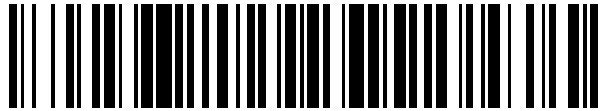


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 450**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2011 PCT/US2011/001163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12005760**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011 E 11803935 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2588592**

54 Título: **Uso de órganos descelularizados por perfusión para recelularización adaptada**

30 Prioridad:

30.06.2010 US 360196 P

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

18.01.2018

73 Titular/es:

**MIROMATRIX MEDICAL INC. (100.0%)
18683 Bearpath Trail
Eden Prairie, Minnesota 55347, US**

72 Inventor/es:

ROSS, JEFFREY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 650 450 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

Uso de órganos descelularizados por perfusión para recelularización adaptada

Antecedentes

5 La ingeniería de tejidos es un campo de rápido crecimiento que busca reparar o regenerar tejidos u órganos dañados o enfermos a través del implante de combinaciones de células, armazones y mediadores solubles. La diferenciación de células madre y el cultivo de células primarias actuales se logran generalmente en condiciones de cultivo bidimensional (2D). Este sistema permite la expansión de poblaciones celulares específicas pero es limitado en su capacidad de conservar los fenotipos celulares funcionales, para sustentar un cultivo celular de alta densidad y la función celular primaria o diferenciada prolongada. Por ejemplo, a diferencia de la limitada disponibilidad de las grandes cantidades de células primarias necesarias para determinadas terapias celulares, la cantidad de células madre puede expandirse enormemente mientras se conserva la capacidad de diferenciarse en estirpes específicas. El control del destino de las células madre (por ejemplo, diferenciación) ya sea *in vivo* o *in vitro* se ha atribuido principalmente a mediadores genéticos y moleculares (por ejemplo, factores de crecimiento y factores de transcripción). Aunque la diferenciación de las células madre y progenitoras puede dar como resultado células con una expresión génica específica de estirpe o de tejido, las células diferenciadas pueden carecer de las propiedades funcionales necesarias para las aplicaciones *in vitro* o *in vivo*.

Sumario de la invención

20 La invención proporciona una matriz extracelular (MEC) obtenida de órganos o tejidos descelularizados por perfusión y sistemas útiles para sustentar la diferenciación celular específica de órganos o tejidos o la maduración de células madre o progenitoras, o al mantenimiento de células diferenciadas o primarias, o cualquier combinación de los mismos, en las matrices. Las células primarias son células obtenidas de un organismo, que generalmente se cultivan después *in vitro*, aunque las células no proliferan de forma indefinida. Las células diferenciadas incluyen células primarias y células que se han diferenciado *in vitro*, por ejemplo, células madre o células progenitoras en una matriz descelularizada por perfusión de la invención. En una realización, al menos el 5%, 10% o 20%, o más, de las células diferenciadas tienen un fenotipo funcionalmente maduro. Un tejido es un grupo de células con una estructura y función comunes, por ejemplo, tejido epitelial, tejido conectivo, tejido muscular (músculo esquelético, cardíaco o liso) y tejido nervioso, e incluye una capa flexible que cubre o recubre, o conecta órganos. Un órgano es una colección de tejidos (dos o más) unidos en una unidad estructural para cumplir a una función común. Los órganos incluyen, pero sin limitación, el cerebro, hígado, páncreas, corazón, estómago, riñón, pulmones, músculos enteros, timo, ano e intestino. Como se usa en el presente documento, un órgano incluye órganos enteros perfundibles, o partes de un órgano, o estructuras vascularizadas del mismo, y un tejido incluye cualquiera de las estructuras que contienen tejidos vascularizados, por ejemplo, una tráquea.

35 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un armazón de MEC específico de órgano o tejido 3D, por ejemplo, para la diferenciación o maduración adaptada específica de órgano o de tejido, o el mantenimiento, de tipos celulares incluyendo células madre o progenitoras, o células diferenciadas o primarias. La diferenciación es un proceso mediante el que las células adquieren un nuevo fenotipo que es distinto del de la población celular original, por ejemplo, expresión y/o función (o funciones) génicas y/o de proteínas celulares distintas. La maduración clarifica más el fenotipo de la población celular, como tener la capacidad funcional normal madura de una célula en una población celular *in vivo*. En una realización, el armazón es una capa de MEC descelularizada por perfusión, por ejemplo, una porción de una MEC de un órgano. En otra realización, el armazón es un órgano de MEC descelularizada por perfusión. Tales armazones pueden emplearse como sistemas de cultivo *in vitro* 3D útiles, por ejemplo, para proporcionar sustratos para biorreactores, en análisis de fármacos u órganos o tejidos diseñados técnicamente, o células para terapia.

45 La MEC descelularizada por perfusión a partir de órganos o tejidos conserva más de la microestructura nativa, incluyendo un sistema vascular y/o microvascular intacto, en comparación con otras técnicas de descelularización tal como la descelularización basada en inmersión. Por ejemplo, la MEC descelularizada por perfusión de órganos o tejidos preserva el contenido en colágeno y otros factores de unión y señalización, y la estructura vascular, proporcionando así un entorno nicho con señales nativas para la diferenciación funcional o el mantenimiento de la función celular de las células introducidas. En una realización, la MEC descelularizada por perfusión a partir de órganos o tejidos se perfunde con células y/o medios que utilizan la vasculatura de la MEC descelularizada por perfusión en condiciones apropiadas, incluyendo una presión y flujo apropiados, para imitar las condiciones encontradas normalmente en el organismo. Las presiones normales de órganos de tamaño humano están entre aproximadamente 40 a aproximadamente 200 mm de Hg con el caudal resultante dependiendo del diámetro del vaso de perfusión entrante. Para un corazón humano normal el flujo de perfusión resultante es de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 ml/min/100 g. Utilizando tal sistema, las células sembradas pueden alcanzar una concentración de siembra de aproximadamente 5x a aproximadamente 1000x mayor que la alcanzada en condiciones de cultivo celular 2D y, a diferencia del sistema de cultivo 2D, el entorno de la MEC permite la diferenciación funcional adicional de las células, por ejemplo, la diferenciación de células progenitoras en células que demuestran fenotipos específicos de órgano o de tejido que tienen una función sostenida. En una realización, la combinación de las condiciones de cultivo y la fuente de la MEC permite la diferenciación funcional de las células

