

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 742**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2011 PCT/US2011/042805**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO2012003450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11801493 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2588083**

54 Título: **Andamios de biomatriz**

30 Prioridad:

02.07.2010 US 360939 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**WANG, YUNFANG;
RIED, LOLA, CYNTHIA, MCADAMS;
YAMAUCHI, MITSUO;
CUI, CAI-BIN;
WANG, ANDREW, ZHUANG y
WERNER, MICHAEL, EDWARD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 624 742 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

Andamios de biomatriz

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a andamios de biomatriz y métodos para producir andamios de biomatriz y su uso en diversas aplicaciones como andamios intactos o como andamios que se seccionan o pulverizan y se dispersan de diversas maneras para usos experimentales y clínicos específicos.

10

Antecedentes de la invención

15 La capacidad de utilizar células diferenciadas *ex vivo* o en programas clínicos tales como terapias celulares depende de la capacidad de mantener a las células con un fenotipo adulto y completamente funcionales o de ser capaces de restringir el linaje a las células madre o progenitoras ("madre/progenitoras") para lograr ese fenotipo adulto. La revolución en curso en la investigación con células madre ha hecho posible la identificación y aislamiento de poblaciones de células madre/progenitoras, que incluyen las de tejidos embrionarios, fetales y posnatales¹. La capacidad de identificar y aislar las células madre/progenitoras para todos los tipos de células adultas y de expandirlas y diferenciarlas aumenta enormemente el potencial para utilizarlas en programas de investigación farmacéuticos e industriales, en investigaciones académicas y en programas clínicos tales como terapias basadas en células, e ingeniería de tejidos².

25 Los métodos actuales para mantener las células diferenciadas o restringir el linaje de las células madre a un destino adulto *ex vivo* tienen un éxito parcial e implican sembrar las células o incorporarlas en un sustrato de uno o más componentes de la matriz extracelular y en un medio compuesto de hormonas específicas, factores de crecimiento y nutrientes adaptados para el fenotipo adulto deseado. Para las células madre muy primitivas, tales como las células madre embrionarias (ES) o las células madre pluripotentes inducidas (iPS) o las derivadas de manera postnatal, que pueden seguir múltiples destinos adultos, tales como células madre mesenquimales (MSC) o células madre derivadas de líquido amniótico (AFSC), las células madre se someten a una mezcla de señales solubles y/
30 componentes de la matriz extracelular y deben tratarse con múltiples conjuntos de estas señales durante semanas. Típicamente, el fenotipo adulto que se logra es distinto con cada preparación y tiene sobre o baja expresión de determinados genes específicos para adultos y/o regulación aberrante de uno o más de los genes específicos de tejidos adultos.

35 La matriz extracelular es secretada por las células, está adyacente a ellas en una o más de sus superficies, y desde hace tiempo se ha entendido como el soporte estructural para las células⁷. Es un andamio extraordinariamente complejo compuesto de una variedad de moléculas biológicamente activas que están muy reguladas y son fundamentales para determinar la morfología, el crecimiento y la diferenciación de las células unidas⁸. La expresión génica específica de tejidos en células cultivadas se mejora mediante el cultivo de las células en extractos de matriz o componentes purificados de la matriz⁹. Sin embargo, los componentes individuales de la matriz, solos o en
40 combinación, son incapaces de recapitular la química y la arquitectura complejas de una matriz del tejido. Esto se relaciona con el hecho de que los componentes de la matriz se encuentran en gradientes asociados con zonas tisulares naturales y con estructuras histológicas tales como vasos sanguíneos. Esta complejidad de la matriz tisular se logra más fácilmente mediante extracciones que descelularizan un tejido y dejan atrás la matriz como residuo^{10,11}.
45 Sin embargo, los actuales protocolos de descelularización dan como resultado pérdidas importantes de algunos de los componentes de la matriz debido al uso de enzimas que degradan la matriz o tampones que solubilizan los componentes de la matriz. A partir de la técnica anterior se conoce (Ross y otros, J.A.M. Soc. Nephrol 2009, 20, 11, 2338-2347 and Shupe Organogenesis, 2010, 6, 2, 134-136) el uso de tratamientos tanto con SDS como con Triton o SDS solo (documento núm. WO2010/039823). Sin embargo, estos detergentes duros pueden dañar la matriz extracelular.
50

La presente invención proporciona andamios de biomatriz y métodos para obtener y utilizar tales andamios de biomatriz. Los métodos de esta invención dan como resultado la producción de un extracto de especificidad tisular, enriquecido mayoritariamente de los colágenos del tejido y con componentes de unión a la matriz y hormonas, factores de crecimiento y citocinas unidos a la matriz que en conjunto producen efectos de diferenciación más reproducibles y potentes tanto en células maduras como en la restricción del linaje de poblaciones de células madre/progenitoras.
55

Resumen de la invención

60 La presente invención proporciona, en un aspecto, un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido hepático de mamífero, que comprende las etapas de: a) perfundir u homogeneizar el tejido hepático con un primer medio, en donde la osmolalidad de dicho primer medio es de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg y dicho primer medio está libre de suero y a pH neutro; después b) perfundir el
65 tejido biológico o extraer el homogeneizado de la etapa (a) con un tampón de deslipidación que comprende lipasas y/o detergentes en dicho primer medio; después c) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (b) con

- un tampón a un pH neutro y que comprende una concentración de sal de aproximadamente NaCl 2,0 M a aproximadamente 5,0 M, la concentración elegida para mantener los colágenos insolubles identificados en el tejido biológico; después d) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (c) con RNAasa y DNAasa en un tampón; y después e) enjuagar el tejido u homogeneizado de la etapa (d) con un segundo medio que está a pH neutro, está libre de suero y tiene una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, para producir de esta manera un andamio de biomatriz intacto u homogeneizado a partir del tejido biológico, dicho andamio de biomatriz comprende al menos el 95 % de los colágenos y la mayor parte de los componentes de la matriz asociados al colágeno y factores de crecimiento, hormonas y citocinas unidos a la matriz del tejido biológico.
- Además, la presente invención proporciona un andamio de biomatriz que comprende colágenos, fibronectinas, lamininas, nidógeno/entactina, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, factores de crecimiento, citocinas o cualquier combinación de estos, donde todos forman parte del andamio de biomatriz.
- En aspectos adicionales, la presente invención proporciona un método para producir un cultivo celular, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de la etapa (a) con un medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; y c) sembrar el andamio de biomatriz de la etapa (b) con células, para producir de esta manera un cultivo celular.
- En la presente descripción se proporciona además un método para producir un cultivo celular, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) congelar el andamio de biomatriz de la etapa (a); c) preparar una sección congelada del andamio de biomatriz de la etapa (b) como un sustrato de cultivo celular; d) poner en contacto el sustrato de cultivo celular de la etapa (c) con un medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; y e) sembrar el sustrato de cultivo celular de la etapa (d) con células, para producir de esta manera un cultivo celular.
- Además, la presente invención proporciona un método para producir un cultivo celular, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) triturar el andamio de biomatriz de la etapa (a) hasta obtener un polvo (por ejemplo, en algunas modalidades, después de congelar el andamio de biomatriz de la etapa (a)); c) recubrir al menos parte de un aparato de cultivo con el polvo de la etapa (b) para producir un sustrato de cultivo celular; d) poner en contacto el sustrato de cultivo celular de (c) con medio de cultivo celular en el aparato de cultivo; y e) sembrar el sustrato de cultivo celular de (d) con células, para producir de esta manera un cultivo celular. En modalidades particulares de este método, la trituración del andamio de biomatriz puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un molino con congelación a temperaturas del nitrógeno líquido, o cercanas a estas.
- En la presente descripción se proporciona además el uso del andamio de biomatriz de especificidad tisular de esta invención para facilitar la diferenciación de células madre embrionarias o células pluripotentes inducidas hacia un destino específico, así como el uso del andamio de biomatriz de especificidad tisular de esta invención para facilitar la diferenciación de células madre derivadas de líquido amniótico o células madre mesenquimales de médula ósea, tejido adiposo o cualquier tejido fetal o postnatal o cualquier célula madre determinada (por ejemplo, de intestino, pulmón, árbol biliar, riñón, piel, corazón) hacia un destino adulto específico.
- En modalidades adicionales, la presente invención proporciona un método para aumentar y acelerar la diferenciación de células madre y/o progenitores a células maduras, que comprende producir un cultivo celular de acuerdo con los métodos de esta invención, en donde las células son células madre y el medio de cultivo celular se formula para células maduras, y de esta manera aumentar y acelerar la diferenciación de células madre y/o progenitores a células maduras.
- Se describe además un método para suministrar células a un sujeto, que comprende sembrar el andamio de biomatriz de esta invención con células y después trasplantar al sujeto, el andamio de biomatriz sembrado con las células.
- En la presente descripción se proporciona, además, un método para identificar el potencial metastásico de células tumorales en un tipo de tejido, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; y e) controlar el crecimiento de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (d), en donde el crecimiento de las células tumorales en el andamio de biomatriz identifica que las células tumorales pueden colonizar *in vivo* el tipo de tejido del que se produjo el andamio de biomatriz, lo que identifica de esta manera el potencial metastásico de las células tumorales en el tipo de tejido.
- Además, la presente invención proporciona un método para identificar una célula tumoral como sensible a un tratamiento antitumoral, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en

condiciones de cultivo; e) aplicar el tratamiento antitumoral a las células tumorales en el andamio de biomatriz; y f) controlar el crecimiento de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (e), en donde la ausencia de crecimiento de las células tumorales y/o la muerte de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (e) identifica a las células tumorales como sensibles al tratamiento antitumoral.

5 La presente invención proporciona además un método para producir un injerto tumoral para el trasplante a un animal huésped; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; y e) establecer una población de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (d), para producir de esta manera un injerto tumoral para un trasplante en el animal huésped.

10 Otras modalidades de esta invención incluyen un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico para dispersión a escala industrial sobre un aparato de cultivo; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) diluir el andamio de biomatriz de (a) en medio basal; c) congelar el andamio de biomatriz de (b) a aproximadamente -80 °C; d) pulverizar el andamio de biomatriz de (c) mediante trituración criogénica a partículas de la biomatriz que tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 100 µm; e) descongelar las partículas de la biomatriz de (d) en suspensión en medio basal; y f) dispersar las partículas de la biomatriz de la etapa (e) sobre un aparato de cultivo, para producir de esta manera un andamio de biomatriz a partir de tejido biológico para dispersión a escala industrial sobre un aparato de cultivo.

15 En otras modalidades, la presente invención proporciona un método para producir partículas virales de un virus dependiente del linaje; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células de un tipo y una etapa del linaje que pueden ser infectadas con el virus dependiente del linaje; d) infectar las células de (c) con el virus dependiente del linaje; e) mantener las células infectadas en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo; y f) recolectar partículas virales producidas en las células infectadas, para producir de esta manera partículas virales del virus dependiente del linaje.

20 La presente invención proporciona además un método para producir un organoide formado por recelularización de un andamio de biomatriz; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células del mismo tipo de tejido que el tejido biológico usado para preparar el andamio de biomatriz; d) mantener las células en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo, con lo que se forman organoides a partir de las células, para producir de esta manera un organoide formado mediante recelularización del andamio de biomatriz.

25 En la presente descripción se proporciona además un método para producir una proteína de interés en células cultivadas en un andamio de biomatriz; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células que producen la proteína de interés; d) mantener las células de (c) en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo; y f) recolectar la proteína de interés producida por las células de (d), para producir de esta manera una proteína de interés en células cultivadas en un andamio de biomatriz. Tratamiento con nucleasa para la eliminación de ácidos nucleicos. (B-D) Cuatro etapas en la preparación de un andamio de biomatriz de rata. (B) Después del lavado por perfusión con medio basal durante 10 minutos el hígado se vuelve pálido; (C) durante la deslipidación, el hígado se vuelve parcialmente transparente bajo GC (D) el andamio intacto final parece transparente a los 40 minutos de perfusión; (E) el andamio de biomatriz mostrado a un bajo aumento. (E1) La visualización del andamio perfundido con partículas de dextrano marcadas con rodamina demuestra el flujo progresivo desde vasos grandes a las ramas finas de los vasos sanguíneos a lo largo de los canales sin fugas, lo que indica una vasculatura evidente en los andamios. La tinción correspondiente con hematoxilina y eosina (H&E) del andamio de biomatriz en diferentes etapas demostró que las estructuras histológicas tales como los vasos sanguíneos y la matriz tipo encaje que envuelve el parénquima se conservan, mientras que las células se eliminan. La estructura normal de tríada portal hepática en la rata que consiste en la vena porta (PV), la arteria hepática (HA) y el conducto biliar (BD) (B1); las fibras de la matriz se vuelven evidentes a medida que las células se eliminan gradualmente durante el proceso de descelularización (C1); región de la tríada portal descelularizada, comparar (B1) con la de (D1); D2 y D3 muestran que todas las células se eliminan del andamio de matriz, pero se conservan las estructuras de malla tales como los vasos sanguíneos, GC y la matriz tipo encaje que rodea la muralia de células parenquimatosas.

30 Figuras 2A-H. Imágenes de TEM (A-C) y SEM (D-H) de andamios de biomatriz de hígado de rata. (A) Imagen a poco aumento de un vaso sanguíneo (BV) con una pared gruesa (W). El colágeno tipo I (punta de flecha grande) es abundante y contiene secciones transversales de fibras individuales que no absorben tinciones de metales pesados (puntos blancos, puntas de flecha pequeñas). (B) El mayor aumento de la pared de un vaso muestra la membrana basal (flecha grande), elastina amorfa (*) y fibras elásticas asociadas, un resto raro de vesículas con membrana

(punta de flecha pequeña), una fibra en bandas de colágeno tipo I (punta de flecha) y fibrillas pequeñas (flechas pequeñas). Las fibrillas pequeñas son probablemente fibrilina (colágeno tipo VI) que se asocia estrechamente con el colágeno tipo I y ayuda a organizarlo. (C) Imagen a gran aumento del colágeno tipo I con un patrón de bandas de 64 nm (flechas). (D) Imagen a bajo aumento de un vaso con pared delgada (BV) y la pared de un vaso más grande (W). (E) A mayor aumento, la pared del vaso grande (W) es festoneada, consistente con la arteria hepática de una tríada portal, ver (A). Debajo de la pared hay numerosos haces de colágeno tipo I (flecha grande) unidos por fibrillas de colágeno delgadas, reticulares (tipo III), largas y ramificadas. (F) Un gran haz de colágeno tipo I tiene fibras paralelas características (flecha grande) asociadas con una variedad de fibras más pequeñas (flecha) y fibras nodulares o en forma de cuentas (punta de flecha). (G) Malla 3D de fibras grandes/pequeñas interconectadas en un plano que forma un límite tal como para un sinusoides hepático. (H). Imagen a mayor aumento de la malla que muestra una variedad de fibras (flechas): Colágeno tipo III (mayor diámetro recto), fibras elásticas o colágeno tipo VI.

Figuras 3A-B. Análisis químico de colágenos y expresión de componentes de la matriz extracelular (ECM) en los andamios de biomatriz. (A) El contenido de tres aminoácidos, los cuales se encuentran en los colágenos: hidroxiprolina (Hyp), hidroxilisina (Hyl) y glicina (Gly). Los números representan los residuos de cada aminoácido/1000 aminoácidos. Los datos indican el drástico aumento en el contenido de colágeno en el proceso de descelularización que va de <0,2 % en el hígado a más del 15 % en los andamios de biomatriz. (B) La tinción inmunohistoquímica de moléculas de la matriz en andamios de biomatriz, muestra una distribución en los andamios de biomatriz hepática de laminina (LAM), sulfato de heparán (HS), colágeno tipo III (COL3) y fibronectina (FN) y proteínas típicas de la membrana basal en asociación con restos de vasos sanguíneos. A mayor aumento, pueden observarse los miembros principales de la membrana basal, que incluyen colágeno tipo IV (COL4), entactina (Ent, denominada además nidógeno), laminina (LAM) y perlecán (Per), una forma de HS-PG en la porción de los andamios cercana a las tríadas portales.

Figuras 4A-D. Patrón de los componentes de ECM desde la tríada portal hasta la vena central en andamios de biomatriz. Comparación histológica desde la tríada portal (zona 1) hasta la vena central (zona 3) de un hígado normal (A) y un andamio de biomatriz hepática (B); ambas son secciones teñidas con hematoxilina/eosina. (C) El modelo que ilustra una célula madre y un sistema de linaje de maduración en el hígado con componentes representativos de la matriz que muestra la formación de patrones asociados con la zonificación hepática. Los componentes se enumeran en orden de abundancia a partir de los hallazgos de inmunohistoquímica. Las etapas de linaje conocidas dentro de los hígados humanos comienzan periportalmente en la zona 1 (alrededor de las tríadas portales) y progresan en la maduración para terminar con células apoptóticas en la zona 3. La química conocida de la matriz identificada en el nicho de células madre del hígado está compuesta de hialuronanos, colágeno tipo III, una forma de laminina que se une a la integrina $\alpha 6 \beta 4$ y una forma sulfatada débilmente de CS-PG^{43,44}. Justo fuera del nicho de células madre se encuentra el colágeno tipo IV, normalmente con CS-PG sulfatados y HS-PG y formas de laminina que se unen a la integrina $\alpha \beta 1$. Se ha documentado que los HP-PG se ubican exclusivamente de manera pericentral^{45,46}. (D) El estudio de los componentes de la matriz y su ubicación en el hígado frente a los de los andamios de biomatriz, datos resumidos de los hallazgos de inmunohistoquímica (N/D = no analizado. *Otros han informado que se encuentran exclusivamente cerca de las venas centrales). La mayoría de los componentes del citoesqueleto se pierden durante los lavados, quedan presentes residuos de algunas, pero no de todas, las proteínas citoesqueléticas. Los andamios no tienen cantidades detectables de tubulina, desmina y actina (ensayos de faloidina). Sin embargo, existen cantidades trazas de citoqueratinas diseminadas al azar en los andamios; cantidades traza de α -actina del músculo liso alrededor de restos de vasos sanguíneos en las tríadas portales; y niveles bajos de vimentina en todas partes.

Figuras 5E-I. Caracterización de hHpSC sobre andamios de biomatriz hepática frente a hHpSC sobre colágeno tipo 1. Las imágenes de contraste de fase (A-D) muestran los cambios morfológicos de las colonias de hHpSC derivadas del mismo hígado y cultivadas en medio de Kubota libre de suero y sobre plástico de cultivo de tejido (A), una de las condiciones para la autorreplicación, frente a las condiciones de diferenciación del medio de diferenciación libre de suero para el hígado, y sobre colágeno tipo I (B) frente a los andamios de biomatriz hepática bovino (C-E). Los cultivos funcionales y completamente viables no duraron más de ~ 2 semanas en colágenos tipo I. Por el contrario, aquellas en andamios de biomatriz hepática estaban viables y sanas y con un repertorio completo de funciones que duraron al menos un mes. Los cultivos indujeron una transición en las células hacia los días 7-12 con un aumento de la relación citoplásmica/nuclear y una expresión marcada de glucógeno (C) y después a unas con morfología clásica de hepatocitos poligonales intercalados por canalículos biliares claros (D), una morfología de cultivo que persistió después, según lo indicado en el cultivo representativo en el día 24 (E). Los ensayos de RT-PCR muestran cambios en la expresión génica de hHpSC en condiciones de autorreplicación en plástico de cultivo (F) frente a andamios de biomatriz hepática de rata en el día 7 (G). Se comparó la expresión de los marcadores de hHpSC, que incluyen CXCR4 y EpCAM; genes hepatocíticos tempranos que incluyen CK19 (KRT19), HNF6, FOXA2, AFP y niveles bajos de albúmina; marcadores hepatocíticos maduros que incluyen niveles altos de albúmina (ALB), transferrina (TF), CYP450-3A4, tirosina aminotransferasa (TAT) y glucosa-6-fosfatasa (G6PC) y genes colangiocíticos, que incluyen CFTR, gamma glutamil transpeptidasa (GGT1) intercambiador aniónico 2 (AE2) y transportador de ácido biliar dependiente de sodio apical (ASBT). Ensayos bioquímicos que miden la urea (H) sintetizada en cultivos sobre colágeno tipo I frente a andamios de biomatriz hepática de rata y actividad de CYP450-3A4 (I) en cultivos sobre colágeno tipo I frente a andamios de biomatriz preparados a partir de hígados de rata o de bovino. La Tabla 7 proporciona un resumen de las medidas cuantitativas que comparan la unión, la viabilidad, el crecimiento, la

duración de la vida del cultivo y la expresión génica con especificidad tisular de hHpSC recién aisladas, en condiciones de cultivo para la autorreplicación (colágeno tipo III) o en condiciones de diferenciación sobre colágeno I, frente a andamios de biomatriz hepática.

- 5 Figuras 6A-D. Tinción de inmunofluorescencia de células con restricción del linaje a partir de hHpSC sobre andamios de biomatriz. (A) Tinción con marcador específico hepático: albúmina (Alb, gris claro) y marcador de la superficie de células madre hepáticas: EpCAM (blanco). Obsérvese que las células sembradas sobre el andamio de biomatriz no expresan EpCAM. Barra de escala = 200 μ m. (B) Tinción con el marcador hepático temprano α -fetoproteína (AFP, gris claro) y con un anticuerpo contra el marcador de colangiocitos humanos, la citoqueratina 19 (CK19, blanco) que a este nivel de expresión es indicativa de colangiocitos maduros. El anticuerpo para el ensayo de CK19 es específico de humanos y no tiñó el residuo en la CK19 de rata en los andamios no sembrados con células. La expresión de AFP es baja pero todavía evidente en el día 7. Barra de escala = 200 μ m. (C) Tinción con Alb (gris claro) y marcador de células estrelladas hepáticas, α -actina del músculo liso (ASMA, blanco). La expresión de albúmina y ASMA es una fuerte indicación de la presencia de hepatocitos maduros y células estrelladas. Barra de escala = 100 μ m. (D) Tinción con proteína hepática funcional CYP450-3A4 (gris claro) y marcador específico de colangiocitos, receptor de secretina (SR, blanco) que muestra que los colangiocitos y hepatocitos maduros son funcionales y expresan los marcadores clásicos para estos dos tipos celulares. Barra de escala = 200 μ m.

Figuras 7A-D. Estabilidad de hepatocitos humanos maduros y completamente funcionales sobre andamios de biomatriz. Hepatocitos humanos adultos sembrados en el medio de diferenciación y sobre colágeno tipo I (A,B) frente a andamios de biomatriz hepática bovina (C) que se pulverizaron criogénicamente, se dispersaron en el medio y se dejaron sedimentar sobre las placas. Las células sobre el colágeno tipo I son totalmente viables y en su máximo de diferenciación de 7-12 días (A - mostradas a los 7 días); comienzan a deteriorarse después de ~ 2 semanas, y hacia los 20 días (B) mueren, están en un proceso de muerte y no son funcionales. Por el contrario, las sembradas sobre andamios de biomatriz hepática (C) son funcionales durante al menos 8 semanas (aún no se han evaluado tiempos más largos); aquí se muestra después de 21 días en cultivo sobre andamios de biomatriz hepática pulverizados. Ensayos de CYP450-3A4 en cultivos de dos preparaciones separadas de células hepáticas humanas adultas criopreservadas, sembradas sobre andamios de biomatriz frente a colágeno tipo I y sometidas al ensayo en el día 12 (D). La muestra ZHep-007 es representativa de muestras criopreservadas con buena adherencia después de la descongelación; la muestra ZL-013 es representativa de los lotes que tienen mala o ninguna adherencia después de la descongelación. Por lo tanto, incluso estas muestras de menor calidad son capaces de unirse a los andamios de biomatriz y permanecer viables a largo plazo. En ambas muestras sometidas al ensayo, los niveles de P450 son mayores cuando se cultivan sobre andamios de biomatriz hepática. Con el tiempo sobre los andamios de biomatriz, los lotes de células criopreservadas de menor calidad mejorarán.

Figura 8. Activación de la fosfolipasa A2 por desoxicolato sódico para producir lisolecitina. Principio del protocolo: La fosfolipasa A2 (PLA2) activada por desoxicolato de sodio degradará el fosfoglicérido ubicado en la membrana citoplasmática y la membrana mitocondrial a lisolecitina, un potente tensioactivo, que induce necrosis celular.

Figura 9. Análisis de la composición de colágeno de hígados de rata frente a andamios de biomatriz hepática de rata. La composición de aminoácidos de la biomatriz (negro) y del hígado entero (gris claro) presentada en forma de un diagrama de rosa. Se utiliza una abreviatura de tres letras para cada aminoácido analizado. El triptófano y la cisteína no se analizaron. Los números indican los residuos de aminoácidos/1000.

Figuras 10A-C. Análisis de ácidos nucleicos del andamio de biomatriz hepática de rata. Foto de contraste de fase (A) y tinción fluorescente con DAPI (B) de la lámina de biomatriz hepática, y ensayos cuantitativos en ARN y ADN total de tejido hepático fresco de rata frente al andamio de biomatriz (C).

Figuras 11A-C. Tinción del andamio de biomatriz después de sembrar hHpSC sobre el andamio de biomatriz. El ensayo Vivas (calceína-AM, blanco)/Muertas (bromuro de etidio o EtD-Br1, gris claro) indica que las colonias de hHpSC eran viables en secciones del andamio de biomatriz, pero no incorporaron el colorante en el centro de las colonias (A,B) durante los primeros días debido a las bombas conocidas en las células madre (por ejemplo, MDR1) que eliminan los colorantes vitales. En (B) la imagen de fluorescencia se fusiona con la de fase para indicar que el centro de la colonia contiene células. En el día 7, las células a lo largo de la colonia se habían diferenciado e incorporado el colorante vital en casi todas las células a lo largo de la colonia (C).

Figuras 12A-F. Comparación de hepatocitos de rata cultivados sobre colágeno tipo I con respecto a hepatocitos de rata cultivados sobre andamios de biomatriz hepática de rata. Hepatocitos adultos de rata cultivados sobre colágeno tipo I y andamio de biomatriz en el día 3 (A,C) y el día 10 (B,D). Las células se unieron en cuestión de varios minutos a los andamios de biomatriz hepática y sobrevivieron durante todo el tiempo ensayado, más de 8 semanas (C,D); no se analizaron períodos de tiempo más largos. Los cultivos son muy tridimensionales en los andamios de biomatriz. Síntesis de urea (E) y ensayo de viabilidad celular (F) en los días 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28, n = 3.

Figuras 13A-D. Comparación de un páncreas humano con un andamio de biomatriz pancreática humana. Páncreas humano (A) vs andamio de biomatriz pancreática humana (B-D) embebidos en parafina, cortados y teñidos con Hematoxilina y Eosina (H & E). Las estructuras de los islotes se han delineado en B. Las regiones acinares de los

andamios de biomatriz pancreática se muestran en C y D.

Figura 14. Comparación de los componentes representativos de la matriz y un componente del citoesqueleto, la vimentina, que se encuentra en el tejido pancreático humano frente a los andamios de biomatriz pancreática de rata. Otros componentes del citoesqueleto (desmina, tubulina, actina) no se encontraron en cantidades detectables o se encontraron en cantidades traza (citoqueratinas). Las líneas discontinuas rodean los islotes, donde se observa que sindecano¹ y el colágeno tipo VI son fuertemente positivos en los islotes tanto en el tejido pancreático como en los andamios de biomatriz. Sindecano 1 se encuentra sólo en los islotes (línea discontinua), pero no en las células acinares (flechas); el colágeno tipo III es más abundante en las células acinares y alrededor de los vasos sanguíneos (flechas), pero no en los islotes.

Figuras 15A-C. Tinción histológica e inmunohistoquímica del andamio de biomatriz de duodeno humano. (A) Lado exterior y del lumen del andamio de biomatriz de duodeno humano. Las estructuras de múltiples capas entre el tejido normal (B) y el andamio de biomatriz (C) se compararon en secciones teñidas con H & E, y los resultados muestran que los andamios retuvieron las vellosidades y vasos sanguíneos en las capas de la mucosa y la submucosa. Los paneles inferiores muestran que la tinción inmunohistoquímica del andamio de biomatriz de duodeno humano indicó cantidades variables de proteínas de la matriz extracelular retenidas en el andamio.

Figuras 16A-D. Comparación de un tejido de vesícula biliar humana con un andamio de biomatriz de vesícula biliar humana. Tejido de la vesícula biliar (A,B) frente a andamios de biomatriz (C,D) preparados a partir de este. El tejido y los andamios de biomatriz se embebieron en parafina, se cortaron y tiñeron con hematoxilina y eosina.

Figuras 17A-B. Las líneas celulares de tumor de colon HT29 (A) y SW480 (B) se sembraron sobre andamios de biomatriz y formaron colonias de células compuestas de cientos a miles de células y que eran bastante tridimensionales.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora más en detalle de aquí en adelante. Esta invención puede, sin embargo, realizarse en formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente. Más bien, estas modalidades se proporcionan para que esta descripción sea exhaustiva y completa, y refleje completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no se pretende que sean limitativas de la invención. Tal como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos (que incluyen los términos técnicos y científicos) usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Se comprenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios utilizados comúnmente, deben interpretarse como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la presente solicitud y la técnica relevante y no deben interpretarse en un sentido idealizado o excesivamente formal, a menos que así se defina expresamente en la presente descripción. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente están incorporadas completamente como referencia.

Además, como se usa en la presente descripción, "y/o" se refiere y abarca a todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

A menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descritas en la presente puedan utilizarse en cualquier combinación. Además, los diccionarios actuales de uso común deben interpretarse como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la presente solicitud y la técnica relevante y no deben interpretarse en un sentido idealizado o excesivamente formal a menos que se defina expresamente en la presente descripción. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención.

Además, como se usa en la presente descripción, "y/o" se refiere y abarca a todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

A menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera, se pretende específicamente que las diversas

características de la invención descritas en la presente puedan utilizarse en cualquier combinación. Por otra parte, la presente invención contempla además que en algunas modalidades de la invención, cualquier característica o combinación de características expuestas en la presente descripción pueden excluirse u omitirse. Para ilustrar, si la descripción establece que un complejo comprende los componentes A, B y C, está específicamente destinado que cualquiera de A, B o C, o una combinación de estos, puede omitirse y rechazarse individualmente o en cualquier combinación.

Como se usa en la presente descripción, la frase de transición "que consiste esencialmente en" (y variantes gramaticales) ha de interpretarse que abarca los materiales o etapas citados y "los que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosas de la invención reivindicada. Ver, In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); ver además MPEP § 2111.03. Por lo tanto, el término "que consiste esencialmente en" como se usa en la presente descripción no debe interpretarse como equivalente de "que comprende".

El término "aproximadamente", como se usa en la presente descripción cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad o concentración (por ejemplo, el porcentaje de colágeno en las proteínas totales en el andamio de biomatriz) y similares, está destinado a abarcar variaciones del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, o incluso 0,1 % de la cantidad especificada.

La presente invención está dirigida al descubrimiento y desarrollo de un andamio de biomatriz que tiene mejoras y ventajas inesperadas sobre los andamios de tejido descelularizado ahora conocidos, donde algunos ejemplos de la mejora y ventaja son el uso del andamio de biomatriz de esta invención para, de manera eficiente, mantener células maduras y/o restringir el linaje y/o diferenciar células madre a destinos maduros y/o mantener dichas células maduras como funcionales durante un período de tiempo prolongado. Como otro ejemplo, el uso de los andamios de biomatriz de esta invención reduce el tiempo para producir células de destinos maduros de aproximadamente tres a seis semanas o más a aproximadamente una a dos semanas. Los andamios de biomatriz de esta invención se producen mediante el uso de protocolos específicos que emplean el equilibrio apropiado de concentración de sal y fuerza iónica (diferentes colágenos tienen diferentes constantes de solubilidad (23)) para un tejido dado, para permitir la retención de colágenos nativos presentes en ese tejido en forma insoluble, lo que produce un andamio de biomatriz que retiene un alto por ciento de colágenos nativos que proporcionan señales para conducir a la restricción del linaje y la diferenciación. Por el contrario, los andamios descelularizados producidos de acuerdo con protocolos conocidos no emplean tal equilibrio de concentración de sal y fuerza iónica para permitir la retención de un alto por ciento de estos colágenos nativos y la mayoría de estos colágenos nativos se pierden cuando se usan estos protocolos conocidos. Además, los andamios de biomatriz de esta invención permiten la producción de virus y/o agentes patógenos dependientes del linaje (por ejemplo, dependientes de la diferenciación) en cantidades suficientes para uso experimental y/o terapéutico (por ejemplo, para la producción de vacunas).

Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido hepático de mamífero, que comprende las etapas de: a) perfundir u homogeneizar el tejido hepático con un primer medio, en donde la osmolalidad de dicho primer medio es de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg y dicho primer medio está libre de suero y a pH neutro; después b) perfundir el tejido biológico o extraer el homogeneizado de la etapa (a) con un tampón de deslipidación que comprende desoxicolato de sodio y fosfolipasa A2 en dicho primer medio; después c) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (b) con un tampón a un pH neutro y que comprende una concentración de sal de aproximadamente NaCl 2,0 M a aproximadamente 5,0 M, la concentración elegida para mantener insolubles a los colágenos identificados en el tejido biológico; después d) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (c) con RNAasa y DNAasa en un tampón; y después e) enjuagar el tejido u homogeneizado de la etapa (d) con un segundo medio que está a pH neutro, está libre de suero y tiene una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, para producir de esta manera un andamio de biomatriz intacto u homogeneizado del tejido biológico, que comprende dicho andamio de biomatriz al menos 95 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 100 %) de los colágenos y la mayoría de los componentes de la matriz asociados al colágeno y factores de crecimiento, hormonas y citocinas unidos a la matriz del tejido biológico sin procesar. En la presente invención se proporciona además un andamio de biomatriz producido mediante cualquiera de los métodos de esta invención.

"Andamio de biomatriz", como se usa en la presente descripción, se refiere a un extracto tisular aislado enriquecido en matriz extracelular, como se describe en la presente, que retiene muchos o la mayoría de los colágenos y factores unidos al colágeno encontrados naturalmente en el tejido biológico. En algunas modalidades se retienen esencialmente todos los colágenos y factores unidos al colágeno y en otras modalidades el andamio de biomatriz comprende todos los colágenos que se conoce que están en el tejido. El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de los colágenos y factores unidos al colágeno encontrados naturalmente en el tejido biológico.

Los colágenos ilustrativos incluyen todos los tipos de colágeno, tales como, pero sin limitación, colágenos tipo I a tipo XXIX. El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de uno o más de los colágenos encontrados en el tejido biológico natural y/o pueden tener uno o más de los colágenos presentes en una concentración que es al menos

aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de los encontrados en el tejido biológico natural. La cantidad de colágeno en el andamio de biomatriz puede determinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica y como se describen en la presente descripción, tales como, pero sin limitación, la determinación del contenido de hidroxiprolina.

5 Los componentes ilustrativos de la matriz asociada al colágeno incluyen, pero sin limitación, moléculas de adhesión; proteínas de adhesión; L- y P-selectina; molécula asociada al crecimiento de unión a la heparina (HB-GAM); repetición de trombospondina tipo I (TSR); amiloide P (AP); lamininas; nidógenos/entactinas; fibronectinas; elastinas; vimentinas; proteoglicanos (PG); sulfato de condroitina-PG (CS-PG); sulfato de dermatán-PG (DS-PG); miembros de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP), tales como biglicano y decorinas; heparina-PG (HP-PG); sulfato de heparán-PG (HS-PG) tales como glicanos, sindecanos y perlecanos; y glicosaminoglicanos (GAG) tales como hialuronanos, sulfatos de heparán, sulfatos de condroitina, sulfatos de queratina y heparinas. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende, consiste o consiste esencialmente en colágenos, fibronectinas, lamininas, nidógenos/entactinas, elastinas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, factores de crecimiento, hormonas y citocinas (en cualquier combinación) unidos a diversos componentes de la matriz. El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 70 %, 75 %, un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de uno o más de las hormonas, citocinas y/o componentes de la matriz asociados al colágeno que se encuentran en el tejido biológico natural y/o puede tener uno o más de estos componentes presentes en una concentración que es al menos aproximadamente 50 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de la que se encuentra en el tejido biológico natural. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende todos o la mayor parte de las hormonas citocinas y/o componentes de la matriz asociados al colágeno, que se conoce que están en el tejido. En otras modalidades, el andamio de biomatriz comprende, consiste esencialmente o consiste en uno o más de las hormonas, citocinas y/o componentes de la matriz asociados al colágeno en concentraciones que están cercanas a las encontradas en el tejido biológico natural (por ejemplo, aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de la concentración encontrada en el tejido natural).

Los factores de crecimiento ilustrativos incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformantes, factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) insulina-como el tejido biológico natural. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende todos o la mayor parte de las hormonas, citocinas y/o componentes de la matriz asociados al colágeno, que se conoce que están en el tejido. En otras modalidades, el andamio de biomatriz comprende, consiste esencialmente o consiste en uno o más de las hormonas, citocinas y/o componentes de la matriz asociados al colágeno en concentraciones que están cercanas a las encontradas en el tejido biológico natural (por ejemplo, aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de la concentración encontrada en el tejido natural).

Los factores de crecimiento ilustrativos incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformantes, factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), proteínas de unión a IGF, factores básicos de crecimiento de fibroblastos y factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las citocinas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, interleucinas, linfocinas, monocinas, factores estimulantes de colonias, quimiocinas, interferones y factor de necrosis tumoral (TNF). El andamio de biomatriz puede comprender al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 100 % o más (en cualquier combinación) de uno o más de los factores de crecimiento unidos a la matriz y/o citocinas encontradas en el tejido biológico natural y/o puede tener uno o más de estos factores de crecimiento y/o citocinas (en cualquier combinación) presentes a una concentración que es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % o más de la encontrada en el tejido biológico natural. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende niveles fisiológicos o niveles cercanos a los fisiológicos de muchos o la mayoría de los factores de crecimiento unidos a la matriz, hormonas y/o citocinas conocidas por estar en el tejido natural y/o detectadas en el tejido, y en otras modalidades el andamio de biomatriz comprende uno o más de los factores de crecimiento, hormonas y/o citocinas unidos a la matriz, a concentraciones que están cercanas a las concentraciones fisiológicas encontradas en el tejido biológico natural (por ejemplo, que se diferencian en no más de aproximadamente 30 %, 25 %, 20 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % en comparación). La cantidad o concentración de factores de crecimiento o citocinas presentes en el andamio de biomatriz puede determinarse por diversos métodos conocidos en la técnica y como se describen en la presente, tales como, pero sin limitación, diversos ensayos de anticuerpos y ensayos de factores de crecimiento.

"Tejido biológico" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier tejido de un organismo vivo o fallecido o cualquier tejido derivado de un organismo vivo o fallecido. El término "tejido biológico natural" y variaciones de este, como se usan en la presente descripción, se refieren al tejido biológico tal como existe en su estado natural o no modificado en el organismo. Los andamios de biomatriz pueden prepararse a partir de cualquier tejido biológico. El tejido biológico puede incluir cualquier tejido individual (por ejemplo, una colección de células que pueden estar interconectadas) o un grupo de tejidos que constituyen un órgano o parte o región del cuerpo de un organismo. El tejido puede comprender un material celular homogéneo o puede ser una estructura compuesta tal

como la que se encuentra en regiones del cuerpo que incluyen el tórax que, por ejemplo, puede incluir tejido pulmonar, tejido esquelético y/o tejido muscular.

5 Los tejidos biológicos ilustrativos incluyen hígado, pulmón, tiroides, piel, páncreas, vasos sanguíneos, vejiga, riñones, cerebro, árbol biliar, duodeno, aorta abdominal, vena ilíaca, corazón e intestinos, que incluyen cualquier combinación de estos. El organismo (es decir, sujeto) del cual se asocia o deriva el tejido biológico puede ser cualquier animal, que incluye animales mamíferos y no mamíferos tales como invertebrados.

10 Los sujetos ilustrativos incluyen mamíferos, tales como, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, hurones, hámsteres, conejos, cobayos, cerdos, porcinos, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, monos y chimpancés. El sujeto puede ser de cualquier edad y/o tamaño. El tejido biológico puede estar sano, enfermo y/o tener mutaciones genéticas. En algunas modalidades, los andamios de biomatriz de la presente invención son específicos de tejidos en su naturaleza química y funcionalidad, es decir, los andamios de biomatriz son representativos o comparables con el tejido biológico a partir del cual se crearon en términos de su naturaleza química y funcionalidad.

15 En algunas modalidades, la histología original y las vasculaturas evidentes se mantienen en los andamios de biomatriz. Esto puede incluir los restos reconocibles de las entidades histológicas principales del tejido biológico, tales como, pero sin limitación, vasos sanguíneos y otra vasculatura para cualquier tejido; conductos biliares y cápsula de Glisson (GC) del hígado; conductos pancreáticos, islotes y acinos del páncreas; bronquios, tráquea y alvéolos de los pulmones, etcétera. En otras modalidades, la química del andamio de biomatriz se adapta a la histología (por ejemplo, la matriz alrededor de los vasos sanguíneos es distinta de la que rodea a los hepatocitos). En algunas modalidades la química del andamio de biomatriz está en un gradiente que se correlaciona con la histología. Por ejemplo, cuando el tejido biológico es el hígado, el andamio de biomatriz puede retener el gradiente en la química de la matriz que se correlaciona con las zonas acinares hepáticas 1-3 desde la tríada portal a la vena central y con entidades histológicas tales como los canales vasculares y la cápsula de Glisson (GC). Otros ejemplos incluyen, pero sin limitación, vasos sanguíneos donde la química de la matriz alrededor de los vasos sanguíneos está repleta de altos niveles de colágenos en red (por ejemplo, tipo IV y tipo VI), elastinas y formas de HS-PG; alrededor de los hepatocitos en la zona periportal (zona 1), donde las lamininas están en alta concentración junto con una mezcla de CS-PG y HS-PG, mientras que alrededor de la zona pericentral (zona 3), los hepatocitos están rodeados por una mezcla de HS-PG y HP-PG; asociados con los conductos biliares donde existen altos niveles de colágeno tipo I, fibronectinas y formas de CS-PG y DS-PG. En todos los tejidos existen gradientes paralelos en la química de la matriz.

35 Una serie de medios de enjuague, tales como el primer y el segundo medio, y tampones pueden utilizarse en la presente invención. En particular, puede usarse cualquier medio de enjuague o tampón que mantenga los colágenos y los factores unidos (por ejemplo, componentes de la matriz, factores de crecimiento y citocinas) en un estado insoluble. Cuando se elige un medio o tampón, la concentración de sal, el pH y la fuerza iónica deben ser adecuados para mantener los colágenos y/o la mayoría o la mayor parte de los componentes de la matriz unidos al colágeno y otros factores (por ejemplo, en virtud de sus conexiones químicas directa o indirectamente con los colágenos) en un estado insoluble. La Tabla 1 proporciona intervalos de concentración molar del cloruro de sodio para diversos tipos de colágeno para ayudar a un experto en la técnica a proporcionar medios y tampones que aseguren que los colágenos, los componentes de la matriz asociados al colágeno y los factores de crecimiento y citocinas unidos a la matriz permanezcan insolubles. Deyl y otros ("Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins" Journal of Chromatography B 790 (2003) 245-275), adicionalmente, proporcionan información sobre la química del colágeno que puede facilitar la identificación de las condiciones óptimas para mantener los colágenos y los factores unidos en un estado insoluble.

50 La Tabla 1 demuestra que el pH es una variable que actúa junto con la concentración de sal para definir la solubilidad. Cuando se tienen altas concentraciones de sal, el pH puede ser neutro. En algunas modalidades de la presente invención, la concentración de sal elegida es la que mantiene todos los colágenos del tejido en un estado insoluble, no sólo uno de los colágenos del tejido en un estado insoluble. Por ejemplo, los colágenos conocidos en el hígado fetal son los insolubles en concentraciones de sal de 4,5 M de NaCl y los de tejido hepático adulto que son insolubles en concentraciones de sal de aproximadamente 3,4 M-3,5 M de NaCl.

55 La osmolalidad de cualquiera de los medios de enjuague y/o tampones puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 200 mOsm/kg a aproximadamente 400 mOsm/kg, de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, de aproximadamente 275 mOsm/kg a aproximadamente 325 mOsm/kg, o de aproximadamente 300 mOsm/kg a aproximadamente 325 mOsm/kg, que incluyen, pero sin limitación, cualquier valor dentro de estos intervalos no citado explícitamente en la presente. El agua destilada y los tampones diluidos (por ejemplo, con osmolalidad <100 mOsm/kg) producirán la pérdida de cantidades significativas de colágeno, componentes de la matriz asociados al colágeno y factores de crecimiento unidos a la matriz y citocinas. Por lo tanto, en algunas modalidades de los métodos de esta invención, no se incluyen agua destilada ni tampones diluidos.

65 Como reconocerá un experto en la técnica, la osmolalidad es una expresión de la concentración osmótica de un soluto por masa, mientras que la osmolaridad es por volumen del disolvente. Por lo tanto, la conversión de

osmolaridad a osmolalidad puede realizarse mediante la multiplicación por la densidad de masa. La osmolalidad puede

5 La molaridad y la osmolaridad no se utilizan comúnmente en osmometría porque son dependientes de la temperatura. Esto se debe a que el agua cambia su volumen con la temperatura. Sin embargo, si la concentración de solutos es muy baja, la osmolaridad y la osmolalidad se consideran equivalentes.

La osmolaridad de una solución puede calcularse a partir de la siguiente expresión:

10

$$\text{osmol/L} = \sum_i \varphi_i n_i C_i$$

15 donde φ es el coeficiente osmótico, que explica el grado de no idealidad de la solución; n es el número de partículas (por ejemplo iones) en las que se disocia una molécula; C es la concentración molar del soluto; y el índice i representa la identidad de un soluto particular. En el caso más simple φ es el grado de disociación del soluto. Entonces, φ está entre 0 y 1, donde 1 indica el 100 % de disociación. Sin embargo, φ también puede ser mayor que 1 (por ejemplo, para la sacarosa). Para las sales, los efectos electrostáticos provocan que φ sea menor que 1 incluso si se produce 100 % de disociación.

20 La perfusión del tejido biológico con cualquier medio o tampón puede lograrse al forzar el medio o tampón a través de la vasculatura relevante del tejido biológico. Por ejemplo, si el tejido biológico es el hígado, entonces el medio o tampón pueden perfundirse a través de la vena porta del hígado. Alternativamente, el medio o tampón pueden verterse sobre el tejido biológico y/o dejar que difundan a través del tejido biológico. Por ejemplo, el tejido biológico puede sumergirse y/o dializarse en el medio o tampón, para permitir que el medio o tampón difundan a través del tejido biológico. Mientras se sumergen y/o se dializan en el medio o tampón, la solución y el tejido biológico pueden sacudirse, tal como sobre un balancín, y/o agitarse. En algunas modalidades los medios y tampones se perfunden a través de la vasculatura relevante del tejido biológico.

30 Alternativamente, el tejido puede homogeneizarse en el medio inicial y los tampones y medios usados después de esto son para la extracción del homogeneizado. Las versiones homogeneizadas de los andamios de biomatriz se preparan a partir de órganos grandes (por ejemplo, de tejidos de vaca o porcino), después se pulverizan hasta obtener un polvo a temperaturas del nitrógeno líquido y el polvo se usa en placas para estudios de cultivo.

35 En algunas modalidades, el primer medio y/o el segundo medio es un medio basal, tal como, pero sin limitación, medio RPMI 1640, DME/F12, DME, F12, BME, DMEM, Waymouth o William. En la técnica se conocen otros medios basales ilustrativos y están disponibles comercialmente. El primer medio y/o el segundo medio pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en componentes que se combinan para mantener la mayoría de los colágenos insolubles y como moléculas nativas, como se describe en la presente descripción (por ejemplo, mediante la combinación particular de la osmolalidad y la fuerza iónica así como la ausencia de suero). El primer medio y/o el segundo medio pueden pulverizarse hasta obtener un polvo a temperaturas del nitrógeno líquido, y el polvo se usa en placas para estudios de cultivo.

45 En algunas modalidades, el primer medio y/o el segundo medio es un medio basal, tal como, pero sin limitación, medio RPMI 1640, DME/F12, DME, F12, BME, DMEM, Waymouth o William. En la técnica se conocen otros medios basales ilustrativos y están disponibles comercialmente. El primer medio y/o el segundo medio pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en componentes que se combinan para mantener la mayoría de los colágenos insolubles y como moléculas nativas, como se describe en la presente descripción (por ejemplo, mediante la combinación particular de la osmolalidad y la fuerza iónica así como la ausencia de suero). El primer medio y/o el segundo medio pueden comprender, consistir, o consistir esencialmente en los constituyentes presentes o similares o que imitan a los presentes en el fluido intersticial tales como, pero sin limitación, agua; sales tales como, pero sin limitación, sales inorgánicas; vitaminas; minerales; aminoácidos tales como, pero sin limitación, glicina, serina, treonina, cisteína, asparagina y/o glutamina; azúcares; ácidos grasos; coenzimas; hormonas; y neurotransmisores. En determinadas modalidades donde el primer medio y/o el segundo medio comprenden constituyentes presentes o similares o que imitan a los presentes en el fluido intersticial, los constituyentes pueden producir una osmolalidad aproximadamente equivalente a la osmolalidad del medio basal disponible comercialmente o producir una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. En algunas modalidades, el primer medio y/o el segundo medio incluyen medios que están libres de suero, comprenden constituyentes presentes en el fluido intersticial, y/o tienen una osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. Tales medios también pueden estar a pH neutro. La composición específica del primer medio y/o el segundo medio se determina, en modalidades particulares, por las constantes de insolubilidad de los colágenos del tejido biológico utilizado para obtener el andamio de biomatriz, como conocerá un experto en la técnica.

65 El tampón de deslipidación de la presente invención debe ser eficaz y sin embargo suave. El tampón de deslipidación puede comprender, consistir o consistir esencialmente en detergentes o tensioactivos, medio basal,

sales y/o lipasas. Al elegir los componentes para el tampón de deslipidación, deben evitarse detergentes duros (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, Triton X-100) para minimizar la pérdida de componentes de la matriz. Los detergentes ilustrativos incluyen detergentes aniónicos, tales como sales del ácido desoxicólico, ácido 1-heptanosulfónico, N-laurilsarcosina, laurilsulfato, ácido 1-octanosulfónico y ácido taurocólico; detergentes catiónicos tales como cloruro de benzalconio, cetilpiridinio, cloruro de metilbenzetonio y bromuro de decametonio; detergentes zwitteriónicos tales como alquil betainas, alquil amidoalquil betainas, N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato y fosfatidilcolina; y detergentes no iónicos tales como n-decil α -D-glucopiranosido, n-decil β -D-maltopiranosido, n-dodecil β -D-maltósido, n-octil β -D-glucopiranosido, ésteres de sorbitán, n-tetradecil β -D-maltósido, tritones, Nonidet-P-40, Poloxámero 188 y cualquiera de los grupos de detergentes Tween; lauril sulfato sódico; y desoxicolato sódico. En algunas modalidades, el tampón de deslipidación comprende desoxicolato sódico.

Las lipasas ilustrativas incluyen fosfolipasas tales como fosfolipasa A2, lipasa pancreática humana, esfingomielinasas, lipasa lisosomal, lipasa endotelial y lipasa hepática. En algunas modalidades, el tampón de deslipidación comprende fosfolipasa A2. En otras modalidades, el tampón de deslipidación comprende desoxicolato sódico y fosfolipasa A2. Esta combinación, en algunas modalidades, puede comprender de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 unidades/l de fosfolipasa A2 y aproximadamente 1 % de desoxicolato de sodio preparado en un medio basal de pH neutro y libre de suero, que puede ser, por ejemplo, el primer medio. La combinación de desoxicolato sódico y fosfolipasa A2 degrada rápidamente el fosfoglicérido ubicado en la membrana citoplasmática y la membrana mitocondrial a lisolecitina, un tensioactivo potente, que puede inducir necrosis y citolisis. Como reconocerá un experto en la técnica, la cantidad y el tipo de lipasa y/o detergente pueden depender del tejido biológico.

La etapa de perfusión del tejido biológico con el tampón de deslipidación se lleva a cabo, en algunas modalidades, hasta que el tejido se vuelve transparente. En otras modalidades, la etapa de perfusión del tejido biológico con el tampón de deslipidación se lleva a cabo hasta que la efusión se vuelve clara. En algunas modalidades, la etapa de deslipidación se lleva a cabo hasta que el tejido se vuelve transparente y la efusión se vuelve clara.

En algunas modalidades se evita la exposición prolongada de los andamios de biomatriz a las enzimas de las células lisadas, ya que puede disminuir en gran medida el contenido de elastina y el contenido de glicosaminoglicanos tales como sulfatos de heparán, sulfatos de condroitina, sulfatos de dermatán y heparinas, que son sitios en los que se unen las citocinas y los factores de crecimiento. La exposición a las enzimas de las células lisadas puede evitarse, por ejemplo, durante la deslipidación y/o los lavados posteriores después de la deslipidación. En algunas modalidades, puede emplearse el uso de un inhibidor de proteasas y/o un control cuidadoso del pH, la temperatura y/o el tiempo para limitar la actividad de las proteasas y/u otras enzimas de las células lisadas.

Los inhibidores de proteasas ilustrativos incluyen, pero sin limitación, inhibidores de serina proteasas tales como, pero sin limitación, antipaína, aprotinina, quimostatina, elastatinal, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, leupeptina e inhibidor de tripsina de soja; cisteína proteasas tales como, pero sin limitación, IAA (ácido indolacético) y E-64; inhibidores de la proteasa aspártica tales como, pero sin limitación, pepstatina y VdLPPFVdL; metaloproteasas tales como, pero sin limitación, EDTA, 1,10-fenantrolina y fosforamodon; exopeptidasas aunque no se citan en la presente descripción. En otras modalidades, el andamio de biomatriz, los tampones y/o los medios se mantienen a pH neutro. La temperatura del andamio de biomatriz (por ejemplo, durante y/o después de la preparación), los tampones y/o los medios puede ser de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C, o de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, que incluyen, pero sin limitación, cualquier valor comprendido dentro de estos intervalos pero no citado en la presente descripción. En algunas modalidades la temperatura se mantiene a aproximadamente 20 °C. El tiempo de perfusión del tejido biológico con cualquier medio o tampón puede ser de aproximadamente 5 horas o menos, aproximadamente 3 horas o menos, aproximadamente 1 hora o menos, aproximadamente 30 minutos o menos, o aproximadamente 15 minutos o menos. En algunas modalidades, la etapa de perfusión del tejido biológico con el tampón de deslipidación es de aproximadamente 30 minutos o menos. En algunas modalidades en las que se usan pH ácidos, las concentraciones de sal para mantener insolubles a los colágenos y los componentes asociados al colágeno pueden ser diferentes; las concentraciones pueden determinarse por la literatura existente sobre la química del colágeno mediante la elección de concentraciones de sal que mantienen la insolubilidad de los colágenos.

Los tampones ilustrativos incluyen, pero sin limitación, cloruro sódico, lactato sódico, acetato sódico, fosfato sódico, citrato sódico, borato sódico, gluconato sódico, tampones citrato, tampones bis/tris, tampones fosfato, fosfato potásico, citrato/dextrosa, bicarbonato sódico, cloruro de amonio, ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]amino]propanosulfónico, tris(hidroximetil)metilamina, N-tris(hidroximetil)metilglicina, ácido 4,2-hidroxietil-1-piperazinoetanosulfónico y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.

En algunas modalidades, el tampón de esta invención (por ejemplo, el tampón usado en la etapa © descrita en la presente descripción) puede comprender una sal en una concentración de aproximadamente 2,0 M o más. Por ejemplo, en algunas modalidades la sal puede estar en una concentración de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 5,0 M, de aproximadamente 2,5 M a aproximadamente 5,0 M, de aproximadamente 3,0 M a aproximadamente 4,5 M, o de aproximadamente 3,0 M a aproximadamente 4,0 M, que incluyen, pero sin limitación,

cualquier valor comprendido dentro de estos intervalos, pero no citado explícitamente en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades el tampón utilizado en los métodos de la presente invención puede comprender una sal tal como cloruro sódico en una concentración de aproximadamente 2,0 M de NaCl a aproximadamente 4,5 M de NaCl. En otras modalidades, tales como las de hígados adultos, el tampón utilizado puede comprender de aproximadamente 3,4 M a aproximadamente 3,5 M de NaCl. En modalidades tales como las del hígado fetal, el tampón utilizado puede comprender una sal tal como cloruro sódico en una concentración de aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 4,50 M. En algunas modalidades la perfusión del tejido biológico con un lavado con sal, tal como el de la etapa c) de los métodos ilustrativos descritos en la presente, se lleva a cabo hasta que el perfusado (es decir, el líquido usado para la perfusión, tal como el líquido que se ha forzado a través de la vasculatura) es negativo para proteínas según la densidad óptica (DO) a 280 nm.

Cualquiera de los medios y/o tampones de la presente invención puede comprender un inhibidor de proteasas. Los inhibidores de proteasas ilustrativos se describen anteriormente. En algunas modalidades, el tampón tal como el de la etapa (c) de los métodos ilustrativos descritos en la presente comprende un inhibidor de proteasas, tal como un inhibidor de tripsina de soja. En otras modalidades, el tampón de la etapa (d) comprende uno o más inhibidores de proteasas, tales como un inhibidor de tripsina de soja.

Los medios y/o tampones de la presente invención pueden comprender una o más nucleasas, que en algunas modalidades pueden prepararse en los tampones estándar recomendados por los proveedores comerciales de estas enzimas. Por ejemplo, en algunas modalidades, el tampón de la etapa d) comprende una o más nucleasas, tales como, pero sin limitación, RNAasa y DNAasa. La perfusión con nucleasas elimina residuos de ácidos nucleicos. En otras modalidades, el tampón de la etapa d) comprende RNAasa, DNAasa y uno o más inhibidores de proteasas. En algunas modalidades la perfusión del tejido biológico con una o más nucleasas se lleva a cabo hasta que el perfusado (es decir, el líquido usado para la perfusión, tal como el líquido que se ha forzado a través de la vasculatura) es negativo para ácidos nucleicos según la densidad óptica (DO) a 260 nm. En algunas modalidades, las nucleasas eliminan el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de los ácidos nucleicos en el tejido biológico.

El segundo medio (por ejemplo, el medio de enjuague final) puede ser cualquier medio que asegure que los colágenos y factores unidos (por ejemplo, componentes de la matriz, factores de crecimiento y citocinas) permanecerán insolubles, como se describió anteriormente. Los medios de enjuague finales ilustrativos se han descrito anteriormente con referencia al primer medio y están libres de suero, a pH neutro y con una osmolalidad de 250-350 mOsm/kg. Por ejemplo, en algunas modalidades el segundo medio comprende un medio basal. En algunas modalidades, el segundo medio es un medio basal libre de suero. En otras modalidades, el segundo medio es un medio hormonalmente definido, libre de suero (HDM) que comprende hormonas, factores de crecimiento, lípidos y albúmina sérica y se adapta a las necesidades de las células a cultivar. Un segundo medio ilustrativo es el medio de Kubota (Kubota y Reid, PNAS 97:12132-12137, 2000), que está diseñado para células madre hepáticas, hepatoblastos y otros progenitores. En determinadas modalidades, el segundo medio puede o no comprender la suplementación con suero o un factor derivado de suero, tal como, pero sin limitación, albúmina sérica humana. En algunas modalidades, el enjuague del tejido con el segundo medio elimina los residuos del tampón de deslipidación y las nucleasas. En otras modalidades, el lavado con el segundo medio y/o cualquier tampón o medio posteriores equilibra el andamio de biomatriz con el medio o tampón. En algunas modalidades, el primer medio y el segundo medio pueden ser los mismos y en algunas modalidades, el primer medio y el segundo medio pueden ser diferentes, para producir de esta manera un andamio de biomatriz a partir del tejido biológico.

En algunas modalidades uno o más de los medios y/o tampones utilizados en la preparación del andamio de biomatriz están libres (es decir, no contienen una cantidad detectable) de una o más enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular. En otras modalidades, todos los medios y tampones utilizados en la preparación del andamio de biomatriz están libres (es decir, no contienen una cantidad detectable) de una o más enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular. Las enzimas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, colagenasas; proteasas; glicosidasas tales como heparinasa, heparitinasa, condroitinasa e hialuronidasa; y elastasas.

La esterilización del tejido biológico, del homogenado y/o del andamio de biomatriz de esta invención puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, con la advertencia de que deben evitarse métodos que utilicen un factor que pueda unirse al andamio de biomatriz (por ejemplo óxido de etileno). Los métodos de esterilización ilustrativos incluyen, pero sin limitación, irradiación gamma, descargas luminiscentes de radiofrecuencia (RFGD) esterilización por plasma, esterilización por haz de electrones y esterilización por dióxido de carbono supercrítico. En algunas modalidades, la esterilización del tejido, del homogeneizado y/o del andamio de biomatriz se realiza con irradiación gamma a aproximadamente 5000 rads. Si los andamios se usarán inmediatamente para la recelularización, y si se usaron procedimientos estériles en el proceso de descelularización (especialmente después de la extracción con alto contenido de sal), puede que la esterilización no sea necesaria.

El almacenamiento del andamio de biomatriz puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunas modalidades (por ejemplo, cuando el andamio es para usarse intacto), el andamio de biomatriz puede almacenarse a aproximadamente 4 °C y en otras modalidades (por ejemplo, cuando el andamio es para dispersarse

en la secta, el andamio de biomatriz se congela, por ejemplo, a aproximadamente -80 °C.

En algunas modalidades, el andamio de biomatriz comprende, consiste, o consiste esencialmente en colágenos, fibronectinas, lamininas, nidógeno/entactina, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y cualquier combinación de estos, todos los cuales forman parte del andamio de biomatriz (por ejemplo, unidos al andamio de biomatriz). En algunas modalidades, el andamio de biomatriz carece de una cantidad detectable de un colágeno, fibronectina, laminina, nidógeno/entactina, elastina, proteoglicano, glicosaminoglicano y cualquier combinación de estos.

Los andamios de biomatriz de la presente invención han demostrado ser potentes sustratos de diferenciación para las células y pueden usarse para muchos tipos celulares, tales como, pero sin limitación, cualquier célula madura o para diversas poblaciones de células madre. Estas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS), células madre de la capa germinal (por ejemplo, células madre endodérmicas definitivas), células madre determinadas (por ejemplo, células madre hepáticas, pulmonares, pancreáticas o intestinales) células madre hepáticas humanas (hHpSC), células madre perinatales (por ejemplo, células madre derivadas de líquido amniótico (AFSC)), células madre mesenquimales (MSC) tales como de la médula ósea o del tejido adiposo, progenitores comprometidos, células adultas de cualquier tipo de tejido, células enfermas, células tumorales, células maduras, células parenquimatosas, células estrelladas, colangiocitos, células del árbol biliar tales como las que no son colangiocitos, hepatocitos, células de riñón, células uroteliales, células mesenquimales, células de músculo liso o esquelético, miocitos, (células madre de músculo), fibroblastos, condrocitos, adipocitos, fibromioblastos, células endoteliales, células ectodérmicas, que incluyen células dúctiles y cutáneas, células neurales, células de los islotes, células presentes en el intestino, osteoblastos, otras células que forman hueso o cartílago, y cualquier combinación de estas. Estas células pueden ser normales o enfermas.

