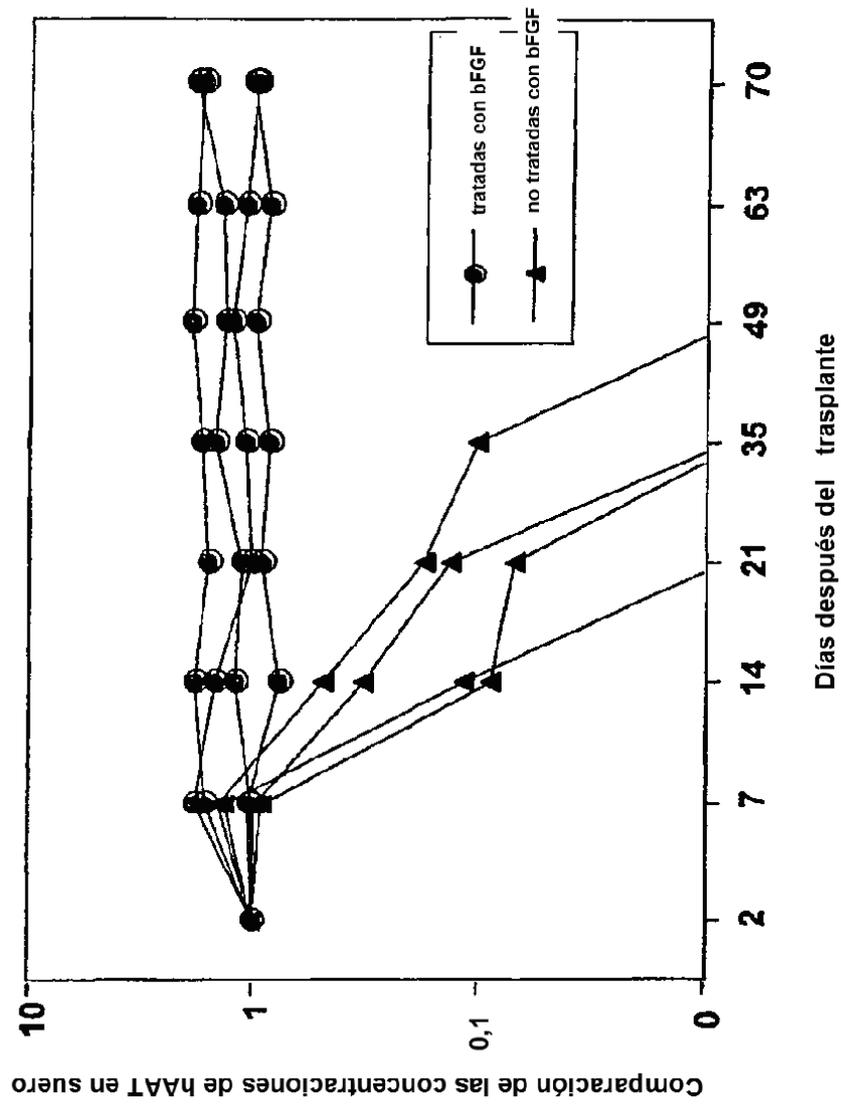


Fig. 4

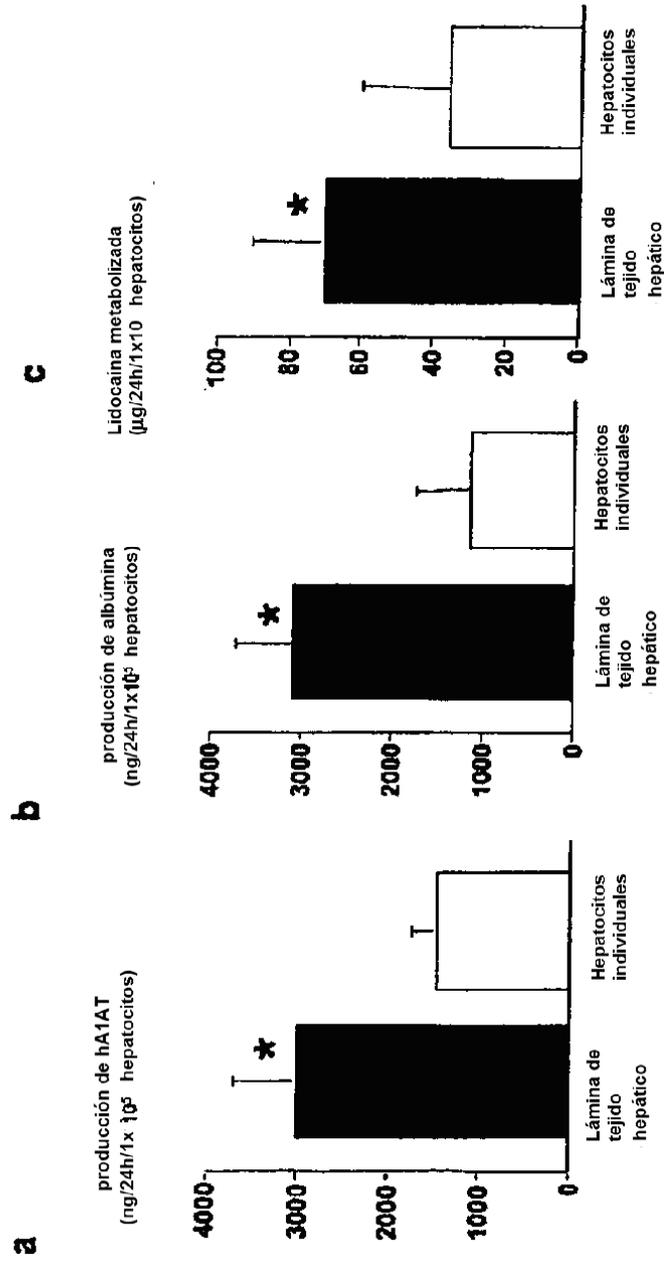