introducidas en la MEC.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para preparar una perfusión basada en un cultivo celular 3D *in vitro* que tiene una matriz descelularizada específica de órgano o tejido, y células que se diferencian en tipos celulares funcionales específicos de órgano o tejido. El procedimiento incluye seleccionar una matriz descelularizada por perfusión de un órgano o tejido, y una población de células que incluyen células progenitoras parcialmente diferenciadas que tengan capacidad de diferenciación en tipos celulares presentes en un órgano o tejido nativo que corresponde con el órgano o tejido descelularizado. La matriz descelularizada por perfusión seleccionada se pone en contacto con la población de células progenitoras parcialmente diferenciadas, en condiciones y durante un periodo de tiempo que proporcionan la recelularización de la matriz descelularizada por perfusión y la diferenciación de células en la población en células funcionales. En una realización, el órgano es un corazón. En otra realización, el órgano es un hígado. En otra realización, el órgano es un páncreas. En otra realización, el órgano es un pulmón.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para preparar un cultivo celular 3D *in vitro* basado en perfusión que tiene una matriz descelularizada específica de órgano o tejido, y células que se diferencian en tipos celulares funcionales específicos de órgano o tejido, en que se seleccionan una matriz descelularizada por perfusión de un órgano o tejido, y una población de células que incluyen células diferenciadas que corresponden con las presentes en un órgano o tejido nativo. La matriz descelularizada por perfusión seleccionada se pone en contacto con la población seleccionada de células diferenciadas en condiciones y durante un periodo de tiempo que proporcionan la recelularización de la matriz descelularizada por perfusión y células funcionales.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para preparar un cultivo celular 3D *in vitro* basado en perfusión que tiene una matriz descelularizada específica de órgano o tejido, y células que se diferencian en tipos celulares funcionales específicos de órgano o tejido. El procedimiento incluye seleccionar una matriz descelularizada por perfusión de un órgano o tejido, y una población de células madre que tienen la capacidad de diferenciación en tipos celulares presentes en un órgano o tejido nativo que corresponde con el órgano o tejido descelularizado. La matriz descelularizada por perfusión seleccionada se pone en contacto con la población de células madre en condiciones y durante un periodo de tiempo que proporcionan la recelularización de la matriz descelularizada por perfusión, y la diferenciación de las células en la población en células funcionales. En una realización, las células madre son células madre pluripotentes inducidas (iPS, sigla del inglés *induced pluripotent stem*). En una realización, las células madre son células madre embrionarias (ME), por ejemplo, células ME humanas. En una realización, las células madre son células madre adultas.

En una realización, se emplea en los procedimientos de la invención una porción de una MEC de órgano o tejido, por ejemplo, una aurícula o ventrículo de un corazón o la estructura interior de un páncreas que incluye los islotes. En una realización, la porción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mm de grosor. En una realización, la porción es de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mm de grosor. En una realización, la porción es de aproximadamente 70 a aproximadamente 100 mm de grosor.

En una realización, la invención proporciona el uso de una MEC descelularizada por perfusión de una fuente particular (por ejemplo, un órgano o tejido) para cultivo celular *in vitro* con células para repoblar el armazón de la MEC, en donde las células, las condiciones de cultivo y el armazón de la MEC se seleccionan para dar como resultado en la MEC tipos celulares funcionales específicos de tejido u órgano. En una realización, las matrices descelularizadas por perfusión de un órgano o tejido particular permiten el cultivo de células madre introducidas o de células progenitoras parcialmente diferenciadas que expresan marcadores específicos de una estirpe temprana que corresponden con la embriología del órgano o tejido específico (por ejemplo, células ME parcialmente diferenciadas en Endodermo Definido a través de la expresión de Sox17, Ceberus, FoxA2 y CXCR4, para sembrar un armazón de páncreas) a fin de producir matrices con células funcionales diferenciadas adaptadas al armazón de órgano o tejido pretendido.

En una realización, se cultivan células ME o iPS cardíacas parcialmente diferenciadas en un armazón de MEC cardíaca descelularizada por perfusión durante un tiempo, por ejemplo, aproximadamente 2 a aproximadamente 80 días, y en condiciones para producir células cardíacas, por ejemplo, una población sustancialmente pura tal como una que tenga más de aproximadamente el 50% de cardiomiocitos auriculares cuando se cultiva en una MEC cardíaca auricular, más de aproximadamente el 50% de cardiomiocitos ventriculares cuando se cultiva en una MEC ventricular, y/o más de aproximadamente el 50% de cardiomiocitos nodulares cuando se cultiva en una MEC nodular, cuyos cardiomiocitos se identifican por sus formas de potencial de acción funcional y/o duraciones de potencial de acción, por ejemplo, un potencial de acción auricular que presenta potenciales de acción de tipo triangular típicos en comparación con la meseta prominente presentada por los cardiomiocitos ventriculares. Esta clasificación es a base de las propiedades del potencial de acción medido por la velocidad máxima de ascenso del potencial de acción ($dV/dt_{máx}$), la duración del potencial de acción (DPA), la amplitud del potencial de acción (APA) y la prominencia de la despolarización de la fase 4. Los potenciales de acción de tipo nodular se caracterizaron por una despolarización de fase 4 prominente, una velocidad máxima de despolarización lenta ($dV/dt_{máx}$) y una APA más pequeña. Los potenciales de acción ventriculares pueden distinguirse por la presencia de una fase de mesa significativa del potencial de acción que da como resultado una duración significativamente más larga en comparación con los potenciales de acción embrionario-auriculares de forma más triangular. Estas propiedades

electrofisiológicas son bastante distintas del músculo cardiaco neonatal y adulto. En particular, los potenciales de acción embrionarios se caracterizan por potenciales diastólicos máximos (PDM) más despolarizados y potenciales de acción tipo “lento” basados en una $dV/dt_{máx}$ baja (aproximadamente 5 a aproximadamente 30 V/s).