En algunas modalidades, los andamios de biomatriz se usan para estudios biológicos, farmacéuticos, genéticos, moleculares y/o virológicos de las células, ya sean recién aisladas a partir de un tejido o a partir de células madre con restricción del linaje. En otras modalidades los andamios de biomatriz se usan para órganos implantados, vascularizados y modificados, tales como, pero sin limitación, el hígado. Otros usos ilustrativos para los andamios de biomatriz incluyen, pero sin limitación, producción de proteínas, pruebas de toxicidad de fármacos, desarrollo de fármacos, tamizaje de anticuerpos y/o producción de virus para preparaciones de vacunas de virus. La producción de virus dependientes del linaje (por ejemplo, virus del papiloma y hepatitis C) puede lograrse mediante la siembra de poblaciones de células madre en un andamio de biomatriz de especificidad tisular y después cultivar en un medio que actúa en combinación con el andamio de biomatriz para inducir completamente la diferenciación de las células. Los viriones maduros se producirán cuando las células maduren completamente. Mientras el virus en sí no afecte la viabilidad celular, las células maduras infectadas con el virus pueden mantenerse durante al menos ocho semanas lo que ofrece un medio para generar grandes cantidades de virus con un sistema de cultivo estable.

Los andamios de biomatriz pueden usarse intactos, tales como, pero sin limitación, para usarse en cultivos celulares 2-D y/o 3-D. En algunas modalidades, los andamios de biomatriz pueden usarse en combinación con un medio específico para la diferenciación en cultivos 2-D y/o 3-D para líneas celulares, tales como, pero sin limitación, células normales o enfermas de cualquier etapa de maduración del linaje a partir de las células madre a células en etapa tardía.

Alternativamente, los andamios de biomatriz pueden congelarse. Estas secciones congeladas pueden prepararse y utilizarse como sustratos. Los andamios de biomatriz pueden congelarse rápidamente en hielo seco y las secciones congeladas preparadas con un criostato, pueden colocarse sobre aparatos de cultivo (por ejemplo, placas, matraces, tela, transwells, etcétera), esterilizarse y rehidratarse en un medio antes de sembrar las células. En algunas modalidades, el andamio de biomatriz congelado de esta invención puede seccionarse.

En algunas modalidades se produce un cultivo celular, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de la etapa (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; y c) sembrar el andamio de biomatriz de la etapa (b) con células, para producir de esta manera un cultivo celular.

En algunas modalidades se produce un cultivo celular, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de la presente invención; b) congelar el andamio de biomatriz de la etapa (a); c) preparar una sección congelada del andamio de biomatriz de la etapa (b) como un sustrato de cultivo celular; d) poner en contacto el sustrato de cultivo celular de la etapa (c) con un medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; y e) sembrar el sustrato de cultivo celular de la etapa (d) con células, para producir de esta manera un cultivo celular.

En otras modalidades los andamios de biomatriz pueden triturarse hasta obtener un polvo. Un método de triturar el andamio de biomatriz hasta obtener un polvo comprende triturar el andamio de biomatriz hasta obtener un polvo en un molino con congelación a temperaturas del nitrógeno líquido, o cercanas a estas. En la técnica se conocen otros aparatos para triturar a temperaturas del nitrógeno líquido o equivalentes (por ejemplo, congelación con hielo seco). El polvo puede llevarse a temperatura ambiente a la cual adquiere la consistencia de una pintura con la que se puede recubrir los aparatos de cultivo mediante el uso de un cepillo de pintura esterilizado o un aparato equivalente. El polvo o las placas pueden esterilizarse.

5 Por lo tanto, en algunas modalidades se produce un cultivo celular que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de la presente invención; b) triturar el andamio de biomatriz de la etapa (a) hasta obtener un polvo; c) recubrir un aparato de cultivo con el polvo de la etapa (b) para producir un sustrato de cultivo celular; d) poner en contacto el sustrato de cultivo celular de (c) con medio de cultivo celular en el aparato de cultivo; y e) sembrar el sustrato de cultivo celular de (d) con células, para producir de esta manera un cultivo celular. En algunas modalidades de este método, la trituración de la biomatriz puede llevarse a cabo en un molino con congelación (por ejemplo, trituración criogénica) a la temperatura del nitrógeno líquido, o cercana a esta.

10 En algunas modalidades antes de sembrar las células para el cultivo celular, se añade una porción del medio al aparato de cultivo ya que las células pueden unirse en segundos. Las células, en algunas modalidades, se unen en cuestión de segundos a minutos para las células adultas normales y en cuestión de minutos a algunas horas para diversos tipos de células madre. En algunas modalidades la fijación de las células puede depender de cómo se dispersan los andamios de biomatriz para su uso en los cultivos. El medio celular puede ser cualquier medio que sea adecuado para producir un cultivo celular. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende al menos un constituyente presente en el fluido intersticial, en donde la osmolalidad de dicho medio es de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, en donde dicho medio está libre de suero y en donde el pH es neutro. En otras modalidades, el medio de cultivo celular puede ser un medio basal, tal como, pero sin limitación, RPMI-1640, DME/F12, medio de Ham, medio de Kubota, etcétera.

20 Los cultivos celulares producidos con los andamios de biomatriz, en algunas modalidades, comprenden, consisten esencialmente, o consisten en el mismo tipo de células que las células del tejido biológico que se utilizó para fabricar el andamio de biomatriz. Los ejemplos no limitantes de las células de esta invención incluyen células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS), células madre determinadas, células madre perinatales, células madre derivadas de líquido amniótico (AFSC), células madre mesenquimales (MSC) de cualquier fuente, progenitores comprometidos o células adultas de cualquier tipo de tejido, células maduras, células normales, células enfermas, células tumorales y cualquier combinación de estas. Los ejemplos no limitantes adicionales incluyen células hepáticas, células parenquimatosas, células estrelladas, células endoteliales, hepatocitos, colangiocitos, células del árbol biliar que no son colangiocitos y células pancreáticas.

30 En algunas modalidades, las células madre primitivas (ES, iPS, MSC o AFSC) restringirán el linaje de las células, al menos parcialmente, al tipo de tejido utilizado para fabricar el andamio de biomatriz. Las células madre determinadas de una capa germinal dada limitarán su linaje al tipo de tejido utilizado para obtener el andamio de biomatriz cuando el andamio se prepara a partir de un tejido derivado de esa capa germinal y pueden diferenciarse parcialmente al destino adulto si están sobre un andamio a partir de un tejido derivado de una capa germinal diferente. Por lo tanto, la capacidad de las células adultas de diferenciarse completamente puede determinarse por el tipo de tejido del andamio de biomatriz. Paralelamente, el destino de las células madre puede estar parcial o totalmente determinado por el tipo de tejido del andamio de biomatriz o el destino de las células madre puede estar completamente determinado por el tipo de tejido del andamio de biomatriz. En algunas modalidades, las células del cultivo celular son de un tipo diferente que las células del tejido biológico utilizado para obtener el andamio de biomatriz. Como se describió con detalle anteriormente, los tipos celulares ilustrativos que pueden usarse en la producción de un cultivo celular incluyen, pero sin limitación, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales, células madre derivadas de líquido amniótico, células madre determinadas, células maduras, células normales, células enfermas, células tumorales y cualquier combinación de estas. Estas células pueden ser de cualquier tejido biológico como se describe en la presente descripción.

45 En algunas modalidades los andamios de biomatriz inducen un crecimiento lento o detención del crecimiento correlacionado con la diferenciación de las células normales, ya sean células madre o células maduras. Las células maduras, en algunas modalidades, se diferencian completamente en cuestión de horas y permanecen diferenciadas de manera estable durante al menos ocho semanas después. En algunas modalidades, las células adultas (es decir, las células completamente maduras) se unen a los andamios en cuestión de minutos y mantienen su diferenciación completa después de eso por más de ocho semanas. Las células madre, en algunas modalidades, sufren unas pocas divisiones y después entran en detención del crecimiento y se diferencian completamente. Las células madre permanecen estables en la detención del crecimiento, viables y totalmente diferenciadas durante al menos ocho semanas. En algunas modalidades, las células madre sembradas sobre andamios de biomatriz entran en detención del crecimiento o ralentizan el crecimiento, pierden los marcadores de células madre y se diferencian a células maduras funcionales en aproximadamente una semana, que retienen fenotipos estables y viabilidades durante al menos ocho semanas o más (por ejemplo, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de viabilidad durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas, al menos 13 semanas, al menos 14 semanas, al menos 15 semanas, al menos 16 semanas, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses, al menos 11 meses, al menos un año, etcétera).

65 En otras modalidades, el andamio de biomatriz se utiliza para diferenciar células madre embrionarias (ES) y/o inducir

células madre pluripotente (IPS) a un destino específico. Por ejemplo, en algunas modalidades se utiliza un andamio de biomatriz con especificidad tisular para facilitar la diferenciación de células madre embrionarias o células pluripotentes inducidas hacia un destino específico.

5 En determinadas modalidades de la presente invención, el andamio de biomatriz se utiliza para diferenciar células madre derivadas de líquido amniótico (AFSC) o células madre mesenquimales (MSC) de la médula ósea o del tejido adiposo o de cualquier tejido fetal o postnatal o cualquier célula madre determinada (por ejemplo, de pulmón, intestino, árbol biliar, riñón, piel, corazón, etcétera) hacia un destino adulto específico. En algunas modalidades, los andamios de biomatriz de la presente invención se usan para potenciar y acelerar la diferenciación de células madre a células maduras mediante la producción de un cultivo celular.

10 En otras modalidades, la presente invención proporciona un método para aumentar y/o acelerar la diferenciación de células madre y/o progenitores a células maduras; el método comprende producir un cultivo celular de acuerdo con los métodos de esta invención, en donde las células son células madre y el medio de cultivo celular se formula para células maduras, para potenciar y/o acelerar de esta manera la diferenciación de células madre y/o progenitores a células maduras. El medio de cultivo celular puede ser cualquier medio que se formule para células maduras. Los constituyentes en el medio son distintos para cada tipo celular. La diferenciación significa que las condiciones provocan que las células maduren a tipos celulares adultos que producen productos génicos específicos de adultos. Las células empleadas en estos métodos pueden ser células adultas de cualquier tipo o células madre o progenitores, cuyos ejemplos no limitantes incluyen células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre de la capa germinal, células madre determinadas, células madre perinatales, células madre derivadas de líquido amniótico, células madre mesenquimatosas, células amplificadoras de tránsito o progenitores comprometidos de cualquier tipo de tejido.

15 20 25 Las células sembradas en los andamios de biomatriz (por ejemplo, andamios de biomatriz intactos, secciones de andamios o andamios de biomatriz en polvo mezclados en/sobre otros materiales implantables) pueden trasplantarse a animales o seres humanos como un método de injerto de células *in vivo*. En algunas modalidades se proporciona un método para suministrar células a un sujeto, el método comprende poner en contacto al sujeto con el andamio de biomatriz de la presente invención, en donde el andamio de biomatriz comprende las células. En otras modalidades se proporciona un método para suministrar células a un sujeto; el método comprende sembrar el andamio de biomatriz de la presente invención con células y después trasplantar el andamio de biomatriz sembrado con las células al sujeto. En algunas modalidades, un andamio de biomatriz que no se ha sembrado con ninguna célula puede trasplantarse a un sujeto.

30 35 En algunas modalidades, el andamio de biomatriz puede utilizarse como un injerto que puede usarse para regenerar el tejido u órgano en el sujeto.

Los andamios de biomatriz de la presente invención pueden utilizarse para establecer órganos bioartificiales, que pueden ser útiles para programas analíticos y/o clínicos. Los andamios de biomatriz pueden usarse, además, para identificar productos génicos específicos o facetas de estados patológicos. En algunas modalidades, los andamios de biomatriz se preparan a partir de tejidos de animales mutantes y posteriormente se usan para definir factor(es) relevante(s) asociado(s) con la(s) mutación(es). En otras modalidades, los andamios de biomatriz se preparan a partir de tejidos patológicos y se usan para definir cambios en la matriz relevantes para la enfermedad.

40 45 50 55 Los ejemplos adicionales no limitantes de usos de los andamios de biomatriz de esta invención incluyen: 1) uso del andamio para cultivar células malignas para definir su potencial metastásico (la capacidad de las células tumorales para formar colonias crecientes de células en un tipo dado de andamio de biomatriz es predictiva de la capacidad de las células para hacer metástasis al tejido del que se preparó ese andamio; 2) colocar injertos de tejido en el andamio para utilizarse para el trasplante en un sujeto); 3) producción de organoides formados por recellularización de andamios para utilizarse como dispositivos auxiliares, tales como, por ejemplo, un organoide hepático que después se conecta a un sujeto con insuficiencia hepática; 4) el uso del andamio para la producción de proteínas (las células en el andamio producen un factor que puede aislarse del medio y/o de las células y después purificarse, y 5) el uso del andamio para la producción de virus dependientes del linaje; por ejemplo, para la producción de virus que requieren células diferenciadas para producir partículas suficientes para su uso como vacuna.

60 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para identificar el potencial metastásico de células tumorales en un tipo de tejido, que comprende a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; y e) controlar el crecimiento de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (d), en donde el crecimiento de células tumorales en el andamio de biomatriz identifica que las células tumorales pueden colonizar *in vivo* el tipo de tejido del que se produjo el andamio de biomatriz, lo que identifica de esta manera el potencial metastásico de las células tumorales en el tipo de tejido.

65 En la presente descripción se proporciona, además, un método para identificar una célula tumoral como sensible a un tratamiento antitumoral; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos

de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; y e) controlar el crecimiento de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (d), en donde el crecimiento de células tumorales en el andamio de biomatriz identifica que las células tumorales pueden colonizar *in vivo* el tipo de tejido del que se produjo el andamio de biomatriz, lo que identifica de esta manera el potencial metastásico de las células tumorales en el tipo de tejido.

En la presente descripción se proporciona, además, un método para identificar una célula tumoral como sensible a un tratamiento antitumoral, que comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; e) aplicar el tratamiento antitumoral a las células tumorales en el andamio de biomatriz; y f) controlar el crecimiento de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (e), en donde la falta de crecimiento de las células tumorales y/o la muerte de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (e) identifica las células tumorales como sensibles al tratamiento antitumoral. Los ejemplos no limitantes de tratamiento antitumoral incluyen agentes quimioterapéuticos, anticuerpos, terapia de radiación, inmunoterapia, terapia hormonal, etcétera, como se conoce bien en la técnica. En algunas modalidades, las células tumorales de un sujeto pueden sembrarse en diferentes andamios de biomatriz de esta invención y exponerse a tratamientos antitumorales respectivos. De acuerdo con los resultados de estos respectivos análisis de diferentes tratamientos antitumorales, se puede seleccionar un tratamiento antitumoral que sea eficaz contra las células tumorales del sujeto y el tratamiento antitumoral que pueda administrarse al sujeto para tratar el tumor del sujeto.

En otras modalidades, la presente invención proporciona un método para producir un injerto tumoral para el trasplante a un animal huésped; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células tumorales; d) mantener el andamio de biomatriz de (c) en condiciones de cultivo; y e) establecer una población de las células tumorales en el andamio de biomatriz de (d), para producir de esta manera un injerto tumoral para el trasplante al animal huésped. En diversas modalidades, el injerto tumoral puede ser singénico, alogénico o xenogénico con respecto al animal huésped.

En la presente descripción se proporciona, además, un método para producir partículas virales de un virus dependiente del linaje; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células de un tipo y una etapa de linaje, que pueden infectarse.

Además, la presente invención proporciona un método para producir un organoide formado por recelularización de un andamio de biomatriz; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células del mismo tipo tisular que el tejido biológico usado para preparar el andamio de biomatriz; y d) mantener las células en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo, con lo que se forman organoides a partir de las células, para producir de esta manera un organoide formado por recelularización del andamio de biomatriz. Este método puede comprender además la etapa de poner en contacto el organoide producido por las etapas (a) a (d) con un sujeto, para usar como un dispositivo auxiliar, como se conoce en la técnica. Cualquier tipo de célula que pueda usarse para producir el andamio de biomatriz de esta invención puede usarse en este método. En algunas modalidades, las células son células hepáticas.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para producir una proteína de interés en células cultivadas en un andamio de biomatriz; el método comprende: a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con los métodos de esta invención; b) poner en contacto el andamio de biomatriz de (a) con medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; c) sembrar el andamio de biomatriz de (b) con células que producen la proteína de interés; d) mantener las células de (c) en el andamio de biomatriz en condiciones de cultivo; y e) recolectar la proteína de interés producida por las células de (d), para producir de esta manera una proteína de interés en células cultivadas en un andamio de biomatriz. Este método puede comprender la etapa adicional de purificar la proteína de interés recolectada en la etapa (f). La proteína de interés de esta invención puede ser cualquier proteína producida por una célula, ya sea a partir de un gen endógeno y/o como una proteína recombinante, en una cantidad que pueda recolectarse de las células en cultivo y/o el medio de cultivo. Numerosos ejemplos de tales proteínas de interés se conocen en la técnica.

La presente invención se explica con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. La restricción del linaje de células madre hepáticas humanas a los destinos maduros se vuelve eficiente mediante andamios de biomatriz con especificidad tisular.

- Resumen. Los protocolos actuales para la diferenciación de células madre hacen uso de múltiples tratamientos de señales solubles y/o factores de la matriz y producen típicamente la diferenciación parcial a células maduras con subexpresión o sobreexpresión de genes específicos de tejidos adultos. En la presente invención, se desarrolló una estrategia para la diferenciación rápida y eficaz de células madre mediante el uso de sustratos de andamios de biomatriz, extractos específicos de tejidos enriquecidos en matriz extracelular y factores de crecimiento y citocinas asociados, en combinación con un medio hormonalmente definido y libre en suero (HDM) adaptado para el tipo de células adultas de interés. Los estudios descritos en la presente demuestran la eficacia de los andamios de biomatriz de esta invención en la diferenciación de células madre hepáticas humanas (hHpSC) a destinos maduros y en el mantenimiento de células parenquimatosas maduras como completamente funcionales durante largos períodos de tiempo. Los andamios de biomatriz se prepararon por un novedoso protocolo de descelularización de cuatro etapas mediante el uso de condiciones diseñadas para mantener insolubles a todos los tipos de colágeno. Los andamios mantuvieron la histología nativa, vasculatura evidente y aproximadamente el 1 % de las proteínas tisulares, pero > 95 % de sus colágenos, la mayor parte de los componentes de la matriz asociados al colágeno del tejido y los niveles fisiológicos de factores de crecimiento y citocinas unidos a la matriz. Los colágenos aumentaron de niveles casi indetectables a > 15 % de las proteínas del andamio con el resto que incluye lamininas, fibronectinas, elastina, nidógeno/entactina, proteoglicanos y citocinas y factores de crecimiento unidos a la matriz en patrones correlacionados con la histología. Las células madre hepáticas humanas (hHpSC), sembradas en los andamios de biomatriz hepática y en un HDM adaptado para células hepáticas adultas, perdieron los marcadores de células madre y se diferenciaron a células parenquimatosas maduras y funcionales en aproximadamente una semana, permaneciendo viables y con fenotipos de células maduras estables para más de ocho semanas. Por lo tanto, los andamios de biomatriz de esta invención pueden usarse para estudios biológicos y farmacéuticos de células madre restringidas al linaje, para el mantenimiento de células maduras y para tejidos u órganos modificados, vascularizados e implantables.
- 25 Procedimientos para la descelularización. Después de la anestesia con ketamina y xilacina, se abrió la cavidad abdominal de la rata y se insertó un manguito con una cánula en la vena porta para perfundir todo el hígado. (1) La perfusión se realiza con RPMI 1640 durante 10 minutos; seguido de (2) deslipidación con una lipasa (por ejemplo, 20-50 unidades de fosfolipasa A2--PLA2) combinada con un detergente suave tal como desoxicolato sódico al 1 % (SDC) durante aproximadamente 30-60 minutos hasta que el tejido se vuelve transparente y la efusión se vuelve clara; (3) la perfusión con lavados con alto contenido de sal (para hígados fetales: 4,5 M de NaCl y para hígados adultos 3,4 M-3,5 M de NaCl) se realiza hasta que el perfusado sea negativo para proteínas según la densidad óptica (DO) a 280 nm; (4) perfusión con nucleasas (DNAasa, RNAasa) en RPMI 1640 hasta que el perfusado sea negativo para ácidos nucleicos según DO 260; y (5) enjuague final con RPMI 1640 durante 2 horas o más.
- 35 Los andamios de biomatriz se congelan rápidamente en hielo seco y se preparan secciones congeladas con un criostato, se colocan en placas de cultivo celular de 24 pocillos, se esterilizan por irradiación gamma (5000 rads) y se rehidratan en medio (KM) durante 30 minutos antes de sembrar las células. Las secciones de andamios de biomatriz cubrieron ~ 95 % de la superficie de los pocillos en la placa de 24 pocillos.
- 40 Un método alternativo para distribuir los andamios de biomatriz en las placas de cultivo consistió en pulverizarlo hasta obtener un polvo mediante el uso de un molino con congelación lleno con nitrógeno líquido. El polvo pulverizado, cuando se lleva a temperatura ambiente, adquiere la consistencia de una pintura, y con él puede recubrirse cualquier superficie, tal como placas, portaobjetos, tela, filtros u otras superficies utilizadas para unir células y/o cultivo de células. La pulverización de los andamios elimina los gradientes de los componentes y las señales de la matriz, pero la mezcla de componentes presentes todavía produce potentes efectos de diferenciación. Los andamios pueden usarse además intactos y volver a sembrarse con células en la preparación de órganos modificados para el trasplante *in vivo* o para cultivos 3-D.
- 50 Se desarrollaron métodos alternativos para usar con hígados porcinos y bovinos. Los hígados de cerdo y bovino se obtuvieron de una instalación de procesamiento de carne certificada por el USDA (CT). Ver el Ejemplo 3 para un esquema de un protocolo representativo. Cada hígado se inspeccionó por USDA y recibió el sello USDA antes de salir de la instalación. Los hígados se transportaron en medio ESP-Gro (Gigacyte, Branford, CT, núm. de catálogo 1101-250). Los hígados recibidos en el laboratorio se pesaron, se fotografiaron y se prepararon para la perfusión. Después de triturar, la mezcla se descongeló y se diluyó a una relación de medio:biomatriz de 1:48. Esta suspensión de biomatriz se usó después para recubrir las placas. Después de secar, la biomatriz se lavó tres veces y después se aplicaron las células. Las células hepáticas adultas se unieron en 10 minutos a las placas. Las células madre/progenitores pueden tomar más tiempo (unas pocas horas). Sin embargo, tanto para las células madre/progenitores como las células hepáticas adultas, esencialmente el 100 % de las células viables se adhieren.
- 60 Medios y soluciones. Todos los medios se filtraron de manera estéril (filtro de 0,22 μm) y se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C antes de su uso. Para mantener los colágenos estables en la biomatriz, el pH del medio de perfusión para la preparación de los andamios de biomatriz se mantuvo a 7,5 - 8,0. Se utilizó RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) como medio basal para la preparación de los andamios de biomatriz y para los cultivos de hepatocitos o células madre hepáticas. Todos los reactivos excepto los indicados se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO).

Medios de perfusión para la preparación de andamios de biomatriz.

- (1). Lavado por perfusión y enjuague por perfusión: medio basal libre de suero (por ejemplo, RPMI-1640);
- (2). Perfusión con detergente: 36 unidades/l de PLA2 más 1 % de SDC;
- (3). Perfusión con alto contenido de sal: NaCl 3,4 M con inhibidor de tripsina de soja a 0,1 mg/ml;
- (4). Perfusión con nucleasas: RNAasa a 5 mg/100 ml, DNAasa a 1 mg/100 ml e inhibidor de la tripsina de soja a 0,1 mg/ml (por ejemplo, preparado en RPMI 1640).

Medio de Kubota. El KM se diseñó originalmente para hepatoblastos⁴⁷ y ahora se ha encontrado que es eficaz para los progenitores hepáticos humanos⁴⁸ y para otros progenitores endodérmicos, que incluyen los del árbol biliar (Wang y otros, "Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes and pancreatic islets" *Hepatology*, 2011, en prensa) y el páncreas (Wang, Y y Reid L, datos no publicados). Consiste en cualquier medio basal (en este caso RPMI 1640) sin cobre, bajo contenido de calcio (0,3 mM), selenio 10-9 M, 0,1 % de BSA, nicotinamida 4,5 mM, sulfato de zinc heptahidrato 0,1 nM (de Specpure, Johnson Matthew Chemicals, Royston, Inglaterra), hidrocortisona 10 - 8 M, transferrina/Fe 5 µg/ml, insulina 5 µg/ml, lipoproteína de alta densidad a 10 µg/ml y una mezcla de ácidos grasos libres que se añaden unidos a la albúmina sérica humana purificada.

Para diferenciar las células a un destino adulto, puede utilizarse un medio hormonalmente definido, libre de suero (HDM) adaptado al tipo deseado de células adultas. Por ejemplo, se utilizó un HDM para el destino hepático adulto que consistía en KM suplementado adicionalmente con calcio para alcanzar una concentración de 0,6 mM, cobre 10-12 M, triyodotironina (T3) 1 nM, glucagón 7 ng/ml, FGF 20 ng/ml, galactosa 2 g/l, oncostatina M (OSM) 10 ng/ml, factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 20 ng/ml e hidrocortisona 10-8 M.

Las células se sembraron en este HDM libre de suero en caso de sembrarse en los andamios; en circunstancias en las que se usaron enzimas para procesar las células o los tejidos, entonces el HDM se suplementó con FBS al 5 % (HyClone, Waltham, MA) durante unas pocas horas y después se cambió a HDM libre de suero a continuación. En paralelo, los experimentos de control, los cultivos se mantuvieron en el HDM con 5 % de FBS en todo el estudio, pero se encontró que la presencia de suero provocó que las células perdieran funciones diferenciadas con el tiempo. Las necesidades de factores solubles son menores que las normales para los cultivos en otros sustratos porque muchos de los factores están unidos a los andamios de biomatriz. Las necesidades de factores solubles son menores que las normales para los cultivos en otros sustratos porque muchos de los factores están unidos a los andamios de biomatriz.

Caracterización de árboles vasculares intactos en los andamios de biomatriz hepática. Los restos en la matriz de la ramificación y derivación de la vasculatura que incluyen la red de capilares en el andamio de biomatriz hepática de rata se han visualizado por microscopía óptica y de fluorescencia, respectivamente. Se inyectaron partículas de dextrano de 250 kDa marcadas con rodamina en el andamio de biomatriz hepática a través del resto de la vena porta para comprobar la integridad de los restos del sistema vascular en la matriz en los andamios de biomatriz. Se preparó una película mediante el uso de un microscopio de disección de fluorescencia Leica MZ16FA (motorizado).

Procesamiento del hígado fetal humano. Los tejidos hepáticos fetales se proporcionaron por una agencia acreditada (Advanced Biological Resources, San Francisco, CA) de fetos entre 16-20 semanas de edad gestacional obtenidos por interrupciones electivas del embarazo. El protocolo de investigación se revisó y aprobó por la Junta de Revisión Institucional para Estudios de Investigación en Humanos en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill. Se prepararon suspensiones de células hepáticas humanas fetales como se describió anteriormente^{48,49}. Brevemente, el procesamiento se llevó a cabo en RPMI 1640 suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1 %, selenio 1 nM y antibióticos. El tampón de procesamiento enzimático contenía colagenasa tipo IV a 300 U/ml y desoxirribonucleasa a 0,3 mg/ml a 32 °C con agitación frecuente durante 15-20 min. Las suspensiones enriquecidas se presionaron a través de una malla de calibre 75 y se centrifugaron a 1200 RPM durante 5 minutos antes de la resuspensión. La viabilidad celular estimada por exclusión de azul de tripán fue habitualmente superior al 95 %.

Enriquecimiento de hHpSC y cultivo en andamios de biomatriz. Se utilizaron dos métodos para la purificación o enriquecimiento de hHpSC:

- 1) Selección de cultivos. Se sembraron aproximadamente 3×10^5 células en una placa de cultivo de tejidos de 10 cm y en KM. El medio se cambió cada 3 días. Las colonias se formaron en cuestión de 5-7 días y se observaron durante y hasta 3 meses. Las colonias se recolectaron manualmente después de 14-18 días mediante el uso de un microscopio invertido (1X-FLAIII, Olympus, Japón y Melville, NY).
- 2) La inmunoselección magnética de subpoblaciones progenitoras hepáticas multipotentes (hHpSC y hHB) se logró mediante la selección de células positivas para la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM, CD326) mediante el uso de tecnologías de inmunoselección de perlas magnéticas con el sistema MACS de Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante⁵⁰. En resumen, las células disociadas se incubaron con anticuerpo para EpCAM unido a microperlas magnéticas durante 30 min a 4 °C, y se separaron mediante el uso de un sistema de separación en columna magnética de Miltenyi según los procedimientos recomendados por el fabricante.

Los cultivos se sembraron con 250 colonias de hHpSC, o 5×10^5 hHpSC enriquecidas o $2,5 \times 10^5$ hepatocitos adultos primarios. El medio se reemplazó diariamente y el medio recolectado se almacenó a -20°C para un análisis posterior. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos recubiertas con Colágeno tipo I sirvieron como control.

5 Aislamiento de hepatocitos adultos de rata. Las suspensiones recién aisladas de hepatocitos de rata se obtuvieron a partir de ratas Lewis macho adultas de 3 meses de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) que pesaban 200-250 g. Se utilizó un método mejorado de perfusión en dos etapas como se describió anteriormente⁴⁹ para el aislamiento y purificación de los hepatocitos de rata. El hígado se perfundió durante 10-15 minutos con un tampón libre de calcio que contenía EGTA y después colagenasa en un tampón que contenía calcio durante 10-15 minutos. Después el hígado se disoció mecánicamente presionando el hígado digerido a través de una tela de queso y después se filtró secuencialmente la suspensión celular a través de tamices con tamaño de la malla cada vez menores. Las células se lavaron dos veces y después se sedimentaron a 50 g. La viabilidad se definió mediante el conteo de las células después de la tinción con azul de tripán. Rutinariamente, se aislaron 200-300 millones de células por rata con una viabilidad del 89-96 % y una pureza > 99 %.

15 Aislamiento y cultivo de células hepáticas adultas humanas. Las suspensiones de células hepáticas humanas frescas se obtuvieron de CellzDirect. (ahora una parte de Invitrogen, RTP, NC). Las suspensiones se procesaron mediante métodos de CellzDirect y después se resuspendieron en medio HeptoMAIN (núm. de catálogo 1103-250; GigaCyte, Branford, CT), se sembraron a $1,88 \times 10^5$ células/cm² en placas de múltiples pocillos recubiertas con andamios de biomatriz hepática o sobre colágeno tipo I ($1 \mu\text{g/ml}$, Meridian núm. de catálogo A33704H).

20 Análisis de la química del colágeno. La cantidad de colágeno en los andamios de biomatriz se evaluó en base al contenido de hidroxiprolina (hyp). Las muestras de hígados enteros y de andamios de biomatriz se pulverizaron, lavaron y liofilizaron. Las alícuotas se hidrolizaron después y se sometieron a análisis de aminoácidos⁵¹, y el contenido de colágeno por proteína total se estimó sobre la base del valor de hyp de 300 residuos/colágeno.

25 Análisis cuantitativo del contenido de ADN y ARN. Para evaluar el ADN total que permanecía en la biomatriz hepática descclularizada, tanto el tejido hepático fresco de rata como la biomatriz descclularizada se pesaron, cortaron y digirieron con proteinasa K y se aisló el ADN celular total⁵². Para evaluar el ARN total que permanecía en la biomatriz hepática descclularizada, tanto el tejido hepático fresco de rata como la biomatriz hepática descclularizada de rata se pesaron y después se homogeneizaron en solución de TRIzol (Invitrogen), y se aisló el ARN celular total.