Fig. 5

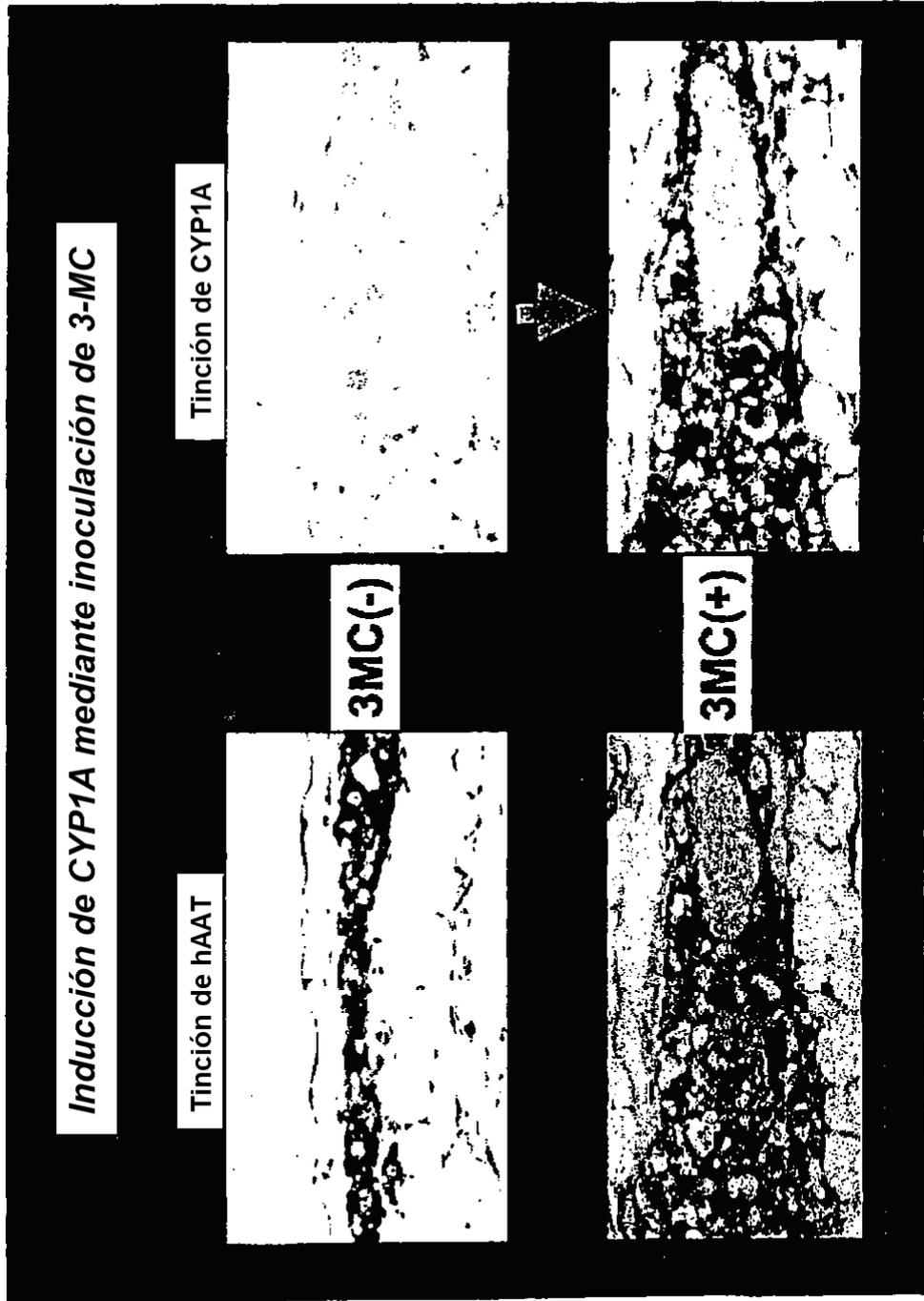


Fig. 6