5 En otra realización, las células madre o progenitoras se siembran sobre un armazón de MEC cardiaca descelularizada por perfusión y se cultivan durante un periodo en condiciones que dan como resultado células cardiacas completamente funcionales, por ejemplo, cardiomiocitos nódulo auriculares o ventriculares. En otra realización, se siembran células pancreáticas parcialmente diferenciadas obtenidas de células ME o iPS sobre un armazón de MEC pancreática descelularizada por perfusión y se cultivan durante un tiempo y en condiciones que dan como resultado células alfa completamente funcionales, células PP, células delta, células épsilon y/o células beta, por ejemplo, en que las células alfa producen glucagón, las células beta producen insulina y amilina, las células delta producen somatostatina, las células PP producen polipéptido pancreático, las células épsilon producen grelina.

10 En aún otra realización, se siembran células madre o progenitoras sobre un armazón de MEC pancreática descelularizada por perfusión y se cultivan durante un tiempo y en condiciones que dan como resultado células beta completamente funcionales. En una realización, el cultivo da como resultado más del 35% de las células que expresan insulina en respuesta a la estimulación con glucosa.

15 En otra realización, las células hepáticas parcialmente diferenciadas obtenidas de células ME o iPS se siembran sobre un armazón de MEC de hígado descelularizada por perfusión y se cultivan durante un tiempo y en condiciones que dan como resultado células hepáticas completamente funcionales, por ejemplo, células que metabolizan reactivos en presencia de amonio, lidocaína y/o diazepam añadidos, o células que producen albúmina y urea. En otra realización, las células madre o progenitoras se siembran sobre un armazón de MEC de hígado descelularizada por perfusión y se cultivan durante un tiempo y en condiciones que dan como resultado células hepáticas completamente funcionales.

20 En otra realización, se cultiva una población de células completamente diferenciadas o primarias en un armazón de MEC descelularizada por perfusión en condiciones que mantienen la función de las células introducidas.

25 Las matrices de órgano o tejido de MEC pueden obtenerse de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación, corazón, hígado, pulmones, músculos esqueléticos, cerebro, páncreas, bazo, riñones, útero, ojo, médula espinal, músculo entero o vejiga, o cualquier porción de los mismos (por ejemplo, una válvula aórtica, una válvula mitral, una válvula pulmonar, una válvula tricúspide, una vena pulmonar, una arteria pulmonar, vasculatura coronaria, tabique, una aurícula derecha, una aurícula izquierda, un ventrículo derecho o un ventrículo izquierdo). Un órgano sólido se refiere a un órgano que tiene un sistema vascular “sustancialmente cerrado”. Un sistema vascular “sustancialmente cerrado” con respecto a un órgano significa que tras la perfusión con un líquido la mayoría del líquido está contenido dentro del órgano sólido y no se filtra del órgano sólido, suponiendo que en los vasos principales se introduce una cánula, se ligan o restringen de otra manera. A pesar de tener un sistema vascular “sustancialmente cerrado”, muchos de los órganos enumerados anteriormente tienen vasos de “entrada” y “salida” definidos que son útiles para introducir y mover el líquido por todo el órgano durante la perfusión. Además, pueden descelularizarse por perfusión otros tipos de órganos o tejidos vascularizados tales como, por ejemplo, toda o porciones de articulaciones (por ejemplo, rodilla, hombros o cadera), ano, tráquea o médula espinal. Adicionalmente, pueden descelularizarse tejidos vasculares tales como, por ejemplo, el cartilago o la córnea, cuando forman parte de una estructuras vascularizadas más grandes, tal como una pierna entera.

30 Las matrices descelularizadas por perfusión de órganos con un sistema vascular sustancialmente cerrado son particularmente útiles debido a que la descelularización por perfusión preserva la matriz intacta y el microentorno, incluyendo un sistema vascular y microvascular intactos, y ese sistema vascular puede utilizarse para suministrar células así como nutrientes y/o factores de diferenciación o de mantenimiento a las células *in vitro*. Las células y nutrientes y/u otros factores pueden suministrarse por otros medios, por ejemplo, inyección o medios pasivos, o una combinación de los mismos. En una realización, se perfunde una población celular de interés en la MEC de órgano descelularizado por perfusión permitiendo la siembra en el espacio intersticial o la matriz fuera de los conductos vasculares. Esto incluye la migración activa y/o movimiento dirigido de células a su microestructura nativa, por ejemplo, el movimiento dirigido de células beta a estructuras de islotes dentro de la matriz de hígado. En una realización, se perfunde una población celular de interés dentro de la MEC descelularizada por perfusión seguido de una segunda población celular, por ejemplo, una población de células beta, seguido de una población de células endoteliales, en que las células endoteliales permanecen en los conductos vasculares al igual que en su entorno nativo. En otra realización, se combinan dos o más poblaciones celulares y se perfunden juntas. En otra realización, se introducen en serie dos o más poblaciones celulares distintas a través de perfusión, inyección directa o una combinación de ambas. Por ejemplo, pueden introducirse hepatocitos en una matriz de hígado descelularizada por perfusión ya sea a través de perfusión o de inyección, seguido de la siembra de células endoteliales. En otra realización, se siembra la matriz de hígado descelularizada por perfusión con células hepáticas fetales incluyendo células endoteliales y epiteliales. En otra realización, se siembran en la matriz células hepáticas fetales seguido de células endoteliales. En otra realización, se siembran células pulmonares fetales que contienen una mezcla de todos los tipos celulares pulmonares incluyendo las estirpes epiteliales, endotelial e intersticial, a través de perfusión en la vasculatura y las vías pulmonares de un pulmón descelularizado por perfusión, por ejemplo, para crear una

construcción pulmonar funcional tal como una que proporciona una mayor maduración de las células pulmonares aisladas. En una realización, se perfunde un corazón descelularizado por perfusión procedente de un mamífero pequeño, por ejemplo una rata, conejo, ratón, cobaya o hurón, con cardiomiocitos humanos parcialmente diferenciados, fibroblastos cardíacos humanos, células de músculo liso humano y células endoteliales humanas, para crear un corazón humano miniaturizado que late, por ejemplo para análisis farmacéutico.