30 Ensayos de factores de crecimiento. Las muestras de hígados de rata, andamios de biomatriz hepática de rata, tejido del conducto biliar humano y andamios de biomatriz de conducto biliar humano (dos muestras de cada uno) se enviaron a RayBiotech, Inc (Norcross, Georgia) para el análisis de los factores de crecimiento. Las muestras se homogeneizaron, se prepararon como lisados y después se sometieron a ensayo con 1 mg/ml de proteína, que produce fluorescencia, definida en unidades de intensidad fluorescente (FIU). Los ensayos semicuantitativos de factores de crecimiento se realizaron mediante el uso de los Arreglos para Factores de Crecimiento Humanos RayBio®, Serie G 1. Las FIU se redujeron con respecto a la de los controles negativos en cuanto a la unión no específica y se normalizaron con respecto a la concentración de proteínas. Los datos de los duplicados se promediaron. Se utilizaron cuatro arreglos que permitieron el estudio de ~ 40 factores de crecimiento. Aunque el ensayo se desarrolló para factores de crecimiento humanos, hay suficiente solapamiento en reacción cruzada con los factores de crecimiento de rata para permitir el uso tanto de muestras de rata como humanas.

35 Microscopía electrónica de transmisión y barrido (TEM y SEM). Para TEM, los andamios de biomatriz se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron en glutaraldehído al 3 %/cacodilato sódico 0,1, pH 7,4 durante la noche. Después de tres lavados con tampón de cacodilato sódico, los andamios de biomatriz se fijaron posteriormente durante 1 hora en tampón de tetróxido de osmio al 1 %/cacodilato sódico 0,1. Después de enjuagar en agua desionizada, se deshidrató y se embebió en resina epóxica Polybed 812 (Polysciences, Niles, IL). Los andamios de biomatriz se cortaron perpendicular al sustrato a 70 nm mediante el uso de una cuchilla de diamante. Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de cobre con malla 200 y se tiñeron con acetato de uranilo acuoso al 4 % durante 15 minutos, seguido por citrato de plomo de Reynolds durante 7 minutos. Las muestras se visualizaron mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión LEO EM910 que funciona a 80 kV (LEO Electron Microscopy, Oberkochen, Alemania). Las imágenes digitales se adquirieron mediante el uso de una cámara digital CCD SC1000 Orius de Gatan y Digital Micrograph 3.11.0 (Gatan, Pleasanton, CA).

45 Para SEM, después de la fijación y los enjuagues, los andamios de biomatriz se deshidrataron y se transfirieron en etanol al 100 % al secador de punto crítico CPD -020 Balzers (Bal-Tec AG, Balzers, Suiza) y se secaron mediante el uso de dióxido de carbono como disolvente de transición. La matriz se montó sobre soportes de muestra de aluminio con lengüetas adhesivas de carbono y se recubrió con un espesor de 10 nm de metal oro-paladio (aleación 60:40) mediante el uso de un recubridor por pulverización Hummer X (Anatech, Worcester MA). Las muestras se examinaron mediante el uso de un Zeiss Supra 55 FESEM a un voltaje de aceleración de 5 kV y se adquirieron imágenes digitales mediante el uso del programa informático SmartSEM de Zeiss (Carl Zeiss SMT, Alemania y Thornwood, NY).

Inmunocitoquímica e inmunohistología. Para la tinción fluorescente de las células cultivadas en los andamios de biomatriz, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con HBSS, se bloquearon con suero de cabra al 10 % en HBSS durante 2 h y se enjuagaron. Las células fijadas se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche, se lavaron, se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios específicos del isotipo y marcados, se lavaron, se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para visualizar los núcleos celulares y se observaron mediante el uso de un microscopio invertido Leica DMIRB (Leica, Houston, TX).

Para la inmunohistoquímica, los andamios de biomatriz se fijaron en PFA al 4 % durante la noche y se almacenaron en etanol al 70 %. Se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm. Las secciones se desparafinaron, y los antígenos se recuperaron. Las peroxidasa endógenas se bloquearon por incubación durante 30 minutos en una solución de H₂O₂ al 0,3 %. Después de bloquear con suero de caballo al 10 %, se aplicó el anticuerpo primario a 4 °C durante la noche; el anticuerpo secundario y la tinción ABC se realizaron mediante el uso del kit RTU Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El vector Nova RED se usó como sustrato. Las secciones se deshidrataron, fijaron y embebieron en medio de montaje Eukitt (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), y se analizaron mediante el uso de un microscopio invertido. Los anticuerpos utilizados para las secciones de hígado y para los cultivos se enumeran en la Tabla 4.

Análisis por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Las hHpSC se cultivaron en placas de cultivo celular, y las colonias se transfirieron sobre un andamio de biomatriz. Después de otro cultivo durante 7 días, las colonias se lisaron para RT-PCR. El ARN total se extrajo mediante el uso de un Mini kit RNeasy Plus (Qiagen GmbH, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se utilizó el Kit Master Mix HotStarTaq (Qiagen) para la PCR. Los cebadores de PCR se enumeran en la Tabla 5.

Ensayo LIVE/DEAD y ensayo de viabilidad celular. Se utilizó un kit para el ensayo de viabilidad LIVE/DEAD (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) para los ensayos de adhesión y proliferación. Las hHpSC o los hepatocitos se incubaron con dos sondas, calceína-AM (Live, gris claro) y homodímero-1 de etidio (EtdD-1, Dead), para la actividad de esterasa intracelular y la integridad de la membrana plasmática, respectivamente. Los especímenes se observaron bajo un estereoscopio de fluorescencia Olympus SZX12 (OLYMPUS, Japón y Melville, NY). Se utilizó un kit para el ensayo de viabilidad celular de resazurina (Biotium, Hayward, CA) según el manual del fabricante. Brevemente, se añadió 10 % de solución de resazurina al medio de cultivo y se incubó a 37 °C durante la noche. La absorbancia OD570-OD600 se obtuvo mediante el uso de un lector de microplacas con detección múltiple Biotek Synergy HT (Winooski, VT) y se obtuvo la curva de viabilidad. Todos los experimentos se realizaron tres veces mediante el uso de un mínimo de tres muestras por condición experimental.

Ensayos funcionales específicos hepáticos. La actividad de CYP450 3A4 se detectó mediante el uso de un sistema de tamizaje P450-GloTM™ (Promega, Madison, WI). Brevemente, las células cultivadas se incubaron con medio que contenía el sustrato luminogénico CYP3A4, luciferina-PPXE para CYP, durante 4 horas a 37 °C. La detección y análisis de luciferina se realizó según las instrucciones del fabricante con un contador Wallace Victor2 Multilabel (ahora parte de Perkins/Elmer en Waltham, MA). La cuantificación de la secreción de albúmina se realizó mediante el uso de un kit de cuantificación de ELISA para albúmina humana (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Para los ensayos de síntesis de urea, las células se incubaron con amonio 2 mM durante 24 horas y el sobrenadante se recogió y se ensayó con el kit de ensayo para urea Quantichrom (Bioassay Systems, Hayward, CA). El sobrenadante de una muestra para cada condición de cultivo se ensayó por triplicado y el experimento se repitió 3 veces.

Análisis estadístico. Los experimentos se repitieron al menos 2-3 veces con muestras duplicadas o triplicadas para cada condición. Se presentan datos de experimentos representativos, mientras que se observaron tendencias similares en los múltiples ensayos. Todas las barras de error representan la S.E.M.

Los andamios de biomatriz se prepararon con un novedoso protocolo de cuatro etapas. Los andamios de biomatriz se prepararon mediante el uso de un protocolo que comprende la deslipidación seguida por extracciones con alto contenido de sal y mediante el uso de métodos de perfusión (Figura 1). Una presentación detallada del protocolo se proporciona en los métodos. Esto se logra mediante un novedoso protocolo de cuatro etapas: 1) deslipidación suave; 2) lavados con tampones con concentraciones de sal de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 5,0 M (por ejemplo, 2,0 M - 2,5 M, 2,6 M - 3,0 M, 3,1 M - 3,5 M, 3,6 M - 4,0 M, 4,1 M - 4,5 M, 4,6 M - 5,0 M), concentraciones de sal que se conoce que mantienen los colágenos en un estado insoluble²³ (la concentración exacta y el pH de los tampones está dictada por los tipos de colágeno en el tejido), concentraciones que se conoce que mantienen los colágenos en un estado insoluble²³; 3) tratamiento con nucleasa para eliminar ácidos nucleicos residuales; y 4) enjuagues con un medio basal para eliminar los residuos de detergente, sales y nucleasas, así como para equilibrar los componentes de la matriz con el medio (Figura 1A).

Las elecciones de los medios de enjuague o de los tampones para las nucleasas pueden ser cualquiera de un número de opciones siempre y cuando la concentración de sal y la fuerza iónica sean tales que mantengan los componentes de la matriz en un estado insoluble. En la elección del método de deslipidación es fundamental que

sea eficaz y sin embargo suave. Se seleccionó una combinación de desoxicolato sódico (SDC) y Fosfolipasa A2 (PLA2) para degradar rápidamente el fosfoglicérido ubicado en la membrana citoplasmática y la membrana mitocondrial a lisolectina, un potente tensioactivo, que puede inducir necrosis y citolisis. La fórmula reactiva se muestra en la Figura 8. Evitamos los detergentes duros, como el dodecilsulfato sódico (SDS) o el Triton-X 100, que
 5 podría disolver algunos componentes de la matriz como los glicosaminoglicanos (Ver la reseña de Gilbert y otros, "Decellularization of tissues and organs" Biomaterials 27:3675-3683 (2006)).

Evitamos una exposición prolongada de los andamios a las enzimas de las células lisadas durante la deslipidación y los lavados con alto contenido de sal, porque pueden disminuir en gran medida el contenido de elastina y el
 10 contenido de glicosaminoglicanos (GAG) tales como sulfatos de heparán (HS), sulfatos de condroitina (CS), sulfatos de dermatán (DS) y heparinas (HP), que son sitios en los que se unen las citocinas y los factores de crecimiento²⁴. Se utilizó un inhibidor de la tripsina de soja y un control cuidadoso del pH (7,5 - 8,0), la temperatura (20 °C) y el tiempo (30-60 min) para limitar la actividad de las proteasas derivadas de las células lisadas.

Se perfundió todo el tejido a través de la vasculatura relevante (por ejemplo, la vena porta en el hígado), lo que permitió aislar rápidamente (en pocas horas) un andamio de biomatriz con pérdida mínima de los componentes de la matriz. La rapidez del aislamiento se debe a la etapa inicial con detergente que deslipida el tejido en aproximadamente 30-60 minutos (no horas o días como en los protocolos utilizados por otros). Los andamios de biomatriz resultantes son translúcidos o blancos (Figura 1). Además, mediante el uso de este método de perfusión,
 20 se mantuvieron los canales de la vasculatura primaria, vena porta y hepática y la mayor parte de las ramas vasculares en el hígado, lo que aumentó la eficacia de la descelerización. Las partículas fluorescentes de dextrano marcadas con rodamina perfundidas a través de los andamios de biomatriz permanecieron dentro de los restos de la vasculatura lo que demuestra su presencia (Figura 1E) Existe un flujo progresivo del colorante de los vasos grandes a las ramas finas de los vasos sanguíneos a lo largo de los canales sin fugas. Este hecho será útil en la revascularización de los andamios como un medio para preparar los tejidos modificados para el cultivo tridimensional y/o para la implantación *ex vivo*.

Cuando se cortan, los andamios retienen la estructura histológica del tejido original, que incluye los restos reconocibles de las entidades histológicas principales tales como los vasos sanguíneos, los conductos biliares y la cápsula de Glisson (GC) (Figura 1). Comparar las Figuras 1B1 y 1D1, en donde una sección del tejido hepático se contrasta con la de un andamio de biomatriz. Los restos de matriz de la muralia de células parenquimatosas consistieron en una red tipo encaje (Figura 1D2-1D3).

El colágeno, las proteínas asociadas al colágeno y las citocinas unidas se mantienen en los andamios de biomatriz. La cantidad de colágeno en los andamios de biomatriz se evaluó mediante el análisis de aminoácidos por métodos utilizados previamente²⁵. Dado que la hidroxiprolina (Hyp) es única para los colágenos y las proteínas colágenas, la composición de colágeno en relación con la proteína total se expresó como residuos de Hyp por cada 1000 aminoácidos. Los resultados demostraron que el contenido de colágeno aumentó desde niveles casi indetectables, es decir, menos de 0,2 residuos de hidroxiprolina (Hyp)/1000 en el hígado, a ~ 13 residuos de Hyp/1000 en los
 40 andamios de biomatriz. Esto indica que la deslipidación y los lavados con alto contenido de sal, descritos anteriormente, no eliminaron los colágenos, dejando casi todos los colágenos en los andamios de biomatriz. La detección de niveles significativos de hidroxilisina (Hyl), otro aminoácido asociado al colágeno y niveles más altos de glicina (Gly) en los andamios de biomatriz apoya nuestra conclusión de que el colágeno se enriquece marcadamente en los andamios de biomatriz (Figuras 2A, 9 y Tabla 2).

Mediante los estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales, pudimos identificar en los andamios todas las formas conocidas de los colágenos encontrados en el hígado *in situ*, que incluyen colágenos fibrilares (colágeno tipo I, III y V, 10-30 nm de diámetro para las fibrillas y 500-3000 nm para fibras ensambladas) y filamentos en cuentas (posiblemente tipo VI). Esas fibras y filamentos están presentes en la capa de tejido conectivo subcapsular situada debajo de la capa mesotelial. Aunque las estructuras típicas de las membranas basales no se encontraron a lo largo de los sinusoides desde las tríadas portales a las venas centrales, encontramos que el colágeno tipo IV y algunas pequeñas fibrillas unidas forman estructuras reticulares tridimensionales porosas, semejantes a redes, que sirven de andamio para las células parenquimatosas (Figura 2). Los haces de colágeno tipo I pueden observarse como la estructura principal de los andamios a los que se unen otros tipos de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. En el espacio de Disse encontramos pequeños haces de colágeno tipo I y fibras de colágeno tipo III y VI así como algún tipo V, el cual es más abundante cerca de las tríadas portales y venas centrales. Los datos representativos de inmunohistoquímica se presentan en la Figura 3B, y un resumen de los componentes de la matriz y su ubicación en el tejido hepático normal frente a los de los andamios de biomatriz se enumeran en la Figura 4D. Los primeros estudios en el desarrollo de los protocolos para la preparación de andamios de biomatriz indicaron que la mayor parte de los componentes del citoesqueleto se pierden en los lavados. Sin embargo, evaluamos los andamios mediante inmunohistoquímica y no encontramos evidencia de tubulina, desmina o actina, cantidades traza de citoqueratinas 18 y 19, y bajos niveles de vimentina dispersos a lo largo de los andamios.

La matriz asociada con los conductos biliares y las porciones de los sistemas vasculares hepáticos (vasos arteriales y venosos) consiste en estructuras típicas de la membrana basal y por lo tanto es bastante distintiva de las capas delgadas de la matriz asociada con las estructuras vasculares encontradas en los sinusoides. En la tríada portal se

encuentra laminina, entactina/nidógeno, perlecán y colágeno tipo IV, mientras que en el Espacio de Disse sólo se encuentra perlecán y algo de colágeno tipo IV. Están presentes cantidades enormes de elastina ondulada e hidrófoba; ésta se reticula y forma láminas y fibras restringidas principalmente al tejido conectivo subcapsular, regiones portales y paredes arteriales. Las fibronectinas son ubicuas y prevalecen en toda la matriz hepática y son especialmente abundantes en el espacio de Disse, donde forman filamentos finos o depósitos granulares (Figuras 2 y 3).

La inmunohistoquímica indica que los proteoglicanos conocidos en el tejido se conservan en los andamios de biomatriz (Figuras 3B, 4D). Entre los proteoglicanos heterogéneos identificados, el sindecano se encontró intercalado y de manera continua a lo largo de los sinusoides, y el perlecán es más puntual en el espacio de Disse. Las formas de HS-PG y CS-PG se encuentran a lo largo de los restos de los sinusoides en los andamios de biomatriz y en patrones que se correlacionan con la zonación conocida del tejido hepático.

Los proteoglicanos y otros componentes de la matriz son depósitos importantes para citocinas y factores de crecimiento que se unen estrechamente a sus GAG²⁶. La mayoría de los factores de crecimiento y las hormonas se encuentran en los andamios de biomatriz en concentraciones cercanas a las encontradas en el tejido original. En la Tabla 6 se proporcionan los datos de los lisados de hígados de rata frente a los andamios de biomatriz hepática de rata, y en la Tabla 3, se proporcionan datos paralelos de tejido de conducto biliar humano frente a andamios de biomatriz de conducto biliar. Curiosamente, hubo algunos ejemplos (por ejemplo, bFGF) con un fuerte enriquecimiento en los andamios de biomatriz hepática sobre el que se encontró en los lisados hepáticos. Los factores de crecimiento y las citocinas unidas tienen diferencias cualitativas y cuantitativas entre los andamios de tejido hepático con respecto a los de conducto biliar, lo que implica especificidad tisular o especificidad de especie. Alternativamente, puede deberse, en parte, al hecho de que los andamios de conductos biliares se prepararon, por necesidad, mediante agitación del tejido en los tampones sobre un balancín y no mediante perfusión a través de la vasculatura.

La química de los andamios de biomatriz se correlaciona con la histología. Una característica importante de este nuevo protocolo es la retención de la química de la matriz en los patrones que se correlacionan con las zonas acinares hepáticas 1-3 de la tríada portal a la vena central y con entidades histológicas como los canales vasculares y la Cápsula de Glisson (GC) como se muestra en las Figuras 4A-C. La química de la matriz periportalmente en la zona 1 es similar a la encontrada en los hígados fetales y consiste, en parte, en colágeno tipo III, laminina y formas de CS-PG. Esta transita a una química diferente de la matriz en las zonas medio acinar (zona 2) y pericentral (zona 3) que termina con una matriz muy estable con altos niveles de colágeno tipo IV y HP-PG²⁷.

Se sabe que una gran variedad de proteínas (por ejemplo, factores de crecimiento y hormonas, proteínas de coagulación, diversas enzimas) se unen a la matriz y se mantienen establemente mediante la unión a los patrones de sulfatación discretos y específicos en los GAG u otros componentes de la matriz²⁴. Por lo tanto, la química de la matriz transita desde su punto de inicio en el nicho de células madre que tiene una química de matriz lábil asociada con alta tasa de recambio y mínima sulfatación a una química de matriz estable y que tiene cantidades crecientes de sulfatación con progresión hacia la zona pericentral. Esperamos que el mantenimiento de la arquitectura natural y la química de la matriz en correlación con la histología facilitará la recelularización en los procesos de ingeniería tisular al dirigir a las células a sitios específicos en los andamios de biomatriz y/o proporcionar la mezcla adecuada de señales para conducir a la expansión y/o diferenciación a células maduras.

El andamio de biomatriz puede prepararse a partir de diferentes tejidos y especies. Los andamios de biomatriz pueden prepararse fácilmente a partir de cualquier tejido, normal o patológico y de cualquier especie. En las Figuras 13-16 se muestran andamios de biomatriz de páncreas, árbol biliar y duodeno humanos y de páncreas de rata y porcino. En las Figuras 5-7 y la Figura 12 se muestran efectos de andamios de biomatriz hepática de bovino o de rata sobre las células hepáticas. Además, los andamios de biomatriz se han preparado a partir de aorta abdominal, vena iliaca humanas y a partir de intestino de rata y cerdo. Los estudios histológicos, ultraestructurales e inmunohistoquímicos en los andamios de biomatriz indican una marcada especificidad tisular, pero no especificidad de especie, en su estructura, composición química y funciones.

Los andamios de biomatriz indujeron y/o mantuvieron la diferenciación de las células. La siembra de hHpSC en placas con secciones de andamios de biomatriz hepática y en HDM adaptado para células hepáticas adultas dio como resultado que esencialmente el 100 % de las células viables se unieron en unas pocas horas a los andamios de biomatriz; ya sea intactos o después de una pulverización criogénica. Las colonias de células que inicialmente se formaron en las secciones de los andamios retuvieron parte de su fenotipo de células madre, ya que las células en el centro de las colonias eran capaces de resistir la tinción con colorantes (Figura 11) y expresaron marcadores clásicos de progenitores hepáticos, tales como el receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C) (CXCR4) y la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) (Figura 5). Se dividieron una o dos veces y después transitaron a detención del ciclo celular y morfologías similares a un cordón tridimensional (3-D), típicas de cultivos de células parenquimatosas maduras (Figuras 5 y 6 para la diferenciación de células madre, comparar con la Figura 7 y la Figura 12). El HDM utilizado no requirió todas las citocinas o factores de crecimiento habituales, ya que estos están presentes unidos a los andamios de biomatriz. La transición a la detención del crecimiento se correlacionó con la tinción en todas las colonias con colorantes de viabilidad (Figura 12), con pérdida de la expresión de EpCAM y

CXCR4 y con un aumento constante en la expresión de genes hepatocíticos y colangiocíticos específicos de adultos como la urea y el citocromo P450 3A4. (Figura 5).

Los hepatocitos normales adultos humanos y adultos de rata se sembraron sobre andamios de colágeno tipo I o de biomatriz hepática a partir de hígado de rata o de bovino y en HDM para células adultas. Las células parenquimatosas adultas fueron capaces de fijarse a los andamios en 10 minutos (incluso en medio libre de suero) frente a horas en el colágeno tipo I, permanecieron en detención del crecimiento a partir del punto de unión; y se mantuvieron viables y totalmente funcionales durante más de 8 semanas en los andamios frente a sólo aproximadamente 2 semanas en el colágeno tipo I. (Figuras 7 y 12). Los niveles de funciones de las células hepáticas maduras en los andamios de biomatriz durante semanas resultaron ser los mismos o similares a los hallados en otros de hepatocitos adultos recién aislados²⁸. Las diferencias drásticas son que los cultivos sobre colágeno tipo I se deterioran rápidamente después de 2 semanas, mientras que los de los andamios de biomatriz permanecen estables morfológica y funcionalmente mientras los cultivos se mantengan (hasta ahora ~8 semanas).

Los andamios de biomatriz contienen la mayor parte de los componentes de la matriz extracelular del tejido y las citocinas y factores de crecimiento unidos a la matriz que proporcionan un conjunto compuesto de señales químicas que pueden usarse como un andamio insoluble y estable con una extraordinaria capacidad para inducir hHpSC a destinos hepáticos adultos, así como mantener las células adultas completamente diferenciadas durante semanas. Al comparar los tipos existentes de extractos de matriz preparados por los investigadores con los de andamio de biomatriz de la presente invención, está claro que los tratamientos físicos, enzimáticos y químicos tienen efectos sustanciales sobre la composición, el comportamiento mecánico y las respuestas del huésped a los andamios biológicos derivados de la descelularización de tejidos y órganos nativos, y en consecuencia, tienen implicaciones importantes para sus aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Todos los demás métodos existentes para la preparación de sustratos o andamios dan como resultado la eliminación de una gran parte de los componentes de la matriz ya sea mediante el uso de enzimas degradantes de la matriz¹⁶ o mediante el uso de tampones que disuelven las porciones principales de la matriz¹¹. Los métodos físicos (por ejemplo, congelación rápida y agitación) pueden utilizarse para preparar extractos de matriz a partir de tejidos con una estructura estratificada como la dermis (por ejemplo, SIS, BSM)²⁹, pero no son útiles para órganos con estructuras tisulares complejas como el hígado. Por el contrario, nuestro método para obtener andamios de biomatriz dio como resultado la pérdida de la mayoría de las proteínas celulares pero conservó esencialmente todos o al menos la mayoría de los colágenos y los componentes asociados al colágeno, que incluyen citocinas, hormonas y factores de crecimiento unidos a la matriz.

La matriz extracelular está embebida en una bicapa lipídica en mosaico, que incluso en el organismo más simple es un ambiente complejo, heterogéneo y dinámico. El método de deslipidación es una faceta crítica del protocolo. Los métodos utilizados comúnmente para la descelularización de tejidos implican detergentes iónicos tales como SDC y dodecilsulfato sódico (SDS). El SDC es relativamente más suave que el SDS, tiende a provocar menos alteración a la arquitectura tisular nativa y es menos eficaz para solubilizar las membranas celulares tanto citoplasmáticas como nucleares. No existen informes de descelularización tisular con el uso de SDC solo. Muchos estudios han utilizado detergentes no iónicos duros (por ejemplo, Triton X-100)³¹ o detergentes zwitteriónicos (por ejemplo, 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato, CHAPS)³². Por el contrario, nuestro método donde se utiliza una combinación de SDC y PLA2 logra la deslipidación del tejido rápida y suavemente.

Al menos veintinueve tipos de colágenos (I-XXIX) se han identificado hasta ahora en vertebrados, donde tienen papeles funcionales en la adhesión celular, diferenciación, crecimiento, desarrollo tisular e integridad estructural^{33,34}. Se conoce que los principales componentes estructurales en la matriz, los colágenos, permanecen insolubles en altas concentraciones de sal y a pH neutro^{35,36}, un hallazgo que es la base de nuestra estrategia en la preparación de andamios de biomatriz. La estrategia tiene las ventajas añadidas de que los colágenos permiten la preservación de los componentes de la matriz unidos a ellos, tales como lamininas y fibronectinas (FN), proteoglicanos ricos en leucina (PG) y GAG que a su vez preservan las citocinas, factores de crecimiento o receptores de la superficie celular que están unidos a ellos.

Los andamios de biomatriz son únicos en su gran capacidad para inducir una diferenciación rápida y consistente de las células madre/progenitoras tales como hHpSC a destinos adultos y para mantener aquellas células restringidas a un linaje y para mantener aquellas células restringidas a un linaje o también para mantener células adultas sembradas en los andamios, como células viables y plenamente funcionales durante muchas semanas (> 8 semanas).

La diferenciación de las células madre, tales como células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS) o diversas formas de células madre mesenquimales (MSC) a tipos de células hepáticas completamente maduras, requiere múltiples conjuntos de señales presentes (solubles y en la matriz) en etapas, con inducción por un conjunto de cebado necesario para responder a un conjunto diferente, y puede necesitar muchas semanas, hasta 6 semanas de cultivo, para generar células que tienen el destino hepático adulto³⁷. Además, la restricción del linaje de las MSC a los destinos hepáticos produce resultados inconsistentes con células adultas que tienen fenotipos mezclados de hepatocitos y MSC. La diferenciación de las células ES, células iPS y MSC da como resultado células similares a hepatocitos que expresan algunos, pero nunca todos, los principales genes específicos del hígado; con variabilidad en los genes que se observan; y los niveles de proteína para los genes hepáticos

expresados son generalmente bajos⁴⁰ o altos para un gen hepático e insignificantes para otros^{41,42}. Por el contrario, la diferenciación de las hHpSC en los andamios de biomatriz dio como resultado que esencialmente todas las células expresaron un fenotipo adulto clásico y con actividades de urea, albúmina y CYP450 a niveles casi normales después de una semana en cultivo.

Las células similares a hepatocitos a partir de cualquiera de estos precursores y diferenciadas mediante otros protocolos distintos a los andamios de biomatriz, expresan algunos, pero nunca todos, los principales genes específicos del hígado, con variabilidad en los genes que se observan y con niveles de proteína para los genes hepáticos generalmente más bajos o altos para un gen hepático e insignificantes para otros. Por razones desconocidas, los resultados son diferentes de preparación en preparación. Se espera que la utilización de los andamios de biomatriz de esta invención dé como resultado una diferenciación más rápida de estas poblaciones de células madre y con mayor consistencia en el logro de células con un fenotipo adulto estable.

La diferenciación de determinadas poblaciones de células madre, tales como hHpSC en andamios de biomatriz dio como resultado que esencialmente todas las células expresan un repertorio clásico de genes adultos y con actividades de urea, albúmina, y CYP450 a niveles casi normales en 1 a 2 semanas en cultivo y con estabilidad de ese fenotipo durante muchas semanas. Por lo tanto, los andamios de biomatriz de la presente invención tienen el potencial de facilitar en gran medida la diferenciación de determinadas poblaciones de células madre a un fenotipo hepático adulto.

La capacidad de diferenciar las células madre en los andamios de biomatriz para lograr células y tejidos maduros y funcionales ofrece oportunidades considerables para los programas académicos, industriales y clínicos que permiten el uso de tipos de células bien diferenciadas para cada tipo de estudio analítico y, lo más emocionante, permite la generación de tejidos o incluso órganos implantables, revascularizados que pudieran utilizarse para la investigación básica y programas clínicos.