Las células pueden introducirse en medios que sustenten la proliferación, metabolismo y/o diferenciación de las células. Como alternativa, después de que las células hayan poblado la MEC, el medio se cambia a uno que sustente la proliferación, metabolismo y diferenciación de las células. Las células cultivadas pueden existir en la MEC a densidades celulares fisiológicas y, en presencia de medios que sustenten la proliferación, metabolismo y/o diferenciación de las células, y/o el microentorno apropiado en la MEC, permitir el mantenimiento y/o la diferenciación funcional de las células.

En una realización, se cultivan células cardíacas primarias en una matriz cardíaca descelularizada por perfusión con el fin de mantener la expresión y función específica cardíaca, por ejemplo, medido por qRT-PCR y pinzamiento zonal. Cuando se cultivan en una matriz cardíaca descelularizada por perfusión, la función contráctil se mantiene en las células cardíacas primarias introducidas durante al menos 2 semanas. Además, las células son sensibles a la estimulación eléctrica y tienen contracciones sincrónicas. Esto está en contraste con las condiciones de cultivo que no incluyen amazones de MEC, en donde del 50 al 70% de los cardiomiocitos primarios se pierden durante la primera semana de cultivo, con un descenso continuo de sus propiedades electrofisiológicas (Exp Physiol., marzo de 2008; 93(3): 370-82. Epub 21 de diciembre de 2007) y la pérdida de la función contráctil tan pronto como en el día 2.

En una realización, las células cardíacas parcialmente diferenciadas, incluyendo las obtenidas de células ME o iPS, se cultivan en una matriz descelularizada por perfusión durante un tiempo y en condiciones que permiten la maduración de los fenotipos específicos cardíacos. Por ejemplo, las células se cultivan en condiciones en un tejido auricular descelularizado por perfusión que producen fenotipos específicos auriculares o se cultivan en condiciones en un tejido ventricular descelularizado por perfusión que producen fenotipos específicos ventriculares, determinado por expresión génica y/o electrofisiología. En una realización, células beta parcialmente diferenciadas cultivadas en una matriz pancreática descelularizada por perfusión dan como resultado células que tienen la capacidad de regulación insulina y liberación de insulina con respecto a diversos detonantes de glucosa o eléctricos.

Las células y la MEC pueden ser xenogénicas o alogénicas. En una realización, pueden combinarse las células humanas parcial o completamente diferenciadas y un órgano o tejido descelularizado por perfusión procedente de un animal pequeño, por ejemplo, un mamífero no humano. En un ejemplo, se siembra una matriz de hígado descelularizada por perfusión procedente de un ser humano o conejo con hepatocitos obtenidos de células ME humanas parcialmente diferenciadas proporcionado matrices sembradas con células alogénicas o xenogénicas, respectivamente, que pueden emplearse para el análisis farmacológico o toxicológico.

Por lo tanto, la invención también proporciona un sistema para el análisis farmacológico que emplea una matriz recelularizada de la invención. Además se proporciona un sistema para suministrar células completamente diferenciadas para usos *in vitro* o *in vivo*, en donde las células se aíslan de una matriz recelularizada de la invención.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para explorar agentes bioactivos. El procedimiento incluye poner en contacto uno o más agentes y una matriz recelularizada de la invención, y detectar o determinar si uno o más agentes modifican el metabolismo, la expresión de uno o más productos génicos o el fenotipo de las células en la matriz. En una realización, la matriz es de un corazón, páncreas, hígado, riñón o pulmón de mamífero. En una realización, las células de la matriz son tipos celulares cardíacos funcionales, hepatocitos funcionales o células beta funcionales. En una realización, las células cardíacas funcionales diferenciadas de la matriz cardíaca tienen potenciales de acción específicos de aurícula o potenciales de acción específicos de ventrículo. En una realización, los hepatocitos funcionales diferenciados en la matriz de hígado expresan albúmina, expresan HepPar1, y/o depositan glucógeno, o liberan albúmina o urea, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, las células beta diferenciadas de la matriz liberan insulina en respuesta a la estimulación con glucosa. En una realización, las células y el órgano o tejido descelularizado por perfusión son alogénicos. En una realización, las células y la matriz descelularizada por perfusión son xenogénicas. En una realización, las células de la matriz incluyen hepatocitos humanos y la matriz descelularizada por perfusión procede de un mamífero no humano.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para proporcionar células maduras *in vitro*. El procedimiento incluye proporcionar una matriz recelularizada de la invención, permitir la diferenciación o maduración de las células en la matriz; y aislar de la matriz las células diferenciadas o maduras. En una realización, la matriz es de un corazón, páncreas, hígado, riñón o pulmón de mamífero. En una realización, las células de la matriz son tipos celulares cardíacos funcionales, hepatocitos funcionales o células beta-funcionales. En una realización, las células cardíacas funcionales diferenciadas de la matriz cardíaca tienen potenciales de acción específicos de aurícula o potenciales de acción específicos de ventrículo. En una realización, los hepatocitos funcionales diferenciados de la matriz de hígado expresan albúmina, expresan HepPar1 y/o depositan glucógeno, o liberan albúmina y urea, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, las células beta diferenciadas en la matriz liberan insulina en respuesta a la estimulación con glucosa. En una realización, las células y el órgano o tejido descelularizado por perfusión son alogénicos. En una realización, las células y la matriz descelularizada por perfusión son xenogénicos.

En una realización, las células de la matriz incluyen hepatocitos humanos y la matriz descclularizada por perfusión procede de un mamífero no humano.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1A muestra una fotografía de un hígado porcino descclularizado por perfusión.
 Las Figuras 1B-1C muestran una fotografía de microscopía electrónica de barrido (MEB) de un vaso y de la matriz parenquimatosa, respectivamente, del hígado porcino descclularizado por perfusión.
 La Figura 2 proporciona una vista general de un hígado de rata descclularizado por inmersión, en que puede observarse el deshilachamiento de la matriz tanto a un aumento bajo (izquierda) como alto (derecha).
 10 La Figura 3 muestra fotografías de MEB de un hígado de rata descclularizado por inmersión (A y B) y de un hígado de rata descclularizado por perfusión (C y D).
 La Figura 4 proporciona la histología del hígado descclularizado por inmersión (A, tinción con HyE; B, tinción tricrómica) y un hígado descclularizado por perfusión (C, tinción con HyE; B, tinción tricrómica).
 La Figura 5 ilustra una comparación entre la descclularización por inmersión (fila de la parte superior) y la descclularización por perfusión (fila de la parte inferior) de un corazón de rata.
 15 La Figura 6 muestra comparaciones entre la descclularización por inmersión (fila de la parte superior) frente a la descclularización por perfusión (fila de la parte inferior), utilizando hígado de rata.
 La Figura 7 muestra fotografías de MEB de riñón descclularizado.
 La Figura 8A muestra una fotografía de MEB de un corazón descclularizado por perfusión, mientras que la Figura 8B muestra una fotografía de MEB de un corazón descclularizado por inmersión.

Descripción detallada de la invención

- La presente invención proporciona el diseño técnico de células y las MEC que, a través de interacciones físicas así como moleculares, dirigen el control del comportamiento celular mediante el control del entorno de las células. En particular, la presente invención proporciona órganos, tejidos o biorreactores diseñados técnicamente que tienen una MEC descclularizada por perfusión implantada con una población de células, incluyendo combinaciones de células,
 25 y sometida a condiciones de cultivo, por ejemplo, que incluyen la perfusión de mediadores solubles, cuya estructura de la MEC y las condiciones de cultivo dan como resultado células funcionales. En particular, la invención proporciona la regulación mejorada de la diferenciación celular, el crecimiento y la expresión fenotípica de células madre, tanto adultas como embrionarias, y de células progenitoras parcialmente diferenciadas, y el mantenimiento mejorado de los tipos celulares diferenciados. También incluye el crecimiento y el mantenimiento funcional de
 30 células primarias incluyendo células obtenidas del feto, por ejemplo, células específicas de órgano obtenidas de células fetales o células de neonato (por ejemplo, células que están comprometidas con un linaje específico pero que no están diferenciadas de forma definitiva). La invención supera la diferenciación celular limitada que produce un bajo porcentaje de un fenotipo específico y/u obtiene solo un fenotipo del desarrollo neonatal o temprano. Por ejemplo, actualmente la diferenciación cardíaca de células iPS (Zhang y col., *Circ Res.*, 27; 104(4): e30-41. (2009) Epub 12 de febrero de 2009) produce solo el 13 % de cardiomiocitos de tipo auricular. Por el contrario, el uso de los sistemas de la invención da como resultado un porcentaje aumentado de células diferenciadas, por ejemplo, hasta
 35 más del 30 % cuando las células iPS se cultivaron dentro o sobre la MEC específica de aurícula. También es posible obtener un fenotipo más maduro o de tipo adulto utilizando los sistemas de la invención. Para la diferenciación cardíaca, esto se caracteriza por diversas propiedades electrofisiológicas en que los potenciales de acción embrionarios se caracterizan por potenciales diastólicos máximos (PDM) más despolarizados y potenciales de acción de tipo "lento" basados en $dV/dt_{máx}$ bajo (aproximadamente 5 a aproximadamente 30 V/s). A diferencia del uso del trasplante *in vivo* para la diferenciación de células MEh en células productoras de insulina, la presente invención proporciona el uso de una MEC de páncreas para conseguir la diferenciación *in vitro* en células beta funcionales que tengan capacidad de regulación de insulina en respuesta a la estimulación de glucosa. En una
 40 realización, las células diferenciadas de la invención tienen al menos el 20 % de la función de las correspondientes células normales *in vivo*.

- En particular, las MEC descclularizadas por perfusión son adecuadas para el cultivo 3D *in vitro* de células primarias y madre, y para la formación de órganos y tejidos, dado que la MEC proporciona las señales biológicas apropiadas necesarias para recapitular la complejidad de un dado entorno de MEC y la capacidad de estar continuamente
 50 perfundidos. El biorreactor resultante puede emplearse, por ejemplo, para proporcionar la expansión de células madre o progenitoras con control de la diferenciación, y xenoinjertos que puedan recuperarse fácilmente de las construcciones celularizadas tras haberse producido la expansión, diferenciación y/o el remodelado de la matriz, u órganos, por ejemplo, estructuras vascularizadas de órganos, o tejidos que contienen las poblaciones celulares funcionales que puedan utilizarse para análisis toxicológico.

MEC descclularizada por perfusión

- Los estudios han demostrado que las células del tejido conectivo se comportan de manera muy distinta en cultivos 3D en comparación con los de 2D (Cukierman y col., *Science*, 294: 1708 (2001)). Por ejemplo, el cultivo de fibroblastos en sustratos planos induce una polaridad que no se produce *in vivo*. Adicionalmente, cuando se cultivan fibroblastos y otros tipos celulares en matrices obtenidas de tejidos 3D, al cabo de minutos se desarrollan complejos
 60 de adhesión focal maduros que contienen integrina, que se asemejan a los complejos hallados *in vivo*, mientras que

en cultivos 2D o incluso en geles de colágeno de tipo I 3D simples o Matrigel solo se desarrollan complejos de adhesión primitivos. Estos complejos de adhesión se requieren para una señalización de receptor activado por factores de crecimiento apropiada y el rápido inicio (al cabo de 5 minutos) de la síntesis de sus propios componentes y factores de MEC que modifican la MEC (Cukierman y col., 2001; Abbott, Nature, 424: 870 (2003)). Además, las células en el cultivo de MEC depositan factores de crecimiento autocrinos en las matrices obtenidas de tejido, un proceso que puede requerir la presentación apropiada del factor de crecimiento para las células diana. Tales factores se secretan principalmente en el medio de cultivo en los cultivos 2D.