Referencias para el Ejemplo 1

1. Lanza, R. y otros Handbook of Stem Cells, Vol. 2 volúmenes. (Elsevier Academic Press, Ciudad de Nueva York, 2004).
2. Vacanti, J.P. y Langer, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Lancet 354 Suppl 1, SI32 - 34 (1999).
3. *Schmelzer, E. y otros Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. Journal of Experimental Medicine 204, 1973-1987 [*igual contribución como primeros autores;**igual contribución como autores principales] (2007).
4. Zhang, L., Theise, N., Chua, M. y Reid, L.M. Human hepatic stem cells and hepatoblasts: Symmetry between Liver Development and Liver Regeneration. Hepatology 48, 1598 - 1607 (2008).
5. Kubota, H. y Reid, L.M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 12132-12137 (2000).
6. Wauthier, E. y otros Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation and *ex vivo* maintenance Methods for Cell Biology (Methods for Stem Cells) 86, 137-225 (2008).
7. Rhodes, J.M. y Simons, M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. Journal of Cell and Molecular Medicine 11, 176-205 (2007).
8. Chen, S.S., Fitzgerald, W., Zimmerberg, J., Kleinman, H.K. y Margolis, L. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulation embryonic stem cell differentiation. Stem Cells 25, 553-561 (2007).
9. Daley, W.P., Peters, S.B. y Larsen, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. Journal of Cell Science 21, 255-264 (2008).
10. Chun, S.Y. y otros Identificación y caracterización de factores bioactivos en la matriz de la submucosa vesical. Biomaterials 28, 4251-4256 (2007).
11. Huber, J.E., Spievack, A., Simmons-Byrd, A., Ringel, R.L. y Badylak, S. Extracellular matrix as a scaffold for laryngeal reconstruction. Ann Otol Rhinol Laryngol 112, 428-433 (2003).
12. Liotta, L.A., Lee, C.W. & Morakis, D.J. New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies. Cancer Letters 11, 141-152(1980).
13. Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R. & Martin, G.R. Formation of a supramolecular complex is involved in the reconstitution of basement membrane components. Biochemistry 22, 4969-4974 (1983).
14. Vlodaysky, I., Levi, A., Lax, I., Fuks, Z. y Schlessinger, J. Induction of cell attachment and morphological differentiation in a pheochromocytoma cell line and embryonal sensory cells by the extracellular matrix. Developmental Biology (Orlando) 93, 285-300 (1982).
15. Gospodarowicz, D., Delgado, D. y Vlodaysky, I. Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77, 4094-4098 (1980).
16. Badylak, S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Semin Cell Dev Biol 13, 377-383 (2002).
17. Gilbert, T.W. y otros Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder-derived extracellular matrix. Biomaterials 16 (2008).
18. Lee, M., Chang, P.C. y Dunn, J.C. Evaluation of small intestinal submucosa as scaffolds for intestinal tissue

- engineering. *Journal of Surgical Research* 147, 168-171 (2008).
19. Martin, N.D. y otros *In vivo* behavior of decellularized vein allografts. *Journal of Surgical Research* 129, 17-23 (2005).
- 5 20. Ott, H.C. y otros Perfusion-decellularize matrix using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine* 14, 213-221 (2008).
21. Macchianni, P. y otros Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372, 2023-2030 (2008).
22. Franklin, M.E., Jr. y otros The use of porcine small intestinal submucosa as a prosthetic material for laparoscopic hernia repair in infected and potentially contaminated fields: long-term follow-up. *Surgical Endoscopy* 22, 1941-1946 (2008).
- 10 23. Miller, E.J. y Rhodes, R.K. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods in Enzymology* 82, Parte A, 33-64 (1982).
24. Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. y Ornitz, D.M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell Molecular Life Science* 64, 841-848 (1991).
- 15 25. Yamuchi, M. y Shiba, M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods in Molecular Biology* 446, 95-108 (2008).
26. Liu, Y., Cai, S., Shu, X.Z., Shelby, J. & Prestwich, G.D. Release of basic fibroblast growth factor from a crosslinked glycosaminoglycan hydrogel promotes wound healing. *Wound Repair Regen* 15, 245-251 (2007).
- 20 27. Martinez-Hernandez, A., Delgado, F.M. & Amenta, P.S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin [published erratum appears in *Lab Invest* 1991 Aug;65(2):257]. *Laboratory Investigation* 64, 157-166 (1991).
28. LeCluyse, E.L. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 13, 343-368. (2001).
- 25 29. Brown, B., Lindberg, K., Reing, J., Stolz, D.B. y Badylak, S.F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Engineering* 12, 519-526 (2006).
- 30 30. Seddon, A.M., Curnow, P. y Booth, P.J. Membrane proteins, lipids and detergents, not just a soap opera. *Biochimica Biophysica Acta* 1666, 105-117 (2004).
31. Ozeki, M. y otros Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *Journal of Biomedical Materials. Research A* 79, 771-778 (2006).
- 35 32. Rieder, E. y otros Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to decellularization with human vascular cells. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 127, 399-405 (2004).
33. Olsen, B.R. y Ninomiya, Y. *Collagens: Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*. (Oxford University Press, Oxford; 1993).
- 35 34. Yurchenco, P.D. y O'Rear, J.J. Basement membrane assembly. *Methods Enzymol* 245, 489-518 (1994).
35. Seyer, J.M., Hutcheson, E.T. y Kang, A.H. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* 59, 241-248 (1977).
36. Traub, W. y Piez, K.A. The chemistry and structure of collagen. *Advances in Protein Chemistry* 25, 243-352 (1971).
- 40 37. D'Amour, K.A. y otros Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 24, 1392-1401 (2006).
38. Pittenger, M.F. y otros Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147. (1999).
- 45 39. Kazemnejad, S. y otros Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24, 278-287 (2009).
40. Lysy, P.A., Smets, F., Najimi, M. y Sokal, E.M. Leukemia inhibitory factor contributes to hepatocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Differentiation* 76, 1057-1067 (2008).
- 50 41. Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M. y Sokal, E.M. Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology* 134, 833-848 (2008).
42. Song, Z. y otros Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Research*, En prensa. Epub el 8 de septiembre (2009).
43. Hayes, A., Tudor, D., Nowell, M., Caterson, B. y Hughes, C. Unique forms of chondroitin sulfate proteoglycans in stem cell niches. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56, 125-138. (2007).
- 55 44. Couvelard, A. y otros Expression of integrins during liver organogenesis in humans. *Hepatology* 27, 839-847 (1998).
45. Lyon, M., Deakin, J.A. y Gallagher, J.T. Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *Journal of Biological Chemistry* 269, 11208-11215 (1994).
- 60 46. Vongchan, P. y otros Structural characterization of human liver heparan sulfate. *Biochim Biophys Acta* 1721, 1-8 (2005).
47. Wauthier, E. y otros Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation and *ex vivo* maintenance *Methods for Cell Biology (Methods for Stem Cells)* 86, 137-225 (2008).
48. Kubota, H. y Reid, L.M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12132-12137 (2000).
- 65 49. *Schmelzer, E. y otros Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *Journal of Experimental*

Medicine 204, 1973-1987 [*igual contribución como primeros autores;**igual contribución como autores principales] (2007).

50. Schmelzer, E., Wauthier, E. y Reid, L.M. Phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cell* 24, 1852-1858 (2006).

51. Yamauchi, M. y Shiiba, M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Molecular Biology* 446, 95-108 (2008).

52. Gilbert et al. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *Journal of Surgical Research* 152:135-139 (2009).

10 Ejemplo 2. Uso de andamios de biomatriz para cultivos de líneas de células tumorales o cultivos primarios de tumores

Los andamios de biomatriz de esta invención pueden usarse para producir cultivos de líneas de células tumorales o cultivos primarios de tumores. La capacidad para lograr esto significa que el tumor de un paciente puede evaluarse para determinar la sensibilidad a diversas terapias en un ensayo *ex vivo*.

Los andamios de biomatriz de esta invención pueden usarse además como sustratos para injertos de tumores (ya sean singénicos, alogénicos o xenogénicos) trasplantados a huéspedes.

20 Los andamios de biomatriz de esta invención pueden usarse además para evaluar el potencial metastásico de un tumor. Las células tumorales se siembran a bajas densidades de células sobre los sustratos de andamios de biomatriz de diversos tejidos. Las células tumorales se unirán y sobrevivirán en muchos tipos de andamios de biomatriz. Crecerán y formarán colonias preferentemente en algunos de ellos. Su capacidad para formar colonias en un tipo específico de andamio de biomatriz es predictiva de la capacidad de las células tumorales para colonizar el tejido a partir del cual se preparó el andamio de biomatriz.

Los cánceres colorrectales que habían metastizado en el hígado se resecaron y el tejido se preparó como cultivos primarios en medio de Kubota y en diversos sustratos. En la Tabla 9 se muestran los hallazgos de seis pacientes. Algunos de los pacientes tenían tumores que también habían metastizado a los pulmones. Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejidos, plásticas, recubiertas con colágeno tipo I ("colágeno") o placas recubiertas con andamios de biomatriz de colon, hígado o pulmón de rata. Todos los pocillos se sembraron con 20 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se alimentaron con medio de Kubota. Las células se unieron y sobrevivieron en todos los sustratos (ver las Figuras 17A-B). Sin embargo, fueron capaces de crecer y formar colonias mejor en determinados sustratos. Las condiciones que soportan el mayor número de colonias se correlacionaron con la capacidad de las células para crecer *in vivo* en los tejidos particulares a partir de los cuales se preparó un andamio. La cantidad de matriz o componentes de la matriz demostró ser una variable en la obtención de alguna colonia. En la Tabla 8 se muestra la cantidad de la matriz/pocillo necesaria para observar colonias. Evidentemente, la cantidad necesaria para el colon, el sitio del tumor primario, fue la menor. Los datos significativos se destacan en letras negritas.

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no debe interpretarse como limitante de esta. La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones, donde se incluyen los equivalentes de las reivindicaciones. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, publicaciones de patentes, secuencias identificadas por la Base de Datos GenBank® y/o números de registro de SNP, y otras referencias citadas en la presente descripción se incorporan mediante referencia en su totalidad para las enseñanzas relevantes a la oración y/o párrafo donde se presenta la referencia.

Tabla 1: Intervalos de concentraciones molares de NaCl para los colágenos tipo I-V.

Tipo de colágeno	Fuente	Intervalo de concentración molar de NaCl para la precipitación (por lo tanto, insolubilidad a la concentración especificada y/o a concentraciones superiores a la indicada)	
		pH ácido	pH neutro
I	Piel	0,7-0,9	2,6
I Trímero	Piel	0,7-0,9	4,0
III	Piel	0,7-0,9	1,5-1,7
IV	Placenta	1,2	1,7-2,0
V	Amnios y corion; placenta	1,2	3,6-4,5

Referencia: Paul Bornstein y Helene Sage (1980) Structurally Distinct Collagen Types. *Annual Review of Biochemistry*. 49:957-1003.

Estos datos son representativos de las condiciones para la insolubilidad de los tipos de colágenos. Se deben identificar los tipos de colágeno dentro de un tejido y después usar la concentración de sal más alta identificada para esos colágenos en el tejido y como la de los tampones usados para preparar los andamios de biomatriz. Por ejemplo, para la piel, se utilizaría un tampón a pH neutro y con una concentración de sal de 4,0 M, una

concentración de sal que mantendría insolubles a los colágenos tipo I y III. Por el contrario, para la placenta, se utilizaría un tampón a pH neutro y sal a 4,5 M para mantener insoluble tanto al colágeno tipo IV como el tipo V.

5 Los tipos de colágenos presentes en un tejido son distintos en las diferentes edades de un huésped. Por ejemplo, los hígados fetales tienen niveles altos de colágenos tipo III, IV y V (que requieren concentraciones de sal superiores a 4,0 M), mientras que los hígados adultos tienen una mezcla de colágenos tipo I, III, IV, V, VI y XVIII (que requieren concentraciones de sal más bajas). Por lo tanto, la concentración de sal necesaria para la preparación de un andamio de biomatriz está dictada por el repertorio de colágenos que son dominantes en el tejido. Ver la referencia 23 del Ejemplo 1 para más detalles.

10

Tabla 2. Análisis del contenido de colágeno en andamio de biomatriz hepática

Aminoácidos	ANDAMIOS DE BIOMATRIZ (N = 4)								TEJIDO HEPÁTICO (N = 3)					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	PROMEDIO	SD	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO	SD			
	Res/1000	Res/1000	Res/1000	Res/1000			Res/1000	Res/1000	Res/1000					
Hyp	10,0	13,8	15,3	12,1	12,8	2,3	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*			
Asp	82,7	77,1	78,4	85,5	80,9	3,9	93,0	94,5	90,8	92,8	1,8			
Thr	52,6	51,1	45,6	52,4	50,4	3,3	52,2	51,0	53,7	52,3	1,3			
Ser	56,5	53,7	61,9	62,4	58,6	4,2	57,7	57,0	62,0	58,9	2,7			
Glu	112,0	107,0	117,4	118,1	113,6	5,2	123,9	122,0	130,1	125,4	4,2			
Pro	52,3	52,2	55,7	51,6	52,9	1,9	46,6	45,9	46,4	46,3	0,4			
Gly	118,7	134,0	125,4	109,4	121,9	10,4	88,2	84,6	89,1	87,3	2,4			
Ala	88,3	86,1	89,5	83,6	86,9	2,6	79,0	78,2	90,6	82,6	7,0			
Val	64,3	57,2	54,8	65,9	60,6	5,4	71,6	71,3	70,1	71,0	0,8			
Met	21,7	20,6	20,7	20,4	20,8	0,6	21,4	21,4	21,7	21,5	0,2			
Ile	51,8	47,7	47,4	41,7	47,2	4,2	49,6	50,1	42,3	47,3	4,3			
Leu	92,7	83,8	109,7	87,5	93,4	11,5	93,8	95,1	92,7	93,9	1,2			
Tyr	30,8	26,9	22,4	28,1	27,0	3,5	31,8	32,1	27,5	30,5	2,6			
Phe	45,5	40,7	42,4	42,8	42,8	2,0	47,8	51,0	43,7	47,5	3,7			
His	21,0	18,8	13,2	21,8	18,7	3,9	21,8	21,5	24,1	22,5	1,4			
Hyl	1,0	1,8	1,6	4,3	2,2	1,5	0,0**	0,0**	0,0**	0,0**	0,0**			
Lys	40,6	70,0	49,8	66,2	56,7	13,8	74,6	78,5	73,0	75,3	2,8			
Arg	57,5	57,6	48,7	46,1	52,5	6,0	47,0	46,0	42,1	45,0	2,6			

Nota: * menor que 0,2 res/1000; ** no detectado.

Tabla 3. Análisis de factores de crecimiento unidos a los andamios de biomatriz de conducto biliar

Nombre	Nombre completo de la citocina	Conductos biliares humanos	Andamios de biomatriz de conducto biliar humano	%
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico	58299	126	0 %
b-NGF	Factor de crecimiento nervioso (polipéptido beta)	516	81	16 %
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	91	108	119 %
EGF R	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	479	145	30 %
FGF-4	Factor de crecimiento de fibroblastos 4	31	36	116 %
FGF-6	Factor de crecimiento de fibroblastos 6	14	17	121 %
FGF-7	Factor de crecimiento de fibroblastos 7	149	23	15 %
GCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos	207	233	113 %
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glia	53	49	92 %
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos	108	97	90 %
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	28	23	82 %
IGFBP-1	Proteínas 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	431	61	14 %
IGFBP-2	Proteínas 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	255	20	8 %
IGFBP-3	Proteínas 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	77	54	70 %
IGFBP-4	Proteínas 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	81	58	72 %
IGFBP-6	Proteínas 6 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	783	107	14 %
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina I	18	6	33 %
IGF-I SR	Factor de crecimiento similar a la insulina I	89	25	28 %
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina 2	2873	3945	137 %
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos	149	105	70 %
M-CSF R	Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos	358	71	20 %
NT-3	Neurotrofina 3	71	71	100 %
NT-4	Neurotrofina 4	75	58	77 %
PDGF R a	Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas	104	63	61 %
PDGF R b	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas	489	110	22 %
PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AA	114	52	46 %
PDGF-AB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB	87	65	75 %
PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB	155	75	48 %
PIGF	Biosíntesis del anclaje glicosilfosfatidilinositol, clase F	146	14	10 %
SCF	Factor derivado de células estromales 1	39	22	56 %
SCF R	Receptor del factor derivado de células estromales	159	31	19 %
TGF-a	Factor de crecimiento transformante alfa	52	25	48 %
TGF-b	Factor de crecimiento transformante beta	234	277	118 %
TGF-b 2	Factor de crecimiento transformante beta 2	103	121	117 %
TGF-b 3	Factor de crecimiento transformante beta 3	28	16	57 %
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial	74	35	47 %
VEGF R2	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2	108	33	31 %
VEGF R3	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 3	45	40	89 %

Tabla 4. Anticuerpo utilizado

	Nombre del anticuerpo	Huésped e isotipo	Compañía	Núm. de catálogo	Dilución
Anticuerpos primarios para los componentes de la matriz extracelular					
5	1. Colágeno 1	IgG1 de ratón	Sigma	C2456	1/2000
	2. Colágeno 3A1	IgG1 de ratón	Sigma	C7805	1/2000
	3. Colágeno 4A1	IgG de cabra	Santa Cruz	sc-9302	1/50
	4. Colágeno 5A1	IgG de conejo	Santa Cruz	sc-20648	1/50
	5. Colágeno 6	IgG de conejo	Santa Cruz	Sc-20649	1/50
10	6. sulfato de condroitina	IgM de ratón	Sigma	C8035	1/200
	7. Elastina	IgG de conejo	Abcam	ab21610	1/200
	8. entactina (nidógeno 1)	IgG de rata	GeneTex	GTX72367	1/200
	9. sulfato de heparán	IgM de ratón	Seiko, Japón	270426	1/200
	10. HS-PG: perlecán	IgG2a de ratón	NeoMarkers	RT-794	1/200
15	11. HS-PG: sindecano-1	IgG de cabra	R&D	AF2780	1/100
	12. Fibronectina	IgG1 de ratón	Sigma	F7387	1/200
	13. Laminina	IgG1 de ratón	Sigma	L8271	1/1000
Anticuerpos primarios para otras proteínas					
20	1. AFP	IgG de conejo	Novus Biologicals	NB100-1611	1/200
	2. Albúmina	IgG de conejo	Novus Biologicals	NB 600-570	1/200
	3. ASMA	IgG2a de ratón	Sigma	A2547	1/300
25	4. Ck18	IgG2b de ratón	Sigma	SAB3300016	1/400
	5. hCK19	IgG2a de ratón	Abcam	ab7754	1/250
	6. CK19	IgG de conejo	Abcam	Ab52625	1/200
	7. CYP3A4	IgG de ratón	Abnova	H00001576-B01P	1/200
	8. Desmina	IgG de conejo	Abcam	Ab8592	1/200
30	9. EpCAM	IgG1 de ratón	NeoMarkers	MS-181	1/200
	10. receptor de secretina	IgG de conejo	Santa Cruz	sc-26633	1/100
	11. PAN CK	IgG1 de ratón	Abcam	ab-7753	1/300
	12. Tubulina-a	IgG1 de ratón	Neomarkers	MS-581	1/1000
	13. Vimentina	IgG1 de ratón	Abcam	Ab8978	1/200
Anticuerpos secundarios o colorantes para tinción fluorescente de células o inmunohistoquímica tisular					
35	1. Alexa Fluor® 488/594 anticuerpo de cabra anti-IgG 1 o 2a de ratón o anti-IgG de conejo		Molecular Probes		1/500
	2. Sistema ABC VECTASTAIN®		Vector Laboratories		
	3. KIT DE SUBSTRATO NovaRED™		Vector Laboratories		
40	4. Faloidina 488		Molecular Probes		1/500

1.1 Transferir la biomatriz triturada a una botella de 100 ml marcada previamente con el número de lote y el número de la bolsa (el número de la bolsa identifica la fecha de la trituración)

1.2 Mantener congelado a -80 °C hasta que esté listo para recubrir las placas

2.0 Preparar la biomatriz para recubrir las placas

2.1 Descongelar una botella de biomatriz por método de descongelación rápida en baño de agua a 37 °C

2.2 Medir la suspensión de biomatriz descongelada (debe ser ~ 30 ml ± 2 ml)

2.3 Diluir a 1:24 con la Solución 5

2.3.1 Calcular el volumen de la Solución 5 para añadir a la suspensión de biomatriz a 1:6

2.3.1.1 Multiplicar el volumen de la suspensión de biomatriz x 3

2.3.1.2 Añadir ese volumen a la suspensión de 1:6 para una dilución de 1:24

2.4 Recubrir las placas inmediatamente (dejar que el conjunto de biomatriz diluido de lugar a un aglomerado)

3.0 Revestir las placas con biomatriz

3.1 Determinar el número de placas a recubrir. Consultar la Tabla 8 para los volúmenes de siembra

- Retirar aseptícamente las placas del empaque y organizarlas en la campana de flujo laminar
- Transferir el volumen apropiado de la suspensión de biomatriz en cada pocillo mediante el uso de una pipeta multicanal cuando sea apropiado. Consultar la Tabla 1 para el volumen de siembra
- Asegurar que la suspensión esté uniformemente distribuida en el pocillo, si es necesario, golpee suavemente

ES 2 624 742 T3

- la placa pero no la retire de la superficie plana de la campana.
 - Dejar que las placas permanezcan en reposo durante la noche
 - La primera acción a realizar el día siguiente es retirar la solución de cada pocillo
- 5
- Manipular las placas con cuidado para que el recubrimiento de la matriz no se altere
 - Inclinar la placa hacia usted sin retirar el borde de la placa de la superficie de la campana. Esto estabiliza la placa para evitar movimientos bruscos que produzcan que la biomatriz salga de la placa
 - Mediante el uso de un aparato de succión con una pipeta de punta fina, aspirar toda la solución de cada pocillo. ¡NO TOQUE LA SUPERFICIE DE LA MATRIZ CON LA PIPETA!!!
- 10
- Colocar suavemente la placa hacia abajo, retirar la tapa y dejar secar completamente (~ 2 horas)
 - Mover la placa mientras está húmeda altera el recubrimiento de la biomatriz
 - No mueva las placas hasta que la matriz esté seca
- 15
- Cuando esté completamente seca, cambie la tapa y examine la calidad
 - Colocar las placas que tienen un recubrimiento liso en la bolsa de la placa
 - Sellar la bolsa y aplicar la etiqueta
 - Esterilizar mediante irradiación gamma (5000 rads)
 - Almacenar las placas recubiertas a 4 °C
- 20
- Enviar las placas recubiertas en paquetes de 5 en el paquete con hielo

4.0 Utilización de las placas de biomatriz

4.1 Retirar asépticamente la placa del empaque y colocarla en su lugar en el gabinete de seguridad biológica

4.2 Agregar medio a cada pocillo y colocar en la incubadora durante al menos 2 horas antes del uso

4.3 Cuando estén listas para sembrar las células, retirar el medio de rehidratación y lavar con medio de cultivo de tejidos una vez

4.4 Añadir las células

Tabla 6. Análisis de factor de crecimiento unido a andamios de biomatriz hepática

Nombre	Nombre completo de la citocina	Hígados de rata	Andamios de biomatriz de rata	Por ciento
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico	100,06	394,14	394
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	74,81	76,02	102
EGF R	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	92,81	81,64	88
FGF-4	Factor de crecimiento de fibroblastos 4	15,06	13,21	88
FGF-6	Factor de crecimiento de fibroblastos 6	4,81	3,77	78
FGF-7	Factor de crecimiento de fibroblastos 7	10,06	6,32	63
GCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos	348,06	338,20	97
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía	81,31	43,59	54
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos	133,56	105,38	79
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	44,56	38,23	86
IGFBP-1	Proteínas 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	67,81	70,40	104
IGFBP-3	Proteínas 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	140,81	201,90	143
IGFBP-4	Proteínas 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	83,56	58,92	71
IGFBP-6	Proteínas 6 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	91,81	72,19	79
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina I	1,56	1,98	127
IEGF-I SR	Factor de crecimiento similar a la insulina I	7,31	3,51	48
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina 2	3749,06	3482,52	93
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos	170,31	134,68	79

ES 2 624 742 T3

	M-CSF R	Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos	70,56	50,47	72
	NT-3	Neurotrofina 3	25,56	5,03	20
	NT-4	Neurotrofina 4	55,06	43,59	79
5	PDGF R a	Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas	10,56	21,11	200
	PDGF R b	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas	113,81	85,46	75
10	PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AA	62,06	106,40	171
	PDGF-AB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB	19,31	19,34	100
	PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB	9,56	14,23	149
	PIGF	Biosíntesis de anclaje glicosilfosfatidilinositol, clase F	4,81	836	174
	SCF	Factor derivado de células estromales 1	2,06	42,56	2064
15	SCF R	Receptor del factor derivado de células estromales	17,06	17,80	104
	TGF-a	Factor de crecimiento transformante alfa	21,31	21,63	102
	TGF-b	Factor de crecimiento transformante beta	330,31	342,77	104
	TGF-b 2	Factor de crecimiento transformante beta 2	134,06	152,34	114
	TGF-b 3	Factor de crecimiento transformante beta 3	1,06	0,18	17
20	VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial	70,56	94,14	133
	VEGF R2	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2	13,56	11,93	88
	VEGF R3	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 3	459,56	46,91	10

Tabla 7. Propiedades de las células madre hepáticas humanas (hHpSC) después del aislamiento y en cultivo

Propiedades	hHpSC-recepción aisladas	Condiciones de autorreplicación (Día 12)	Condiciones de Diferenciación (Día 12)	
		KM y TCP o colágeno tipo III	DM y colágeno tipo I	DM y andamios de biomatriz
Tiempo necesario para adherirse	---	~4-5 horas en TCP; ~3 horas en colágeno tipo III	7-12 horas	~ 3 horas
% de adherencia de células viables	---	60-80 % en TCP y ~100 % en colágeno tipo III	~100 %	
Morfología de las colonias		Colonias bidimensionales (monocapa)	Cordones de células; algo cuboidal	Cordones de células; muy tridimensional
Tiempo de duplicación (tasa de división)	---	Una división cada ~36 horas en TCP y ~24-26 horas en colágeno tipo III	Una división cada ~40-50 horas con transición a la detención del crecimiento hacia los 7-10 días	Sólo unas pocas divisiones con transición a la detención del crecimiento hacia ~5 días
Duración de la viabilidad		> 6 meses (permanecen como células madre)	~ 2 semanas	> 8 semanas como células diferenciadas (no probado aún por más tiempo)
Porcentaje de células que expresan el marcador especificado				
EpCAM		100 %	Presente en membranas de colangiocitos pequeños; ninguna expresión en absoluto en hepatocitos maduros	
NCAM		>80 %	Ninguno	
CD133/1		90 %	Ninguno	
SOX 17		100 %	Ninguno	
CK 8/18, E-cadherina		100 %	100 %	
CK19		90 %	Presente en los colangiocitos pero no en los hepatocitos	
α-fetoproteína	Ninguna; En caso de haberla, es debido a contaminación con hepatoblastos		Expresión moderada en la mayoría de las células a los 10-12 días	La expresión en los primeros 2-3 días, disminuye drásticamente después de eso, sin expresión a partir del día 7 en adelante.

P450	Ninguno o niveles insignificantes	100 % (~ 18 000 RLU)*	100 % (~ 35 000 RLU)*
Urea sintetizada	Ninguno	~ 2,5 mg/dl	~ 7 mg/dl
Marcadores: hepatocitos maduros	La mayoría de las células no tienen ninguno; las que expresan lo hacen muy débilmente (por ejemplo, albúmina); todas expresan ARNm de transferrina, pero no la proteína de transferrina	albúmina, proteína transferrina, tirosina aminotransferasa (TAT), glucógeno. Niveles débiles en colágeno I frente a niveles fuertes en andamios de biomatriz	
Marcadores: colangiocitos maduros	La mayoría ninguno; las que expresan alguno lo hacen muy débilmente: (por ejemplo, CFTR, GGT1, AE2: ninguna expresión de ASBT ni acuaporinas tardías	Receptor de secretina, AE2, ABAT, CFTR, GGT1, AE2, ASBT, pero con niveles débiles en colágeno I frente a niveles muy fuertes en andamios de biomatriz	

KM = medio de Kubota, un medio libre de suero utilizado para hHpSC y progenitores; HM-L = medio de diferenciación derivado de KM y con hormonas y factores dados en los métodos. TCP = plástico de cultivo de tejidos.
*Ver la Figura 5F; **Ver la Figura 5E

Tabla 8. Cantidad de la matriz/pocillo necesaria para observar las colonias

	Cantidad de matriz en ug/CM2			
	Colágeno	Colon	Hígado	Pulmón
Inferior	5	3	10	30
Medio	50	5	25	50
Superior	100	7	50	100

Tabla 9. Resultados de seis pacientes

Paciente	Núm. de colonias				
	Plástico	Colon	Hígado	Pulmón	Colágeno
Paciente 1					
Concentración baja de la matriz	6	5,5	7,5	5,5	4
Concentración media de la matriz		7,5	14,5	14	1,5
Concentración alta de la matriz		9	9,5	19	2
Paciente 2					
Concentración baja de la matriz	5	15	13,5	25	1
Concentración media de la matriz		9	22,5	24	2,5
Concentración alta de la matriz		5	19,5	23,5	3
	Núm. de colonias				
Paciente 3					
Concentración baja de la matriz	6	7	5	5,5	1,5
Concentración media de la matriz		10,5	40,5	28	3,5
Concentración alta de la matriz		9,5	18,5	21	5,5
Paciente 4					
Concentración baja de la matriz	5,5	5,5	9	12	3
Concentración media de la matriz		6,5	11	16	2
Concentración alta de la matriz		7,5	13,5	18	1
Paciente 5					
Concentración baja de la matriz	5	6	10,5	14,5	4
Concentración media de la matriz		6,5	12,5	20	2,5
Concentración alta de la matriz		6,5	13	24,5	1,5
Paciente 6					
Concentración baja de la matriz	3,5	5,5	9	19	2,5
Concentración media de la matriz		6,5	15,5	18	3,5
Concentración alta de la matriz		4,5	16,5	25,5	3,5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill
 Wang, Yunfang
 5 Reid, Lola Cynthia McAdams
 Yamauchi, Mitsuo
 Cui, Cai-Bin
 Wang, Andrew Zhuang
 Werner, Michael Edward
 10
 <120> Andamios de biomatriz
 <130> 5470-560WO
 15 <150> US 61/360,939
 <151> 2010-07-02
 <160> 34
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 30 <400> 1
 tacaccgagg aaatgggctc a 21
 <210> 2
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 40 <400> 2
 agatgatgga gtagatgggtg gg 22
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 3
 ataacctgct ctgagcgagt g 21
 55 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 4
 tgaagtgcag tccgcaact 20
 65 <210> 5

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 5
 accaagtttg agacggaaca g 21
 10 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 6
 20 ccctcagcgt actgattcc t 21
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 30 <400> 7
 atgtggaagt ggctgcagga 20
 <210> 8
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 40 <400> 8
 tgtgtgcct ctatcctcc c 21
 <210> 9
 45 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 9
 gcgaccccaa gacctacag 19
 55 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 10
 65 ggttctgccg gtagaaggg 19
 <210> 11

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 11
 ttgacattgg agtgaaaagg acg 23
 10 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 12
 20 tgctcagaac cttggggatt c 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 30 <400> 13
 cttgcacaca aaaagcccac t 21
 <210> 14
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 40 <400> 14
 gggatgcctt cttgctatct cat 23
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 50 <400> 15
 tttatgcccc ggaactcctt t 21
 55 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 16
 65 acaggcaggc agctttatca g 21
 <210> 17

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 17
 cctcctacct tgattgcatc ag 22
 10 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 18
 20 ttttgaccca tagaactctg cc 22
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 30 <400> 19
 aagtcgctc gaagatacac a 21
 <210> 20
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 40 <400> 20
 aaggagagaa cactgctcgt g 21
 <210> 21
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 21
 tttgggaccc tgtaccattg t 21
 55 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 22
 65 gcattggact tgaggaagct c 21
 <210> 23

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 23
 tcagggaaag ataaagccga cc 22
 10 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 24
 20 aggtagattc gtagacagaca gac 23
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 30 <400> 25
 aaaaggccag cggtgtctcc 20
 <210> 26
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 40 <400> 26
 tgaagccagc tctctatccc a 21
 <210> 27
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 27
 ggggagatcg agggctatga g 21
 55 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 28
 65 gatgacggtc cgctgtttt c 21
 <210> 29

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 29
 gccaagggcg cagattct 19
 10 <210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 30
 20 ccaggtgcg gtgaagtc 19
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 30 <400> 31
 tgtgttgct tcctctgtca g 21
 <210> 32
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 40 <400> 32
 ggcagcatcc tataatgagc ac 22
 <210> 33
 <211> 23
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 33
 catgagaagt atgacaacag cct 23
 55 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de RT-PCR
 <400> 34
 65 agtcctcca cgataccaa gt 22

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un andamio de biomatriz a partir de tejido hepático de mamífero, que comprende:
 - a) perfundir u homogeneizar el tejido hepático con un primer medio basal, en donde la osmolalidad de dicho primer medio es de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg y dicho primer medio está libre de suero y a pH neutro; después
 - b) perfundir el tejido biológico o extraer el homogeneizado de la etapa (a) con un tampón de deslipidación que comprende desoxicolato sódico y fosfolipasa A2 en dicho primer medio; después
 - c) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (b) con un tampón a un pH neutro y que comprende una concentración de sal de 2,0 M de NaCl a 5,0 M, la concentración elegida para mantener insolubles los colágenos identificados en el tejido biológico; después
 - d) perfundir el tejido o extraer el homogeneizado de la etapa (c) con RNAasa y DNAasa en un tampón; y después
 - e) enjuagar el tejido u homogeneizado de la etapa (d) con un segundo medio que está a pH neutro, está libre de suero y tiene una osmolalidad de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg,
 para producir de esta manera un andamio de biomatriz intacto u homogeneizado a partir del tejido biológico, dicho andamio de biomatriz retiene al menos el 95 % de sus colágenos originales y la mayoría de los componentes de la matriz asociados al colágeno y factores de crecimiento, hormonas y citocinas unidos a la matriz del tejido biológico.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el medio basal se selecciona del grupo que consiste en medio RPMI 1640, DME/F12, DME, F12, medio de Waymouth y medio de William.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el segundo medio comprende al menos uno de los constituyentes presentes en el fluido intersticial.
4. El método de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde el tampón de deslipidación de la etapa (b) comprende de 20 unidades/l a 50 unidades/l de fosfolipasa A2 y desoxicolato sódico al 1 % en el primer medio.
5. El método de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde la concentración de sal del tampón de la etapa (c) es de 3,4 M de NaCl a 3,5 M de NaCl cuando se usa para la preparación de un andamio a partir de un hígado adulto y es de 4,0 M de NaCl a 4,5 M de NaCl cuando se usa para la preparación de un andamio a partir de un hígado fetal.
6. El método de conformidad con la reivindicación precedente 1, en donde el tampón de la etapa (c) comprende además un inhibidor de proteasa, opcionalmente en donde el inhibidor de proteasa es un inhibidor de tripsina de soja.
7. El método de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde el tampón de la etapa (d) comprende además un inhibidor de proteasa, opcionalmente en donde el inhibidor de proteasa es un inhibidor de tripsina de soja.
8. El método de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde todos los medios y tampones de las etapas (a) a la (e) están libres de una cantidad detectable de una enzima que degrade los componentes de la matriz extracelular.
9. El método de conformidad con cualquier reivindicación precedente que comprende además esterilizar el andamio de biomatriz, opcionalmente en donde la etapa de esterilización comprende irradiación gamma del andamio de biomatriz.
10. Un andamio de biomatriz producido mediante el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un método para producir un cultivo celular, que comprende:
 - a) producir un andamio de biomatriz de acuerdo con el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
 - b) poner en contacto el andamio de biomatriz de la etapa (a) con un medio de cultivo celular en un aparato de cultivo; y
 - c) sembrar el andamio de biomatriz de la etapa (b) con células, para producir de esta manera un cultivo celular.
12. El método de conformidad con la reivindicación 11 en donde la etapa (b) comprende congelar el andamio de biomatriz de la etapa, preparar una sección congelada del andamio de biomatriz como un sustrato de cultivo celular y poner en contacto el sustrato de cultivo celular con un medio de cultivo celular en un aparato de cultivo.