Como se mencionó anteriormente, las interacciones físicas con la MEC pueden regular el destino celular, además de los factores químicos, moleculares (por ejemplo, mediadores solubles) o genéticos (tipo celular). Por ejemplo, el control de la célula basado en la MEC puede producirse a través de múltiples mecanismos físicos, tales como la geometría de la MEC a micro y nanoescala, la elasticidad de la MEC o las señales mecánicas transmitidas desde la MEC a las células.

La invención incluye el uso de las MEC descelularizadas por perfusión diseñadas técnicamente que permiten un mejor control del comportamiento celular, por ejemplo, de células madre adultas o embrionarias, a través de interacciones físicas así como moleculares, con respecto a los sistemas que emplean componentes purificados, tales como colágenos purificados y proteínas de adhesión tales como la fibronectina. Las matrices descelularizadas por perfusión de la invención imitan la naturaleza intrincada y altamente ordenada de la MEC nativa y la posible interacción recíproca entre las células y la MEC. En particular, la MEC puede proporcionar señales específicas de tejido a las células madre y progenitoras. En particular, para la especificidad de la MEC pueden ser importantes distintas proteínas de matriz a través de su contribución a la arquitectura de la MEC o a través de su capacidad de interactuar con factores de crecimiento y/o las propias células residentes.

La descelularización por perfusión de la MEC de tejido u órgano proporciona una MEC intacta que tiene la capacidad de proporcionar las propiedades estructurales, bioquímicas y mecánicas para permitir la diferenciación y mantenimiento celulares funcionales. Por lo tanto, la descelularización por perfusión de órganos permite a los órganos actuar como un biorreactor específico de tejido/órgano para la diferenciación de células madre o progenitoras. Además, la descelularización por perfusión de la MEC de órgano o tejido es superior a la inmersión en términos de la conservación de una matriz intacta con señales estructurales y bioquímicas, incluyendo la vasculatura intacta. Además, la descelularización por perfusión proporciona ventajas con respecto a la descelularización por inmersión cuando el grosor del tejido u órgano excede aproximadamente los 2 mm de grosor.

Descelularización de órganos o tejidos

En general la descelularización incluye las siguientes etapas: estabilización del órgano sólido, por ejemplo una estructura vascularizada del mismo, o de un tejido, la descelularización del órgano sólido o tejido, la renaturalización y/o neutralización del órgano sólido o tejido, el lavado del órgano sólido, la degradación de cualquier ADN restante en el órgano, la desinfección del órgano o tejido y la homeostasis del órgano.

La etapa inicial en la descelularización de una estructura vascularizada de un órgano o tejido es introducir una cánula en el órgano o tejido. Se puede introducir una cánula en los vasos, conductos y/o cavidades de un órgano o tejido utilizando procedimientos y materiales conocidos en la técnica. A continuación, la estructura vascularizada del órgano donde se introdujo la cánula o el tejido se perfunde con un medio de ruptura celular. La perfusión a través de un órgano puede ser multidireccional (por ejemplo, anterógrada o retrógrada).

La perfusión de Langendorff de un corazón es rutinaria en la técnica, como lo es la perfusión fisiológica (también conocida como perfusión de modo de trabajo de cuatro cámaras). Véase, por ejemplo, Dehnert, The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff, en Methods in Experimental Physiology and Pharmacology: Biological Measurement Techniques V. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, Alemania Occidental, 1988.

Brevemente, para la perfusión de Langendorff, se introduce una cánula en la aorta y se conecta a un depósito que contiene solución fisiológica para permitir que el corazón funcione fuera del cuerpo durante un tiempo concreto. Para conseguir la descelularización por perfusión, el protocolo se ha modificado para perfundir un medio de ruptura celular suministrado en una dirección retrógrada por la aorta, ya sea a un caudal suministrado constante, por ejemplo, mediante una bomba de infusión o peristáltica, o mediante una bomba de presión hidrostática constante. En ambos casos las válvulas aórticas se cierran de forma forzada y el líquido de perfusión se dirige a las aberturas coronaria (perfundiendo de este modo, por vía anterógrada, la masa ventricular del corazón completa), la cual drena después en la aurícula derecha a través del seno coronario. Para la perfusión en modo de trabajo, se conecta una segunda cánula a la aurícula izquierda y la perfusión puede cambiarse a retrógrada.

En una realización, una solución fisiológica incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización, la solución fisiológica es un tampón fisiológicamente compatible complementado con, por ejemplo, complementos nutritivos (por ejemplo, glucosa). Por ejemplo, para el corazón la solución fisiológica puede ser tampón de Krebs-Henseleit modificado, que tiene NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 11 mM, CaCl₂ 1,75 mM, piruvato 2,0 mM e insulina 5 U/l; o tampón de Krebs, que contiene NaCl 118 mM,

KCl 4,7 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2 mM, gaseado con O₂ al 95 %, CO₂ al 5 %. Los corazones pueden perfundirse con glucosa (por ejemplo, aproximadamente 11 mM) como único sustrato o en combinación con palmitato aproximadamente 1 o 1,2 mM. Para el riñón, la solución fisiológica puede ser Solución de Perfusión de Riñón KPS-1®. Para el hígado, la solución fisiológica puede ser

5 tampón de Krebs-Henseleit, que tiene NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 8 mM y CaCl₂ 1,25 mM, complementado con BSA al 2 %.

Se conocen en la técnica procedimientos para perfundir otros órganos o tejidos. A modo de ejemplo, las siguientes referencias describen la perfusión del pulmón, hígado, riñón, cerebro y extremidades. Van Putte y col., Ann. Thorac. Surg., 74(3): 893 (2002); den Butter y col., Transpl. Int., 8:466 (1995); Firth y col., Clin. Sci. (Lond.), 77(6): 657

10 (1989); Mazzetti y col., Brain Res., 999(1): 81 (2004); Wagner y col., J. Artif. Organs, 6(3): 183 (2003).