13. El método de conformidad con la reivindicación 11 en donde la etapa (b) comprende triturar la biomatriz hasta obtener un polvo, que opcionalmente se lleva a cabo en un molino con congelación a temperaturas del nitrógeno líquido o cercanas a estas, recubrir al menos una parte de un aparato de cultivo con el polvo para producir un sustrato de cultivo celular y poner en contacto el sustrato de cultivo celular con un medio de cultivo celular en el aparato de cultivo.

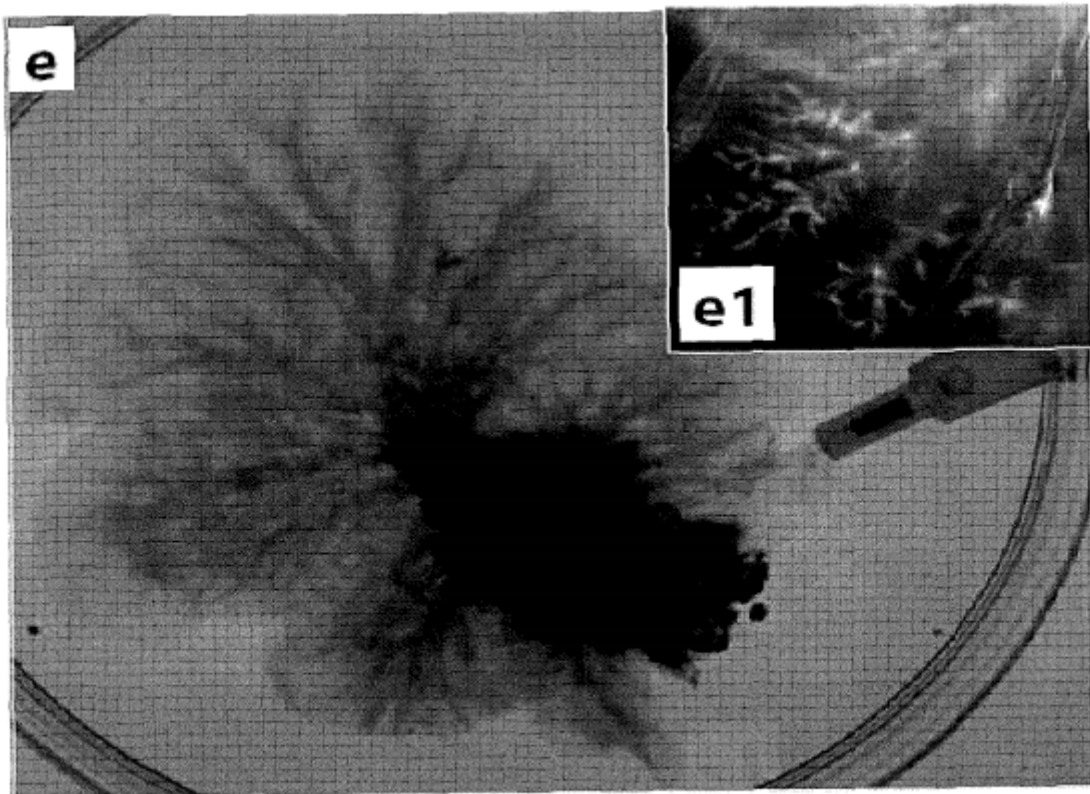
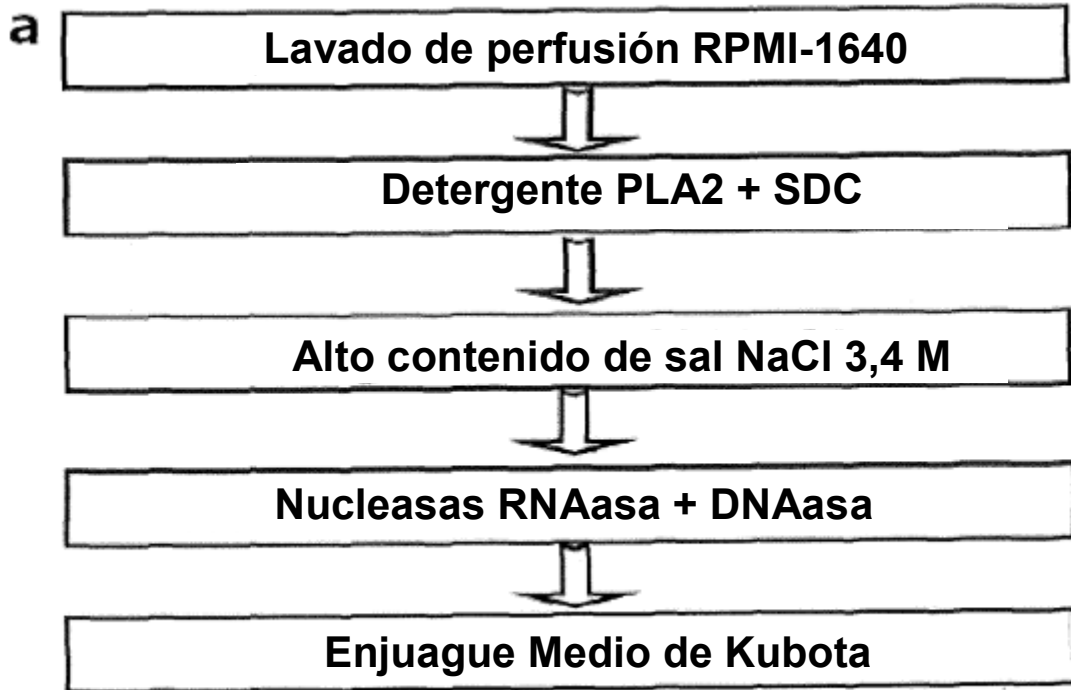


Figura 1

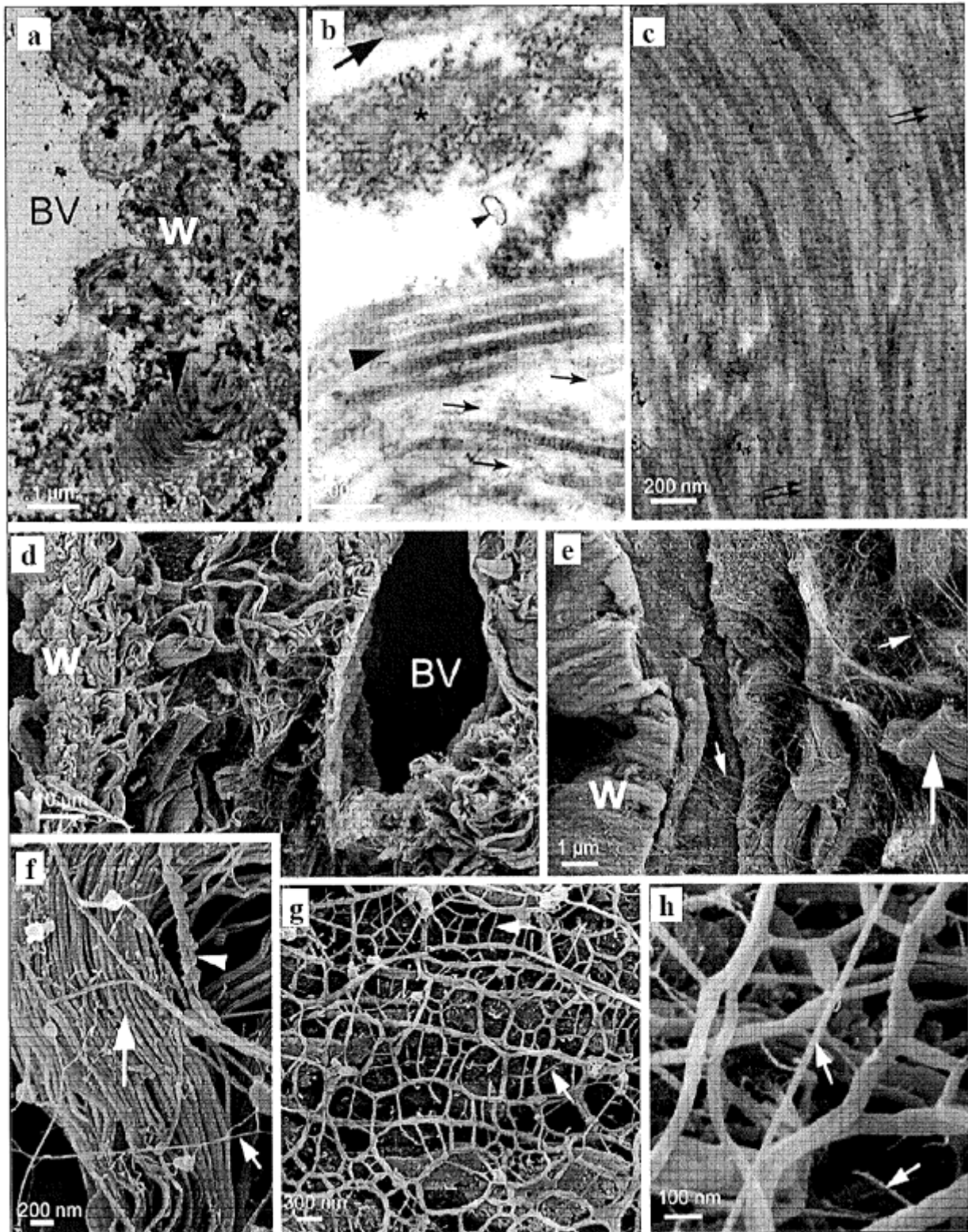


Figura 2

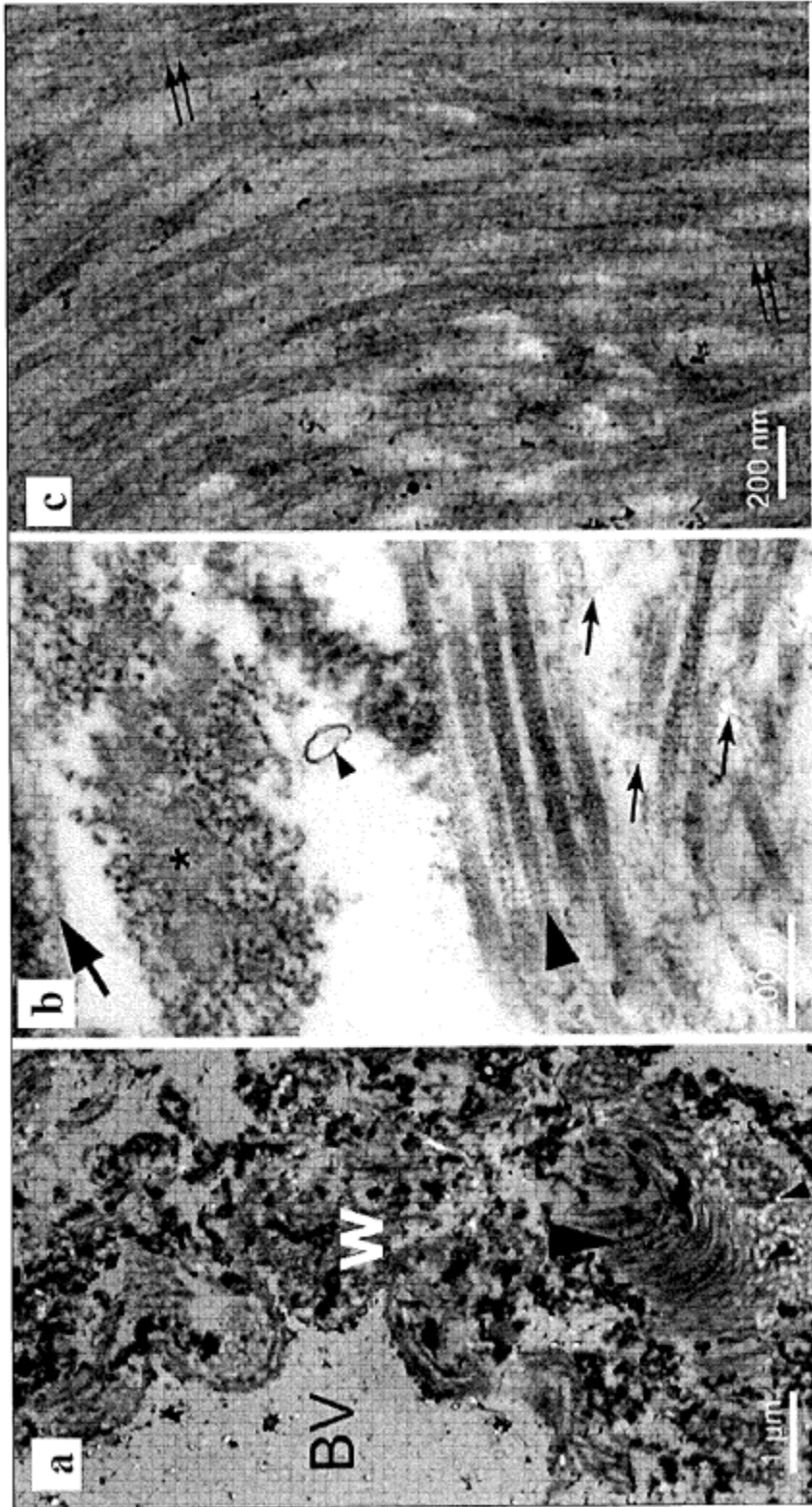


Figura 2

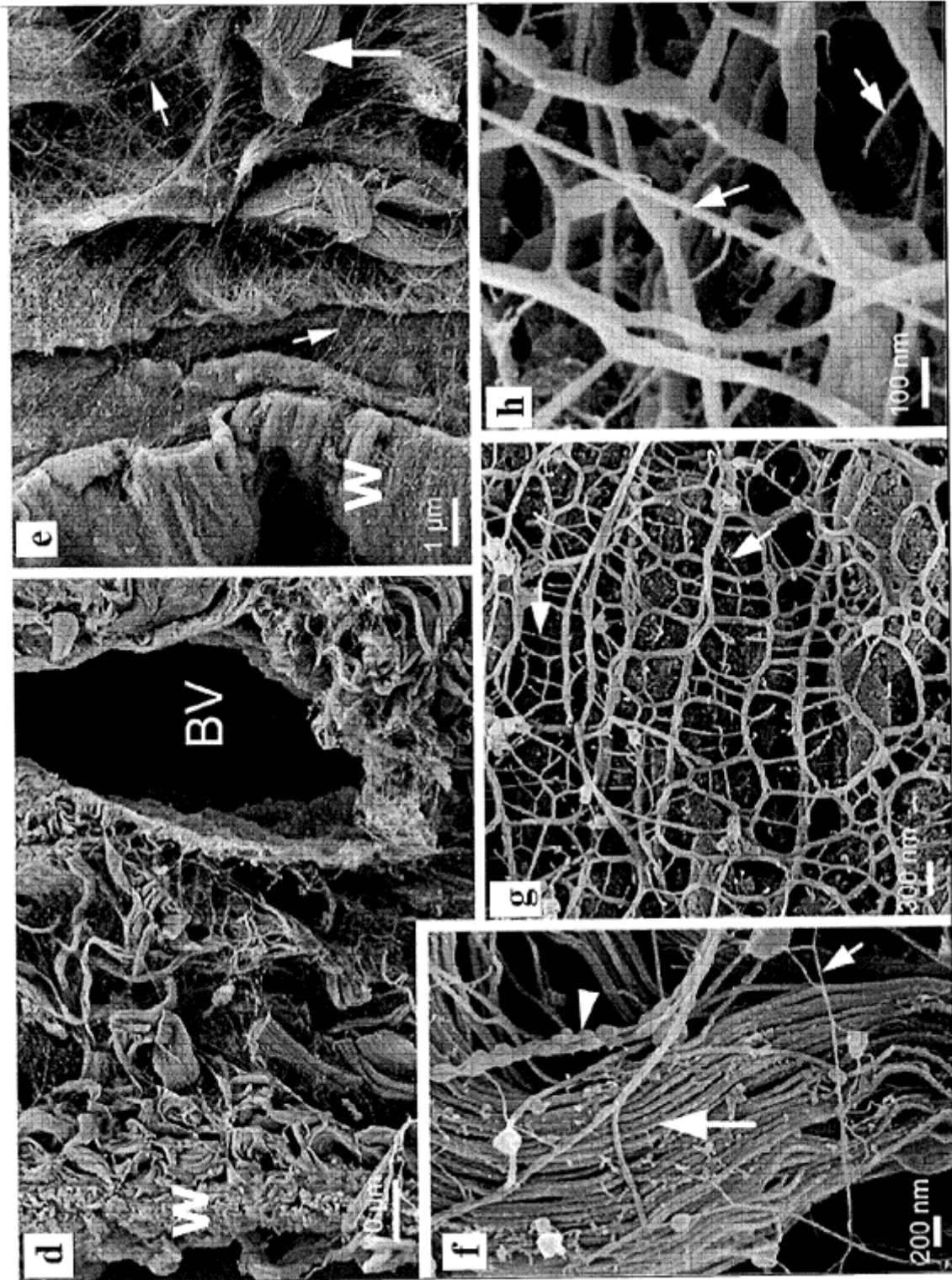


Figura 2 (continuación)

a

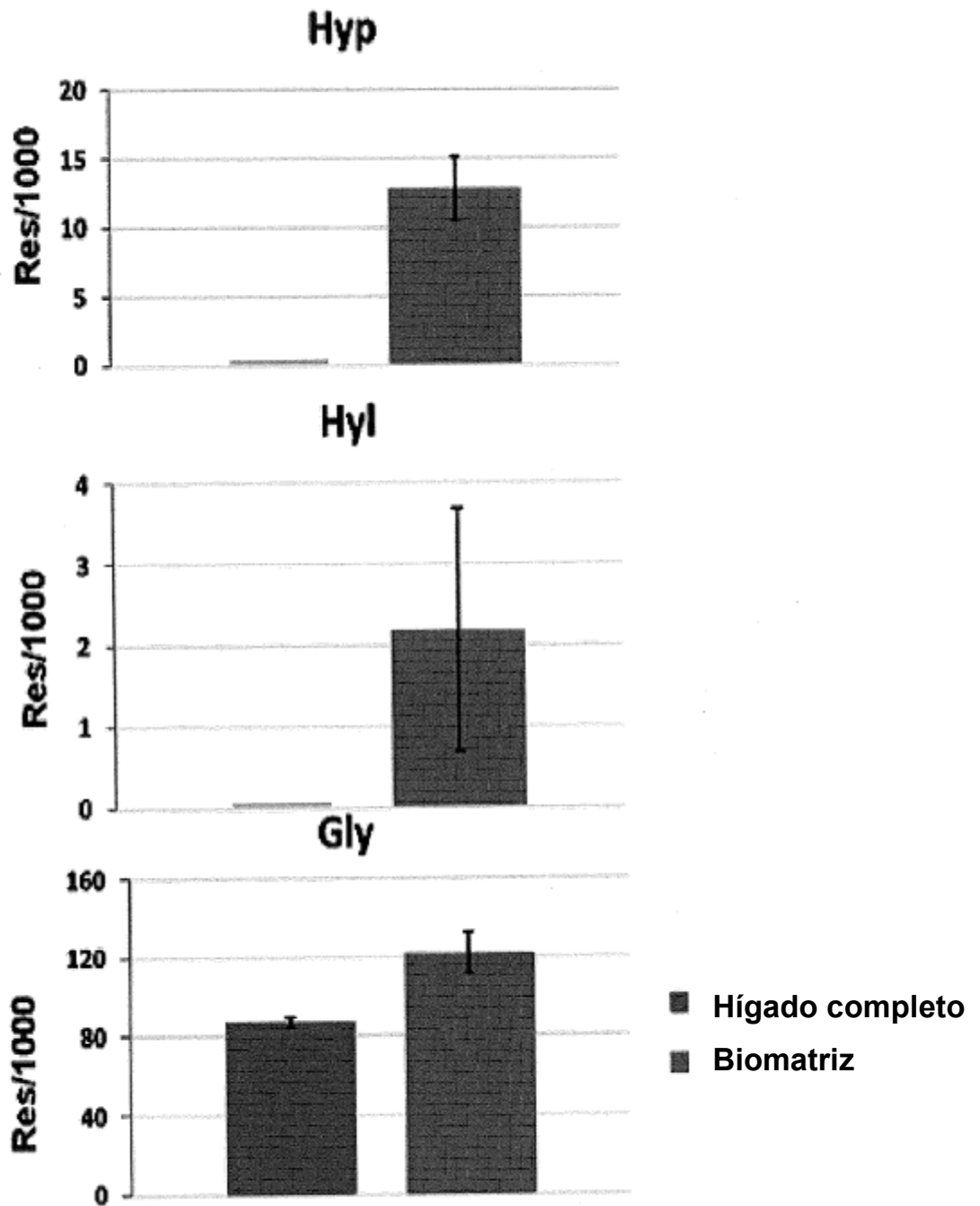


Figura 3

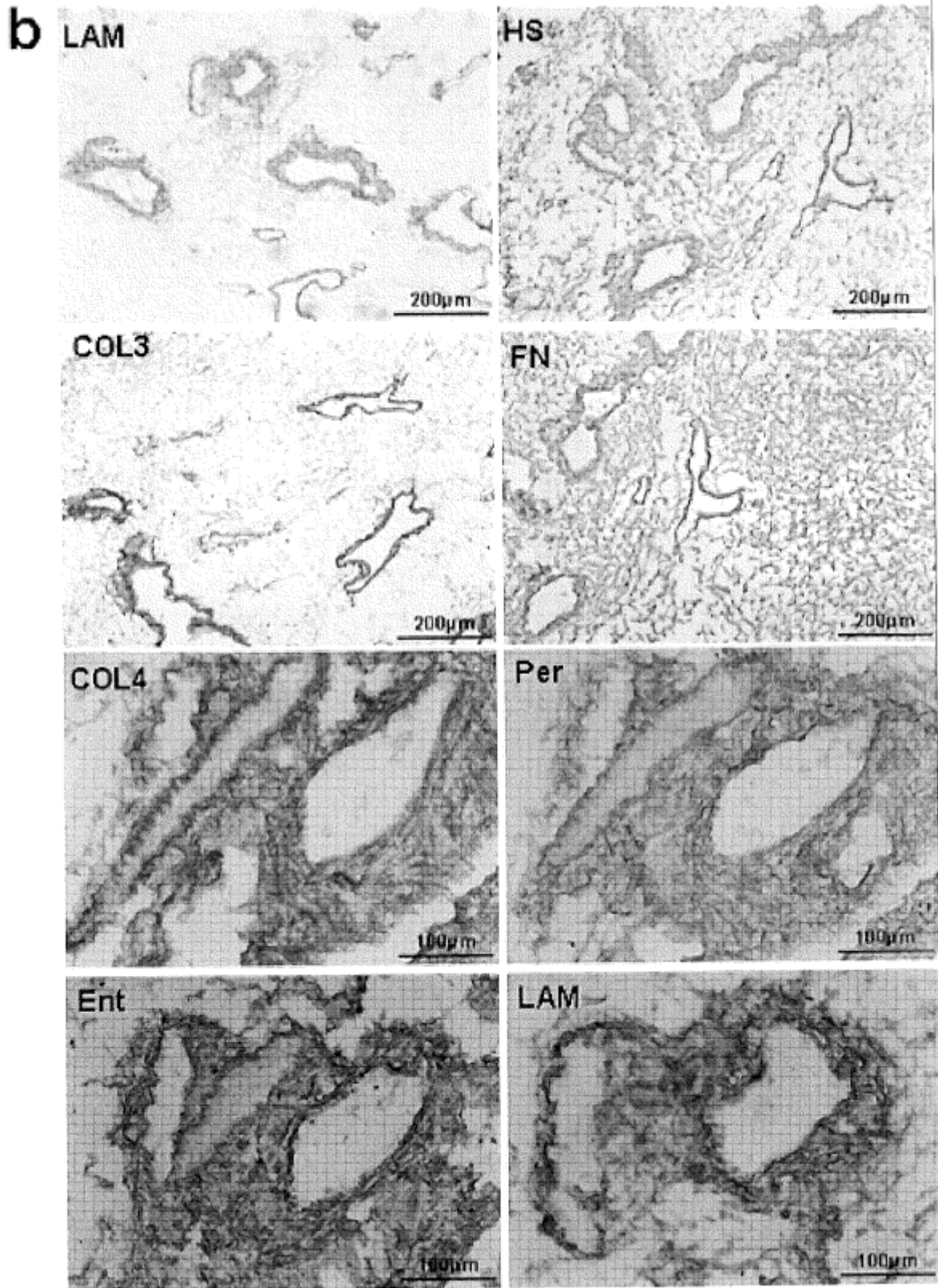


Figura 3 (continuación)

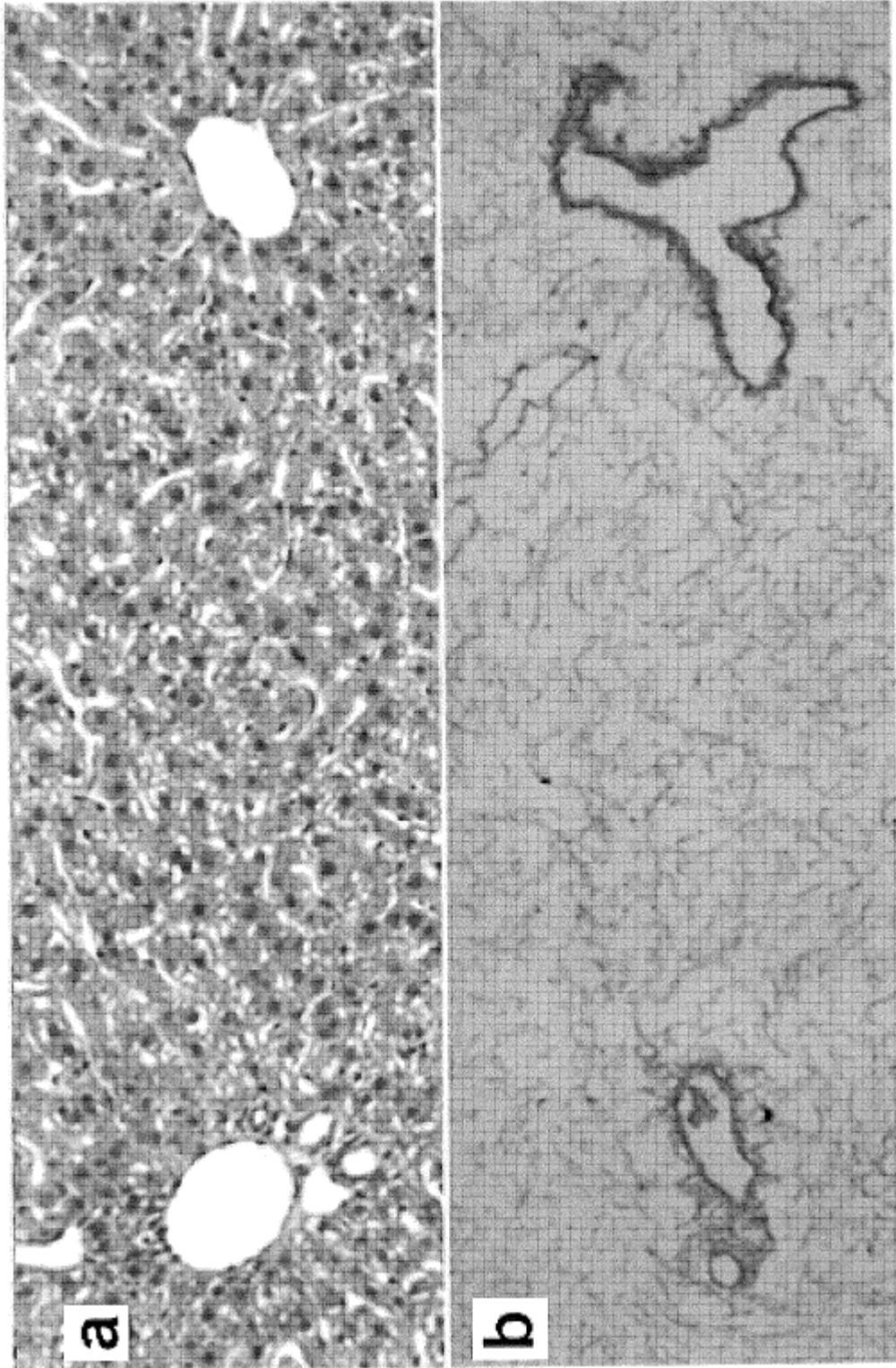


Figura 4

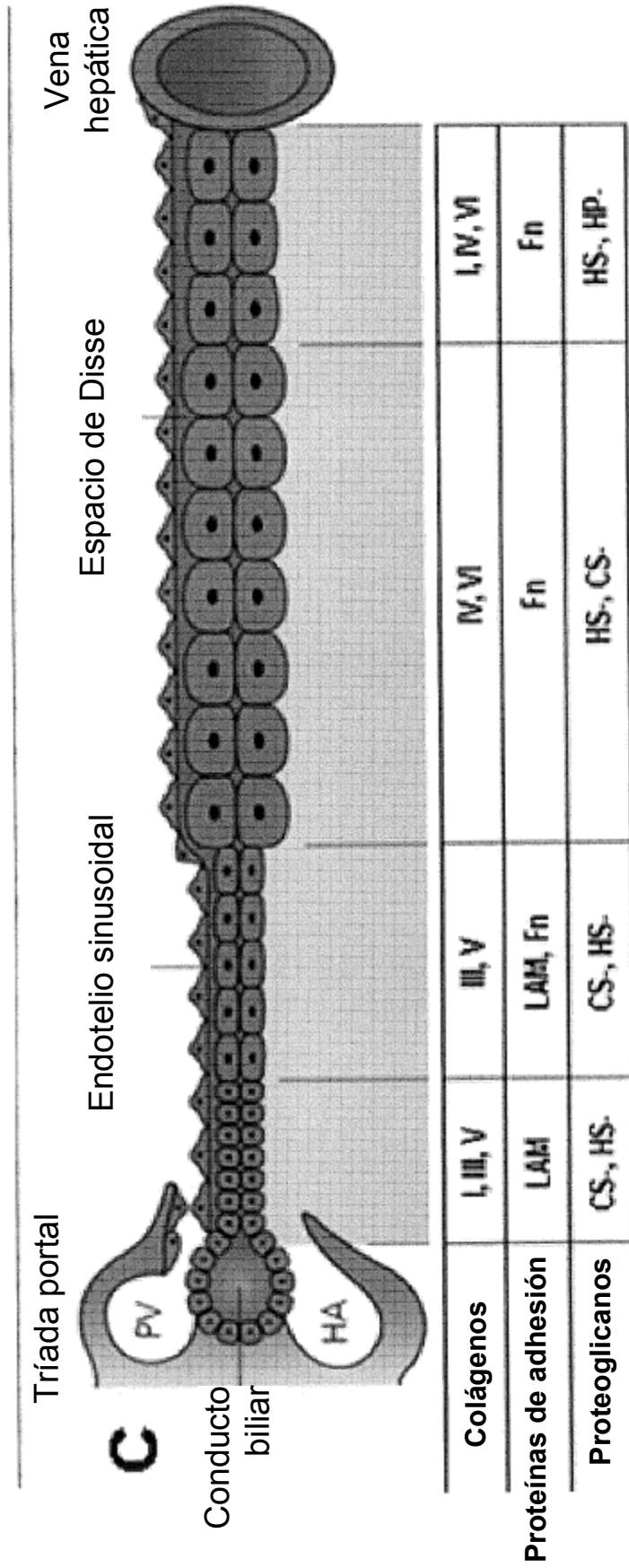


Figura 4 (continuación)

d		Componente de la matriz	Hígado (in vivo)	Andamios de biomatriz
Colágenos	Fibrilar	Tipo I	Cápsula de Glisson, triadas portales y puntos de los cordones hepáticos	Triadas portales y región acinar media
		Tipo III	Triadas portales, placas ductales, canales de Hering, red de reticulina de los sinusoides	Por todo el andamio, especialmente alrededor de las triadas portales y los restos de muralia de células parenquimatosas
		Tipo V	Alrededor de las triadas portales y puntos de los cordones hepáticos	Triadas portales y región acinar media
	Membrana basal	Tipo IV	Alrededor de las triadas portales y la vena central, entre el parénquima y el endotelio en los espacios de Disse	Triadas portales y alrededor de los restos de la vasculatura
		Tipo VI	Triadas portales y alrededor de la vasculatura	Triadas portales y alrededor de los restos de la vasculatura
Proteínas de adhesión	Membrana basal	Laminina	Triadas portales	Triadas portales
		Nidógeno	Alrededor de la vasculatura	Triadas portales y alrededor de los restos de la vasculatura
	otros	Fibronectina	A lo largo de las placas hepáticas como filamentos finos	A lo largo de los andamios de biomatriz; especialmente alrededor de los restos de muralia de las células parenquimatosas
		Elastina	Particularmente evidente alrededor de la vasculatura y la cápsula de Glisson	Ondas de elastina cerca de restos de vasos sanguíneos
		Vimentina	Particularmente evidente alrededor de la vasculatura	A lo largo de los andamios de biomatriz; especialmente alrededor de los restos de vasculatura
Proteoglicanos	Hialuronano	Alrededor de la tríada portal y áreas adyacentes	—	
	CS-PG	Predominantemente periportal	Predominantemente periportal	
	HS-PG (glicanos, sindecanos)	Distribución radial rodeando la vena porta y a lo largo de las vasculaturas sinusoidales. No se encontró en las triadas portales.	A lo largo de la matriz alrededor de la vasculatura	
	HS-PG (Perlecano)	Más evidente alrededor de las triadas portales (especialmente fuera de los sinusoides)	Predominantemente alrededor de las triadas periportales	
	HP-PG	Predominantemente alrededor de las venas centrales	n.d.	