Pueden utilizarse para descelularizar un órgano o tejido uno o más medios de ruptura celular. Un medio de ruptura celular incluye en general al menos un detergente tal como, pero sin limitación, SDS, PEG, CHAPS o Triton X. Un medio de ruptura celular puede incluir agua, de forma que el medio sea osmóticamente compatible con las células. Como alternativa, un medio de ruptura celular puede incluir un tampón (por ejemplo, PBS) para la compatibilidad

15 osmótica con las células. Los medios de ruptura celular también pueden incluir enzimas tales como, pero sin limitación, una o más colagenasas, una o más dispasas, una o más ADNasas o una proteasa tal como tripsina. En algunos casos, el medio de ruptura celular también, o como alternativa, puede incluir inhibidores de una o más enzimas (por ejemplo, inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa y/o inhibidores de colagenasa).

En determinadas realizaciones, un órgano en el que se introdujo una cánula o tejido puede perfundirse de forma secuencial con dos medios distintos de ruptura celular. Por ejemplo, el primer medio de ruptura celular puede incluir un detergente aniónico tal como SDS y el segundo medio de ruptura celular puede incluir un detergente iónico tal como Triton X. Después de la perfusión con al menos un medio de ruptura celular, puede perfundirse un órgano en el que se introdujo una cánula o tejido con, por ejemplo, soluciones de lavado y/o soluciones que contengan una o más enzimas tales como las desveladas en el presente documento.

20

Alternando la dirección de perfusión (por ejemplo, anterógrada y retrógrada) se puede ayudar a la descelularización del órgano completo o tejido. La descelularización en general descelulariza el órgano desde adentro hacia afuera, dando como resultado muy poco daño para la MEC. Un órgano o tejido puede descelularizarse a una temperatura adecuada de entre 4 y 40 °C. Dependiendo del tamaño y del peso de un órgano o tejido, y del detergente (o detergentes) particular y la concentración de detergente (o detergentes) en el medio de ruptura celular, un órgano o

25 tejido se perfunde con medio de ruptura celular en general desde aproximadamente 0,05 horas a aproximadamente 5 horas, por gramo de órgano sólido o tejido (en general > 50 gramos), o aproximadamente 2 horas a aproximadamente 12 horas, por gramo de órgano sólido o tejido de órganos (en general < 50 gramos). Incluyendo los lavados, un órgano puede perfundirse durante hasta aproximadamente 0,75 horas a aproximadamente 10 horas por gramo de órgano sólido o tejido (en general >50 gramos) o aproximadamente 12 horas a aproximadamente 72

30 horas, por gramo de tejido (en general <50 gramos). El tiempo de descelularización depende de la densidad vascular y celular del órgano o tejido con un cambio de escala limitado para la masa global. Por lo tanto, los intervalos de tiempo y las masas anteriores se proporcionan como orientación general. En general, la perfusión se ajusta a las condiciones fisiológicas incluyendo el flujo intermitente, la velocidad y la presión.

35

Un órgano o tejido descelularizado tiene los componentes de la matriz extracelular (MEC) de todas o de la mayoría de las regiones del órgano o tejido, incluyendo los componentes de MEC del árbol vascular. Los componentes de MEC pueden incluir cualquiera o todos de lo siguiente: fibronectina, fibrilina, laminina, elastina, miembros de la familia del colágeno (por ejemplo, colágeno I, III y IV), proteínas de crecimiento asociadas a la MEC incluyendo factores de crecimiento y citocinas, glucosaminoglucanos, sustancia fundamental, fibras reticulares y trombospondina, las que pueden permanecer organizadas como estructuras definidas tales como la lámina basal. La

40 descelularización satisfactoria se define como la ausencia de miofilamentos, células endoteliales, células de músculo liso detectables, y núcleos en cortes histológicos, utilizando procedimientos de tinción histológica convencionales, o la eliminación de más del 97 % del ADN detectable medido por ensayo fluorométrico. Los restos celulares residuales pueden eliminarse del órgano o tejido descelularizado.

45

La morfología y la arquitectura de la MEC se mantienen durante y después del procedimiento de descelularización. "Morfología" como se usa en el presente documento se refiere a la forma global del órgano, tejido o de la MEC, mientras que "arquitectura" como se usa en el presente documento se refiere a la superficie exterior, a la superficie interior y la MEC entre ellas.

50

La morfología y la arquitectura de la MEC pueden examinarse de forma visual y/o histológica. Por ejemplo, la lámina basal de la superficie exterior de un órgano o dentro de la vasculatura de un órgano o tejido no debería eliminarse o dañarse de forma significativa debido a la descelularización por perfusión. Además, las fibrillas de la MEC deben ser similares o significativamente iguales a las de un órgano o tejido que no se ha descelularizado.

55

Pueden aplicarse uno o más compuestos en o sobre un órgano o tejido descelularizado para, por ejemplo, conservar el órgano descelularizado, o para preparar el órgano o tejido descelularizado para la recelularización y/o para ayudar o estimular a las células durante el procedimiento de recelularización. Tales compuestos incluyen, pero sin

limitación, uno o más factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF, DKK-1, FGF, BMP-1, BMP-4, SDF-1, IGF y HGF), agentes moduladores inmunitarios (por ejemplo, citocinas, glucocorticoides, antagonistas de IL2R, antagonistas de leucotrienos) y/o factores que modifican la cascada de coagulación (por ejemplo, aspirina, proteínas de unión a heparina y heparina). Además, el órgano o tejido descelularizado puede tratarse adicionalmente con, por ejemplo, radiación (por ejemplo, UV, gamma) para reducir o eliminar la presencia de cualquier tipo de microorganismo remanente en o dentro del órgano o tejido descelularizado.

Descelularización por perfusión de corazón ejemplar

Protocolo de descelularización con PEG

Se lavan los corazones en 200 ml de PBS que contiene penicilina 100 U/ml, Estreptomina 0,1 mg/ml, Anfotericina B 0,25 µg/ml, 1000 U de heparina y 2 mg de Adenocard sin recirculación. Después, los corazones se descelularizan con 35 ml de polietilenglicol (PEG; 1 g/ml) durante hasta 30 minutos con recirculación manual. Después se lava el órgano con 500 ml de PBS durante hasta 24 horas utilizando una bomba para recirculación. La etapa de lavado se repite al menos dos veces durante al menos 24 horas cada vez. Los corazones se exponen a 35 ml de ADNasa I (70 U/ml) durante al menos 1 hora con recirculación manual. Los órganos se lavan otra vez con 500 ml de PBS durante al menos 24 horas.