Figura 4 (continuación)

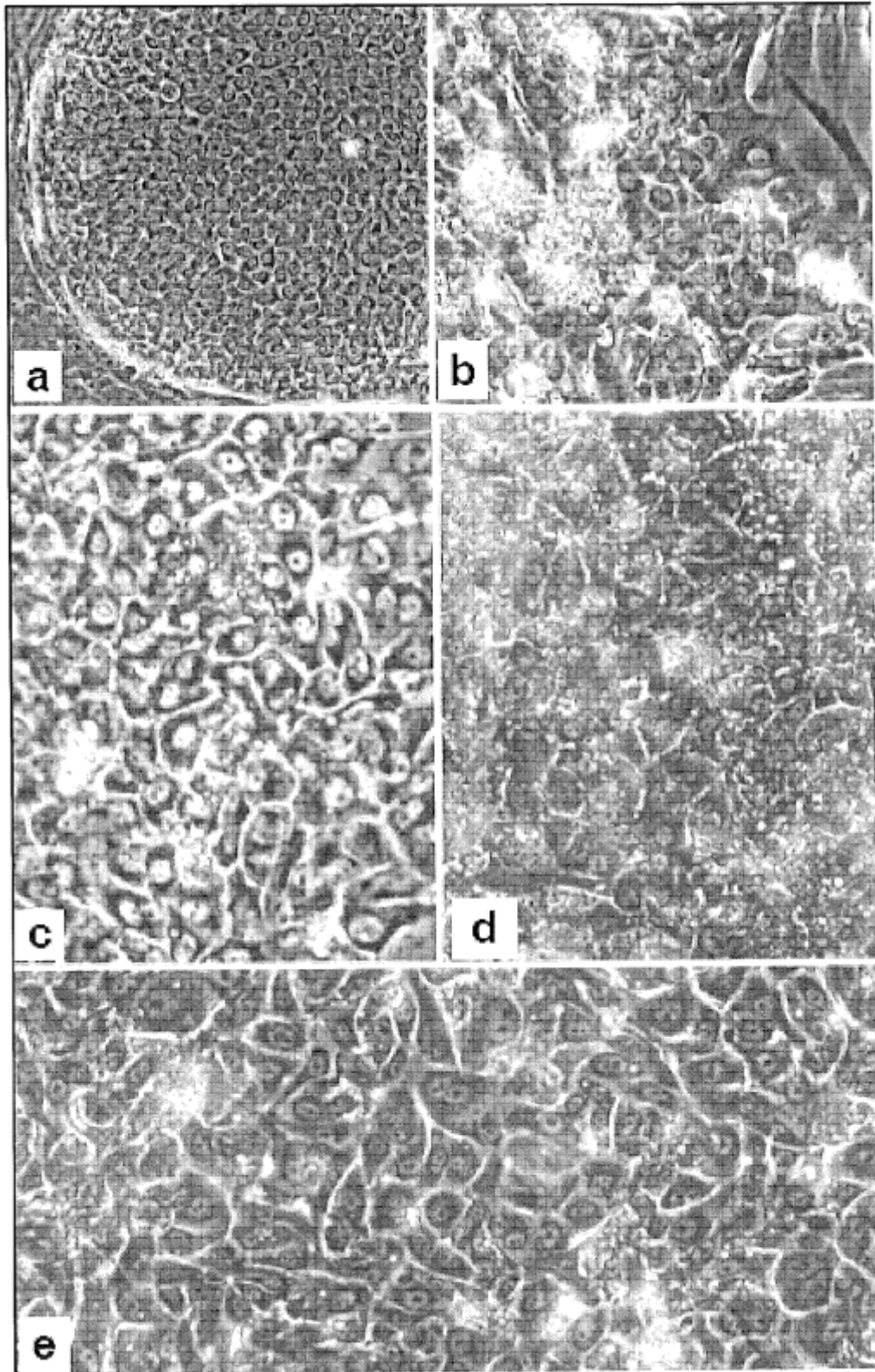


Figura 5

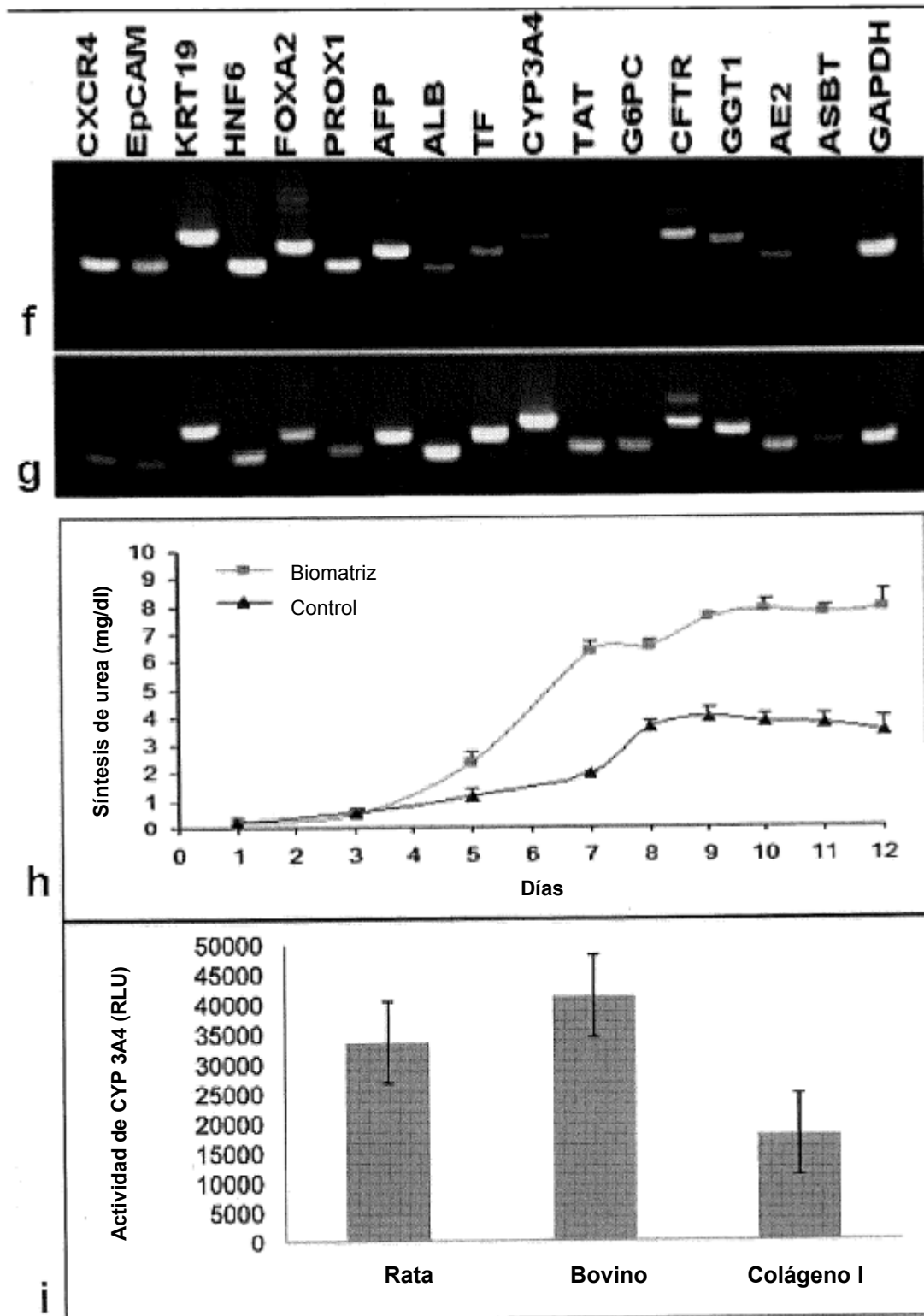


Figura 5 (continuación)

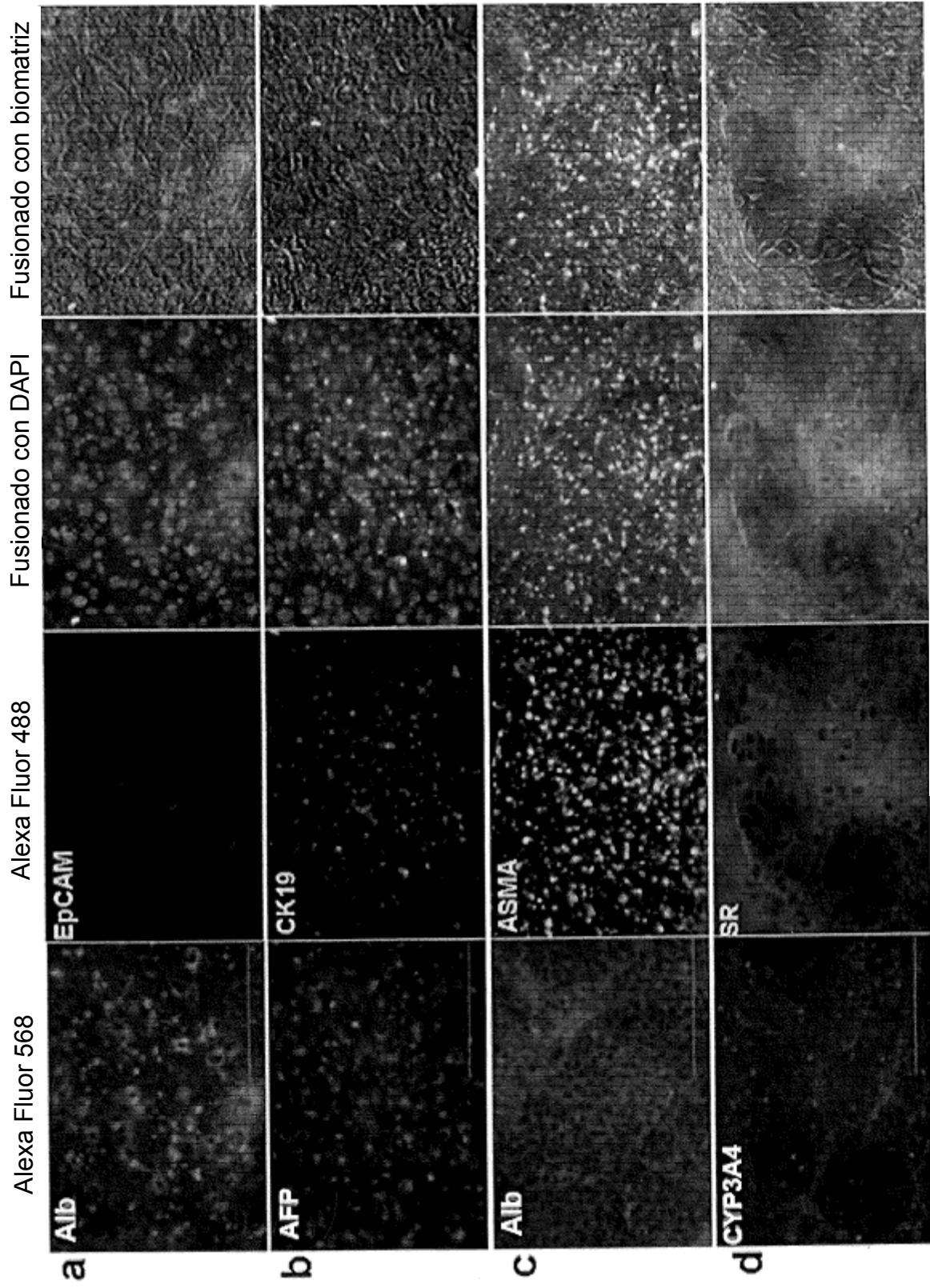


Figura 6

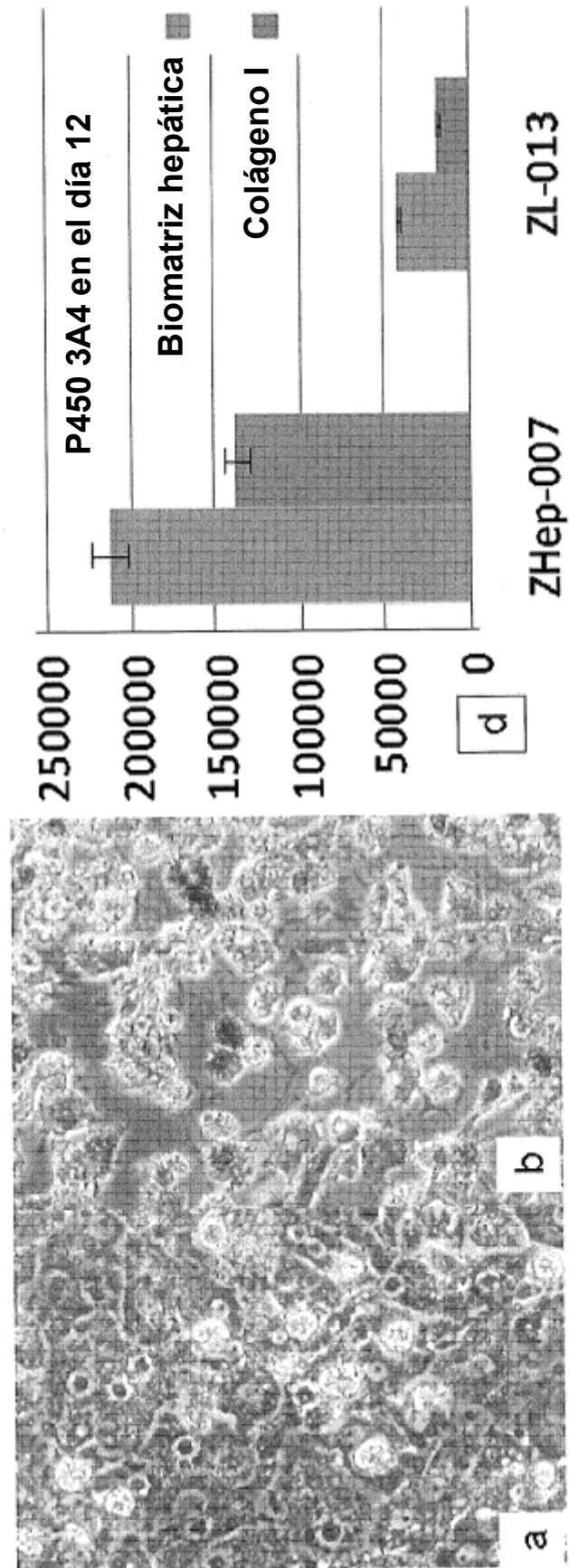


Figura 7

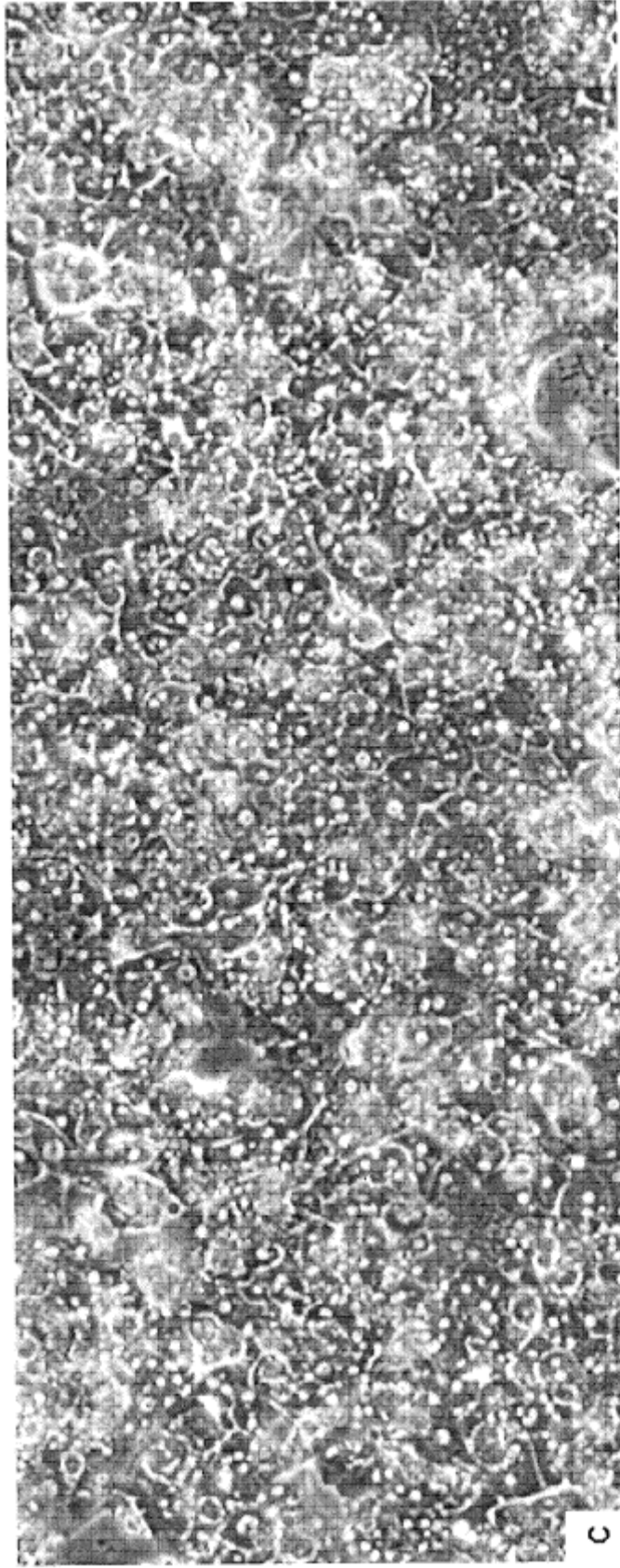


Figura 7 (continuación)

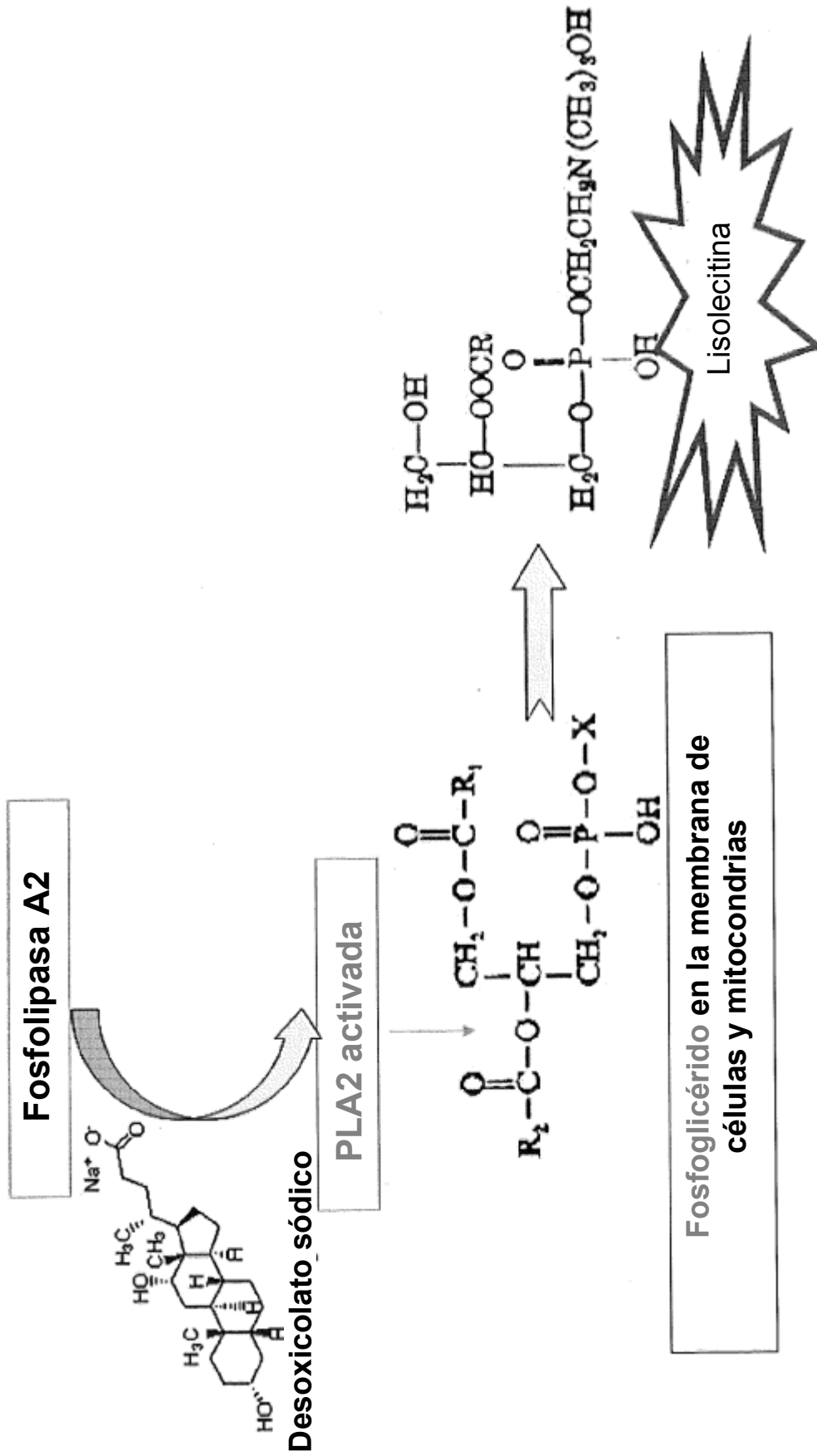


Figura 8

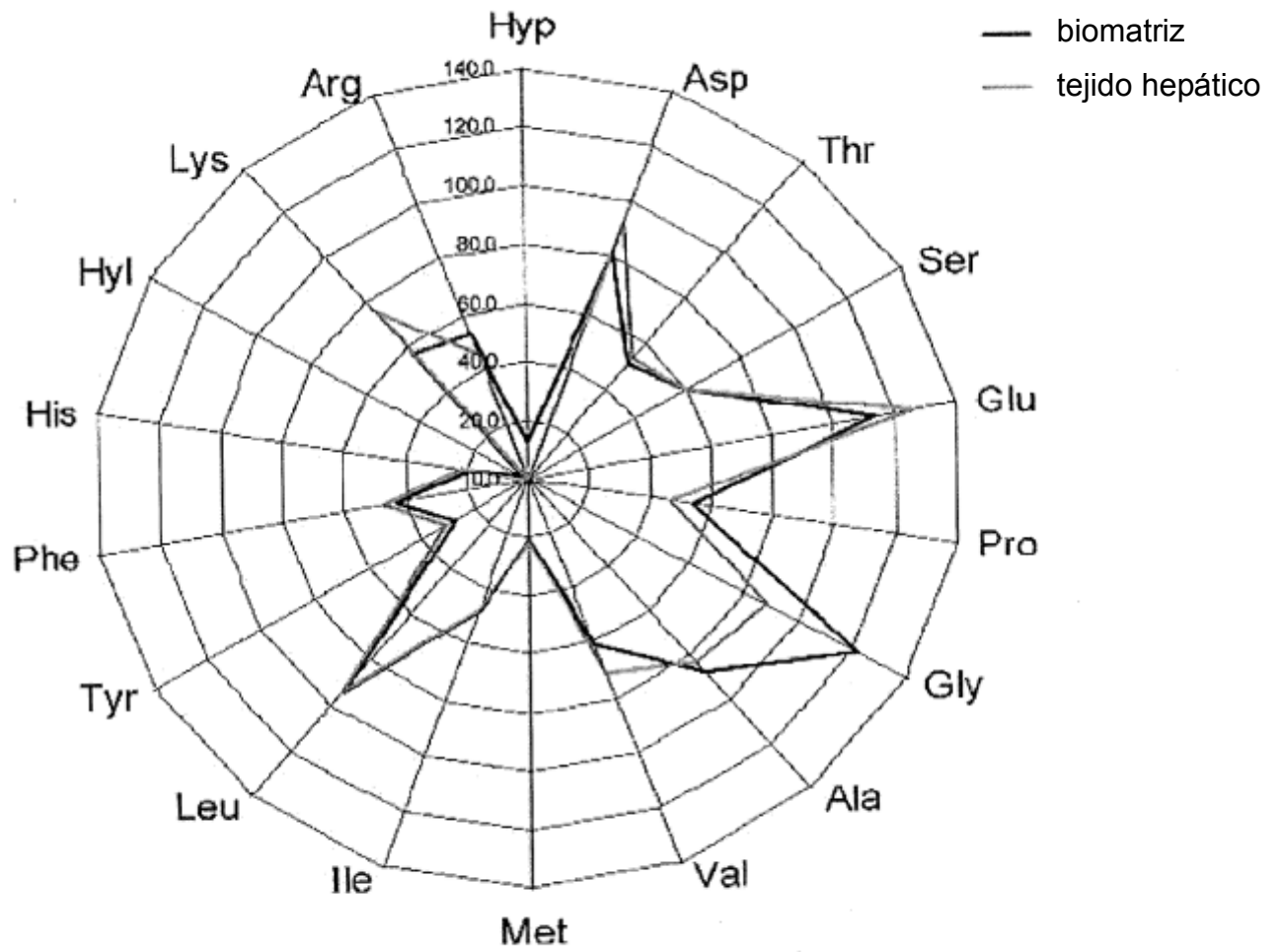
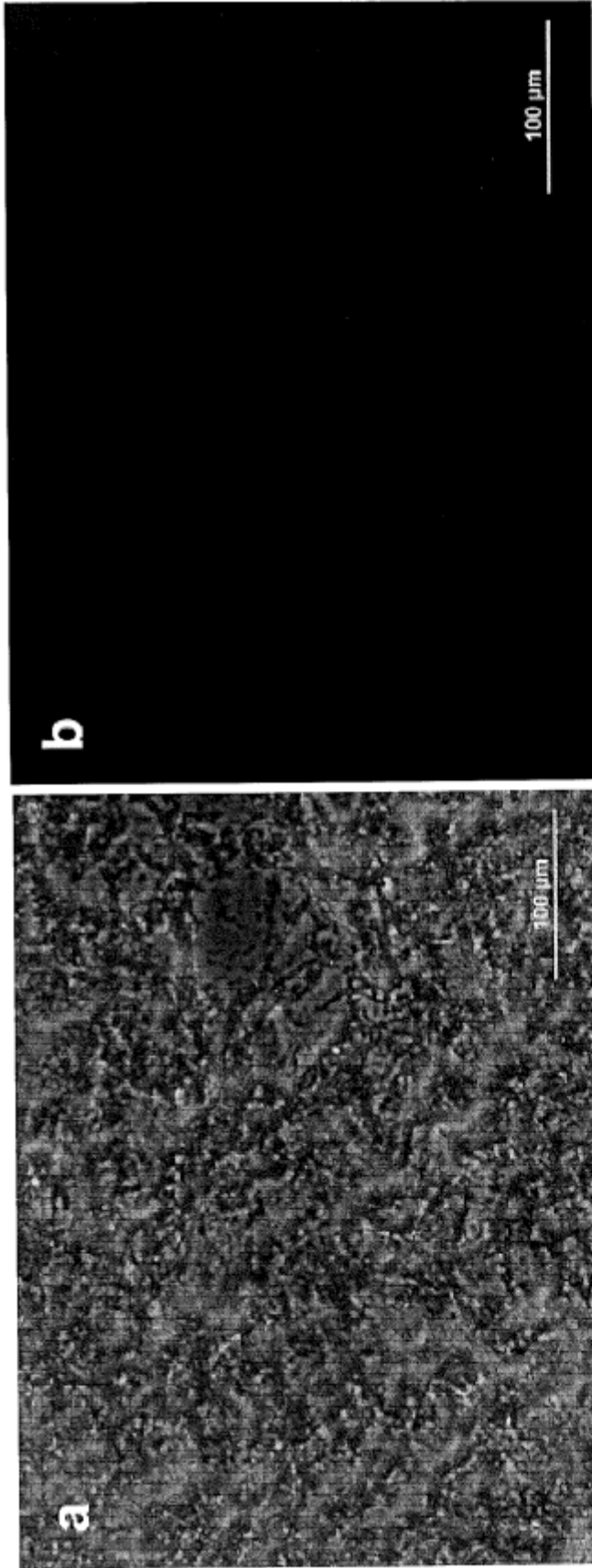
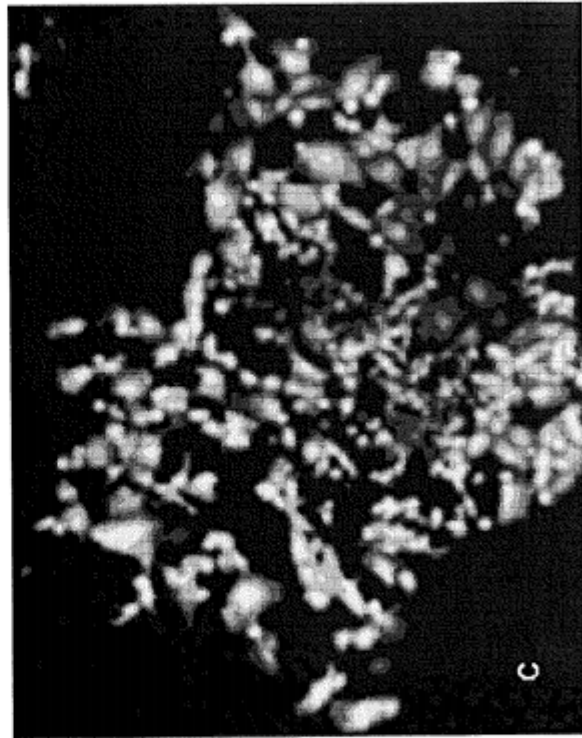
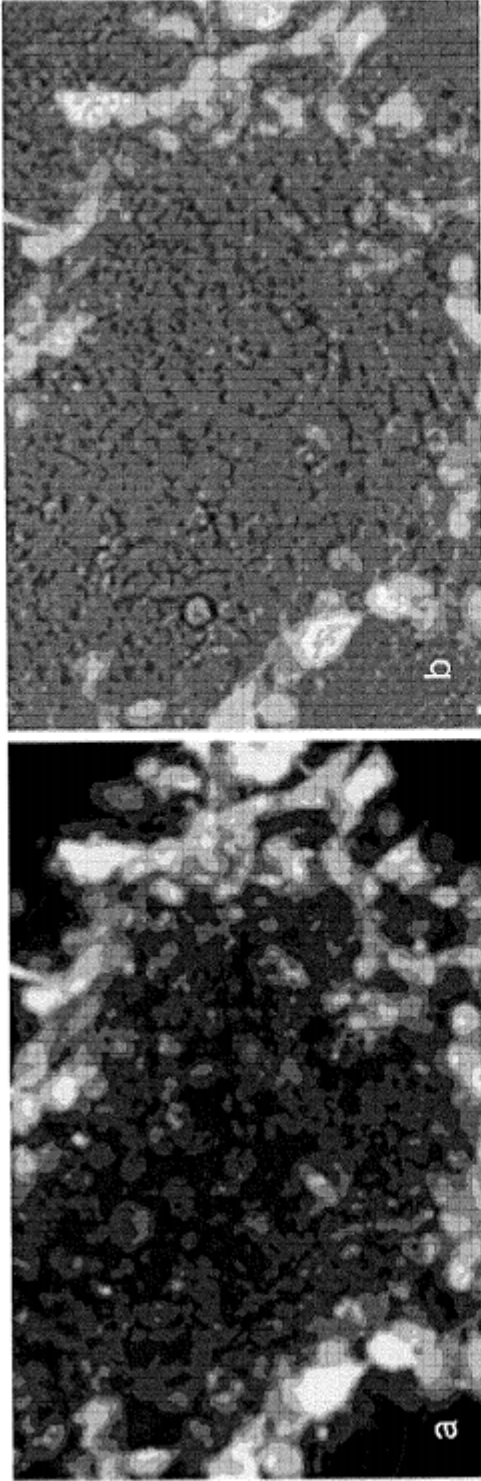


Figura 9



	Hígado fresco (n = 6)	Biomatriz (n = 5)	Valor de p	Relación
ADN (µg/g de peso húmedo)	585,82 ± 4,78	17,85 ± 0,96	< 0,001	3,05 %
ARN (mg/g de peso húmedo)	5,38 ± 1,02	No detectado	N/A	N/A

Figura 10



Calceína AM
Etd-Br

Figura 11

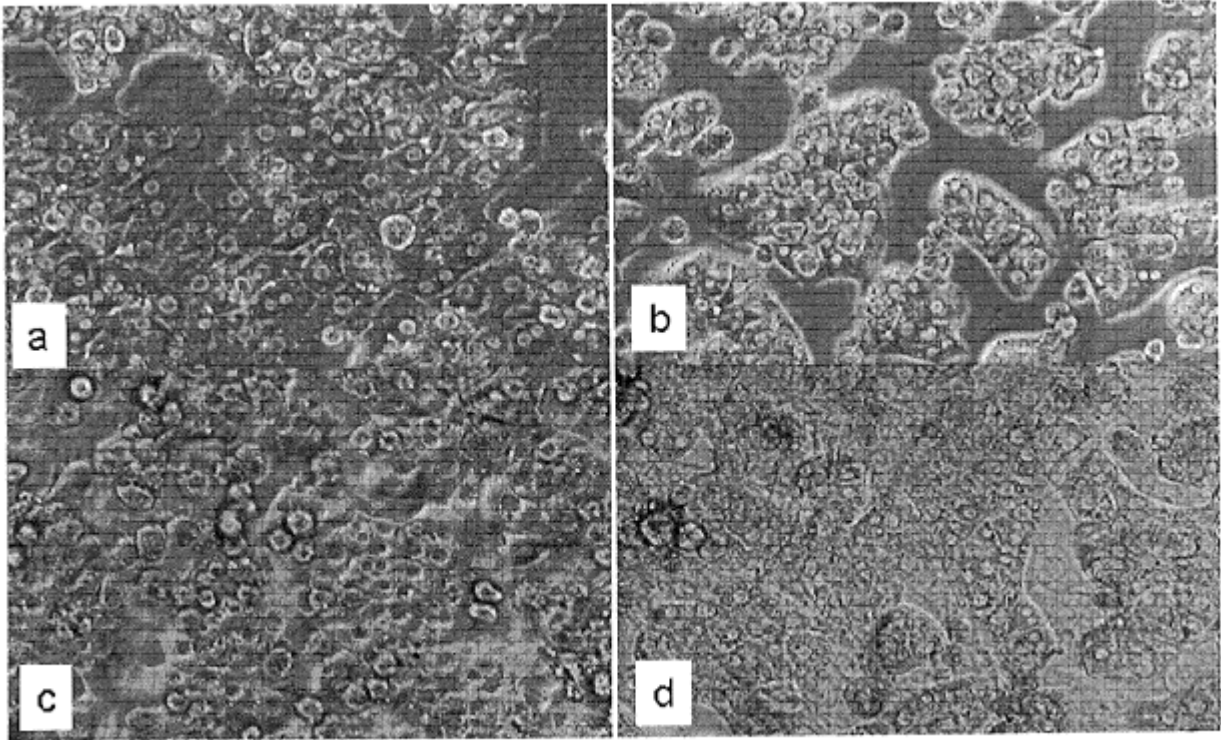


Figura 12

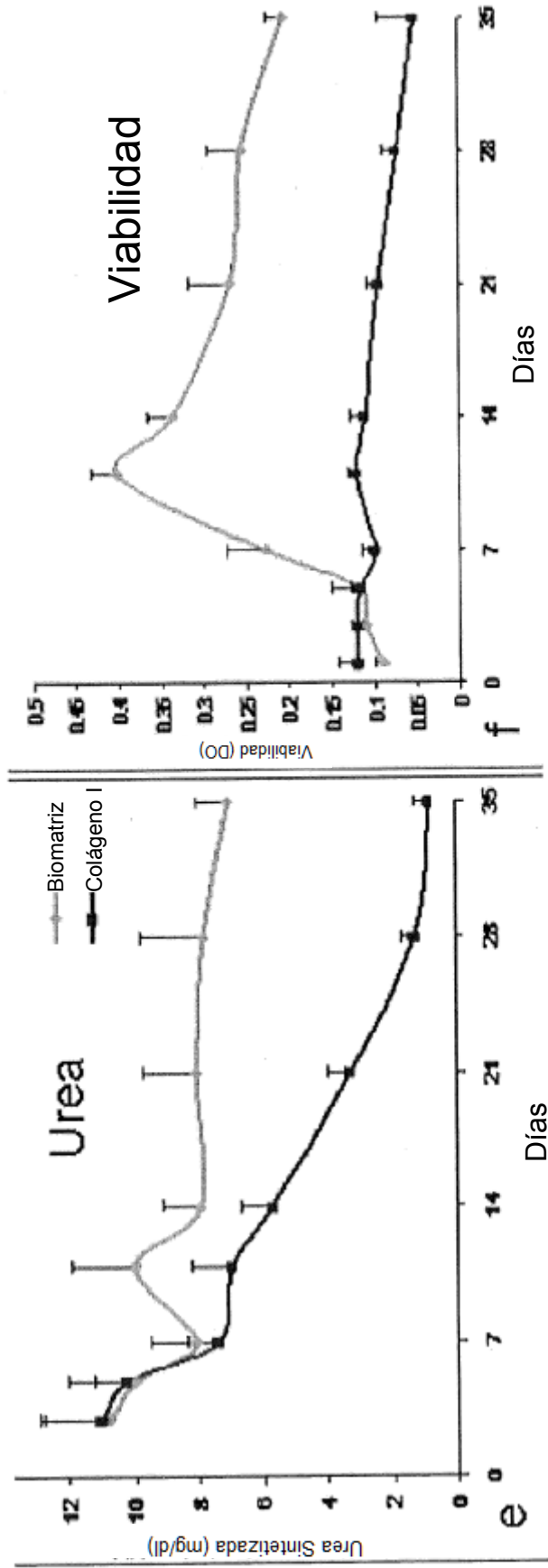


Figura 12 (continuación)

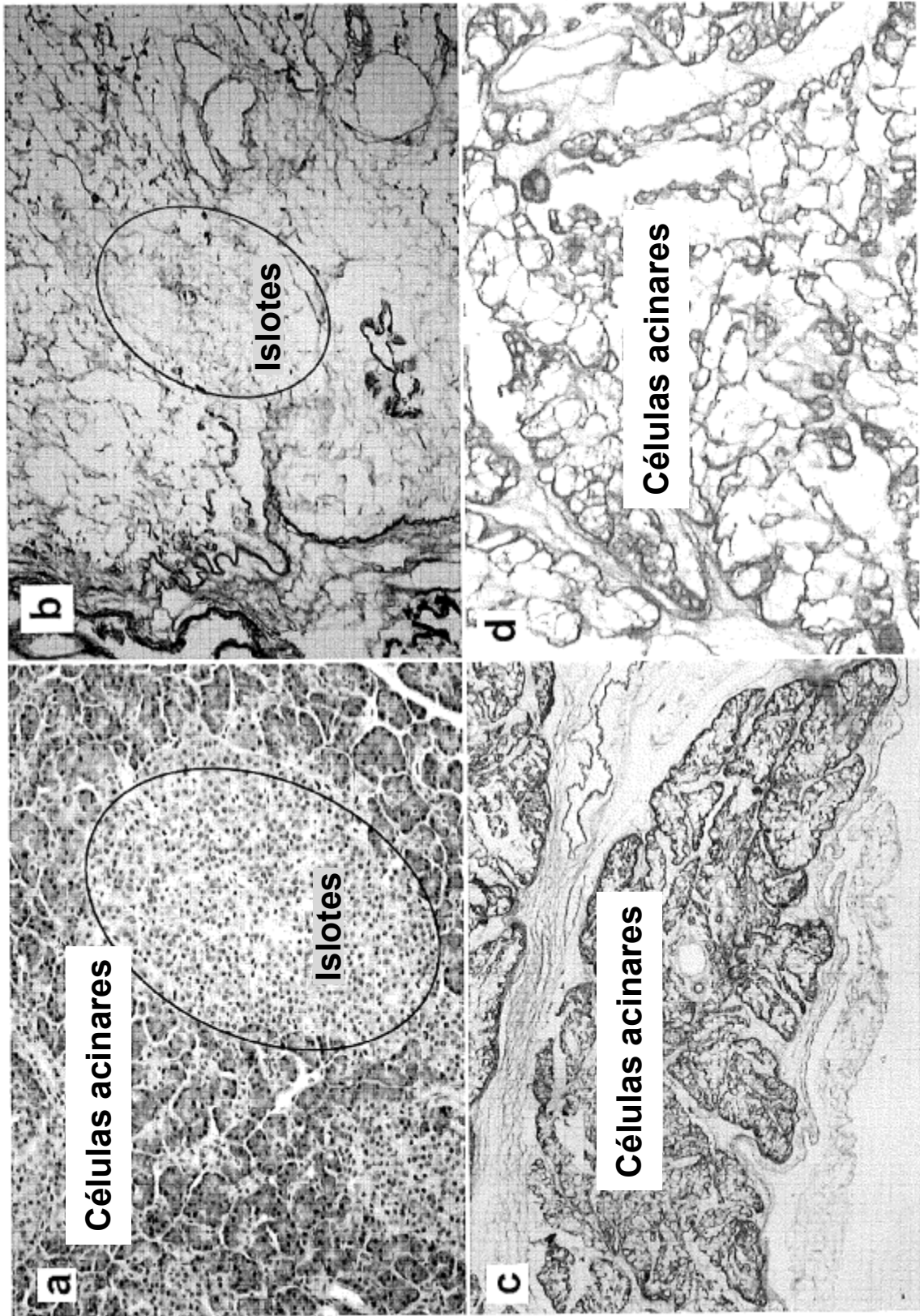


Figura 13

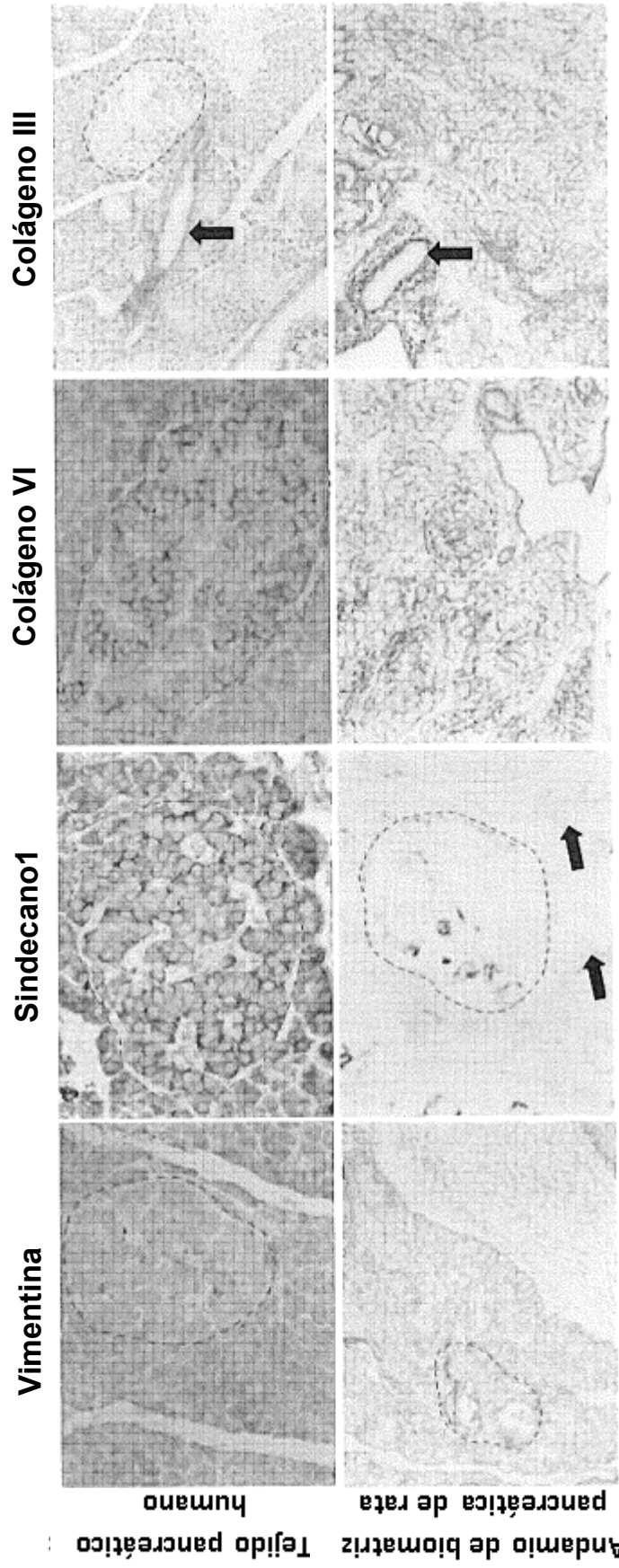


Figura 14

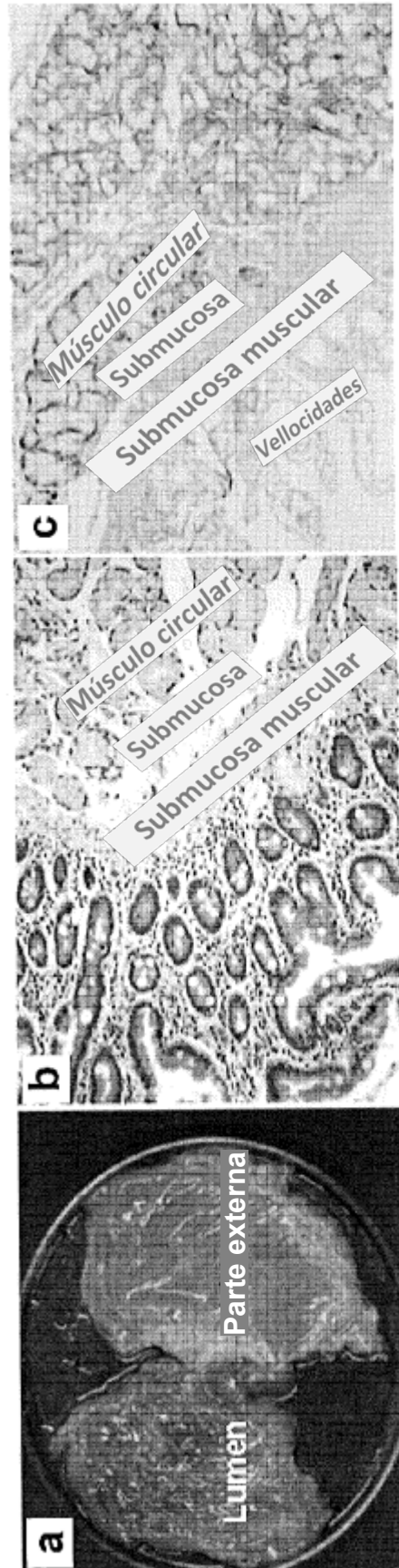


Figura 15

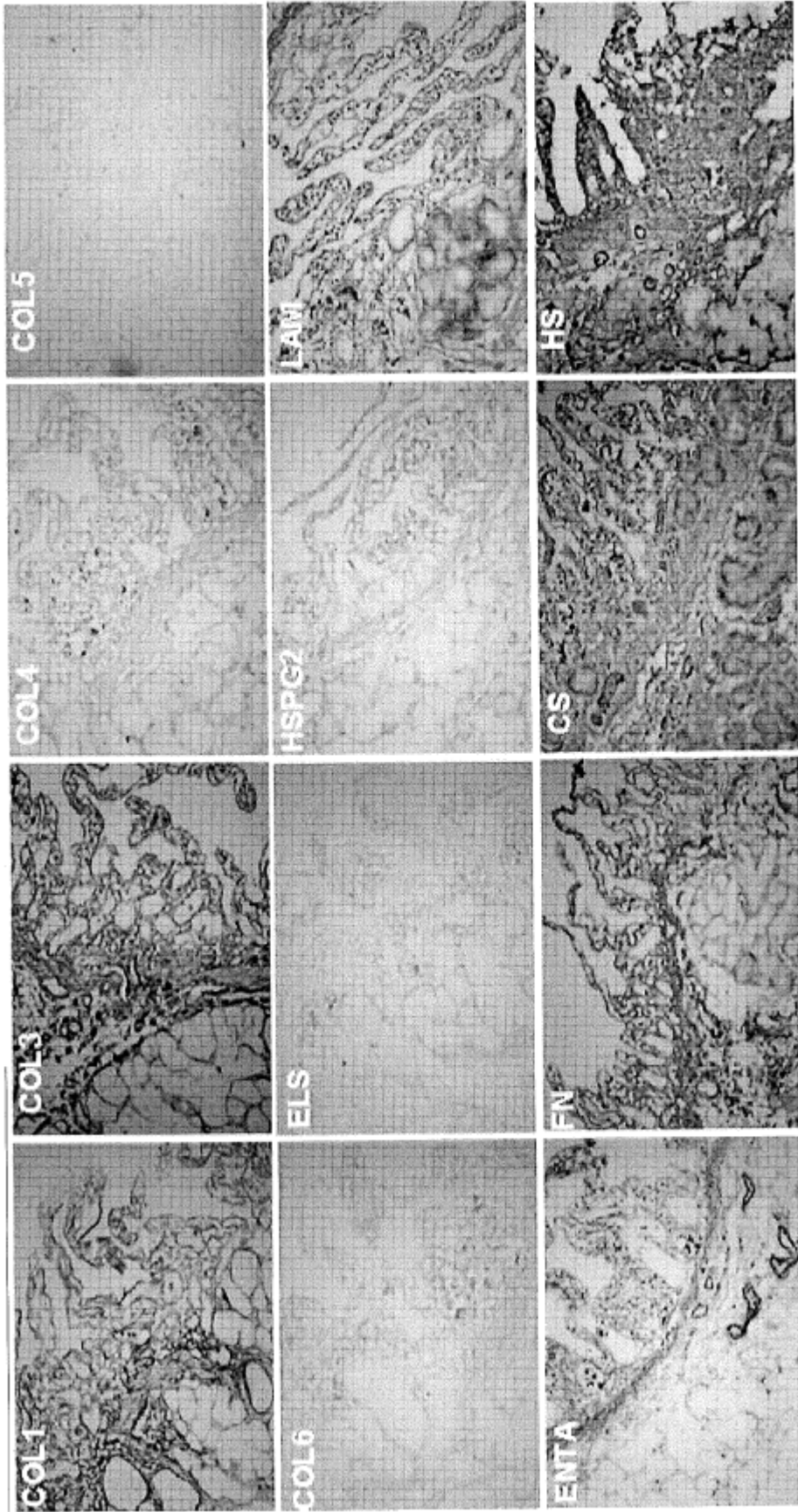
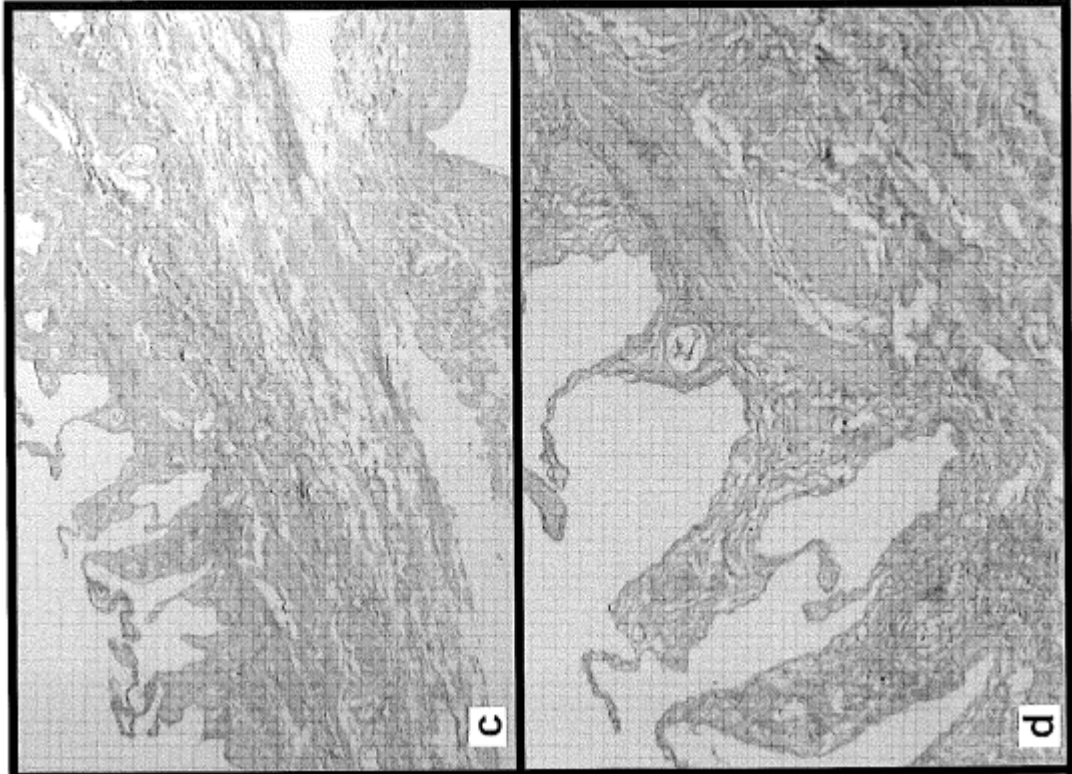


Figura 15 (continuación)

Biomatriz de vesícula biliar humana



Tejido de vesícula biliar humana

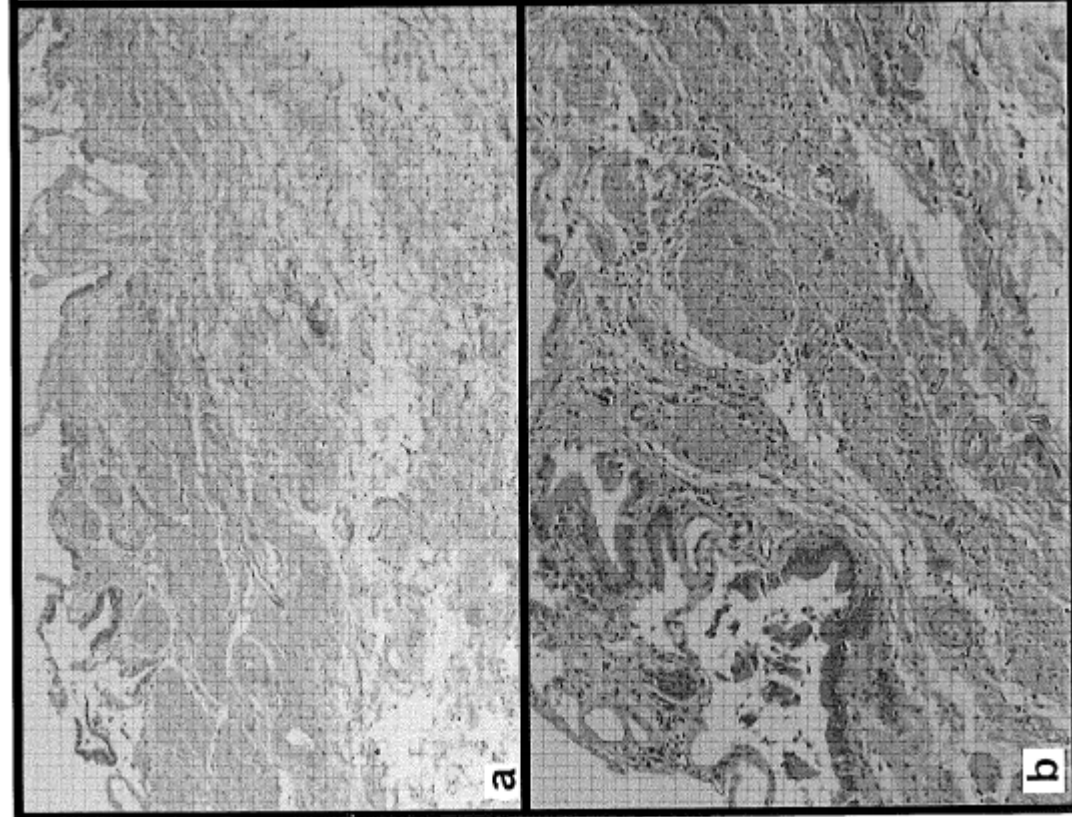


Figura 16

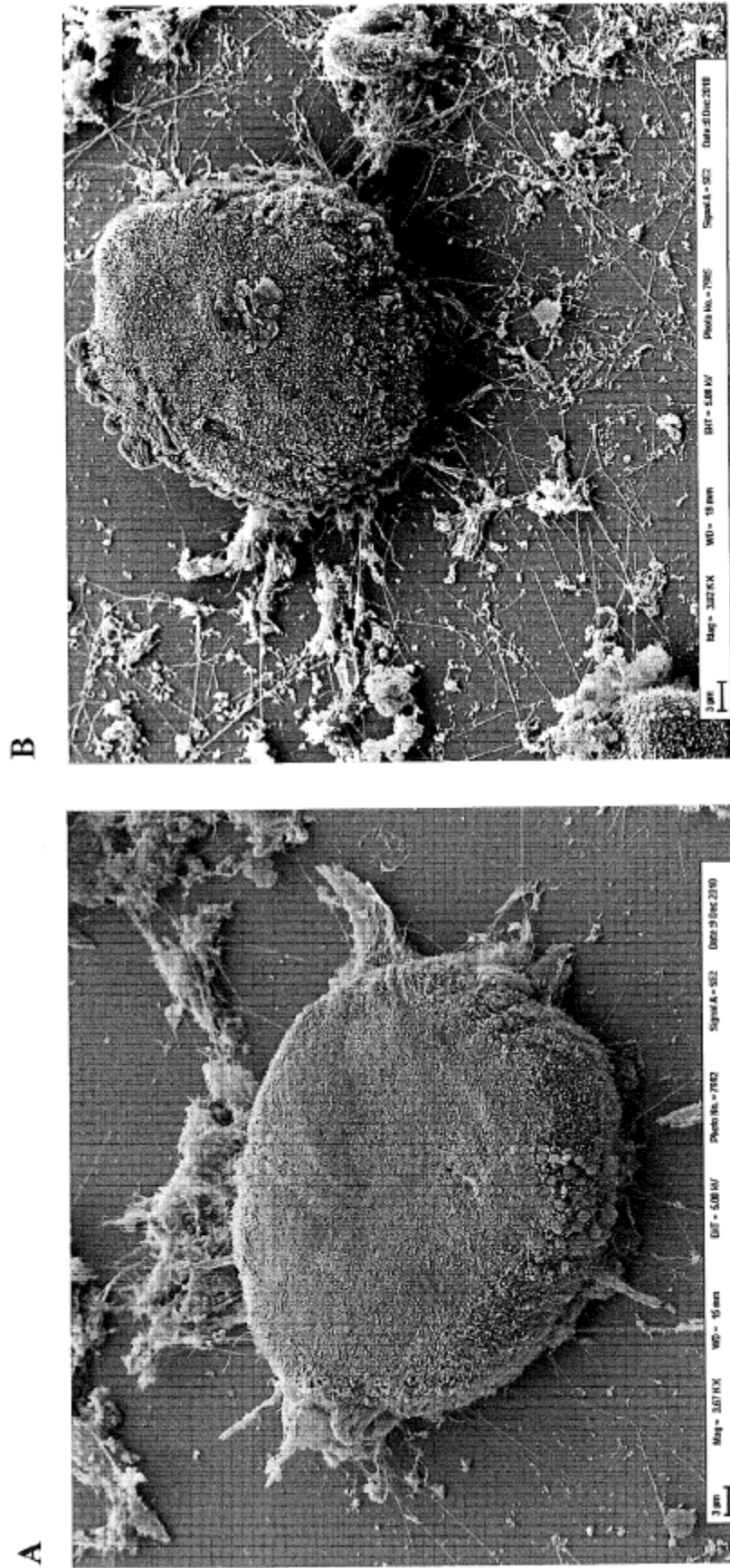


Figura 17