Protocolo de descelularización con Triton X y tripsina

Los corazones se lavan en 200 ml de PBS que contiene Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 0,1 mg/ml, Anfotericina B 0,25 µg/ml, 1000 U de heparina y 2 mg de Adenocard durante al menos aproximadamente 20 minutos sin recirculación. Después, los corazones se descelularizan con Tripsina al 0,05 % durante 30 minutos seguido de perfusión con 500 ml de PBS que contiene Triton-X al 5 % e hidróxido de amonio al 0,1 % durante aproximadamente 6 horas. Los corazones se perfunden con agua desionizada durante aproximadamente 1 hora y después se perfunden con PBS durante 12 horas. Después, los corazones se lavan tres veces durante 24 horas cada vez en 500 ml de PBS utilizando una bomba para recirculación. Los corazones se perfunden con 35 ml de ADNasa I (70 U/ml) durante 1 hora con recirculación manual y se lavan dos veces en 500 ml de PBS durante al menos 24 horas cada vez, utilizando una bomba para recirculación.

Protocolo de descelularización con SDS al 1 %

Los corazones se lavan en 200 ml de PBS que contiene Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 0,1 mg/ml, Anfotericina B 0,25 µg/ml, 1000 U de heparina y 2 mg de Adenocard durante al menos aproximadamente 20 minutos sin recirculación. Los corazones se descelularizan con 500 ml de agua que contiene SDS al 1 % durante al menos aproximadamente 6 horas utilizando una bomba para recirculación. Después, los corazones se lavan con agua desionizada durante aproximadamente 1 hora y se lavan con PBS durante aproximadamente 12 horas. Los corazones se lavan tres veces con 500 ml de PBS durante al menos aproximadamente 24 horas cada vez, utilizando una bomba para recirculación. Después, el corazón se perfunde con 35 ml de ADNasa I (70 U/ml) durante aproximadamente 1 hora utilizando recirculación manual y se lavan tres veces con 500 ml de PBS durante al menos 24 horas cada vez, utilizando una bomba para recirculación.

Protocolo de descelularización con Triton X

Los corazones se lavan con 200 ml de PBS que contiene Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 0,1 mg/ml, Anfotericina B 0,25 µg/ml, 1000 U de heparina y 2 mg de Adenocard (adenosina) durante al menos aproximadamente 20 minutos sin recirculación. Después, los corazones se descelularizan con 500 ml de agua que contiene Triton X al 5 % e hidróxido de amonio al 0,1 % durante al menos 6 horas, utilizando una bomba para recirculación. Después, los corazones se perfunden con agua desionizada durante aproximadamente 1 hora y después con PBS durante aproximadamente 12 horas. Los corazones se lavan perfundiendo con 500 ml de PBS, 3 veces durante al menos 24 horas cada vez utilizando una bomba para recirculación. Después, los corazones se perfunden con 35 ml de ADNasa I (70 U/ml) durante aproximadamente 1 hora utilizando recirculación manual y se lavan tres veces en 500 ml de PBS durante aproximadamente 24 horas cada vez.

Los corazones pueden perfundirse a una presión de perfusión coronaria de 60 cm H₂O. Aunque no es necesario, los corazones pueden montarse en una cámara de descelularización y sumergirse completamente, y perfundirse con PBS que contiene antibióticos durante 72 horas en modo de recirculación, a un flujo continuo de 5 ml/minuto para lavar tantos componentes celulares y detergente como sea posible.

Detección de descelularización cardiaca

La descelularización satisfactoria puede medirse por la falta de miofilamentos y núcleos en cortes histológicos. La preservación satisfactoria de las estructuras vasculares puede evaluarse mediante la perfusión con Azul de Evans al 2 % antes de incluir los cortes de tejido. La descelularización altamente eficaz se observa cuando un corazón se perfunde en primer lugar de forma anterógrada con un detergente iónico (dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1 %, aproximadamente 0,03 M) disuelto en H₂O desionizada, a una presión de perfusión coronaria constante y después se perfunde de forma anterógrada con un detergente no iónico (Triton X-100 al 1 %) para eliminar el SDS y

presumiblemente para renaturalizar las proteínas de matriz extracelular (MEC). El corazón puede perfundirse intermitentemente de forma retrógrada con solución tamponada con fosfato para despejar los capilares y los vasos pequeños obstruidos.

5 Para evidenciar las estructuras vasculares intactas después de la descelularización, un corazón descelularizado puede teñirse a través de perfusión de Langendorff con Azul de Evans para teñir la membrana basal vascular y cuantificar la densidad macro y microvascular. Además, pueden perfundirse partículas de poliestireno dentro y a través de un corazón para cuantificar el volumen coronario, el nivel de filtración de los vasos y para evaluar la distribución de la perfusión analizando el efluente coronario y cortes de tejido. Se evalúa una combinación de tres
10 criterios y se comparan con un corazón no descelularizado aislado: 1) una distribución uniforme de partículas de poliestireno, 2) un cambio significativo de filtración a algún nivel, 3) la densidad microvascular.

La orientación de las fibras puede evaluarse mediante la técnica de microscopía de luz polarizada de Tower y col. (Ann Biomed Eng., 30(10): 1221 (2002), que puede aplicarse en tiempo real a una muestra sometida a tensión uniaxial o biaxial. Durante la perfusión de Langendorff se registran las propiedades mecánicas básicas de la MEC descelularizada (adaptabilidad, elasticidad, presión de ruptura) y se comparan con corazones recién aislados.

15 Descelularización por perfusión de hígado ejemplar

Para el aislamiento del hígado la vena cava se expone a través de laparotomía media, se disecciona y se introduce una cánula aórtica de ratón (Radnoti Glass, Monrovia, Calif.). La arteria y vena hepáticas, y el conducto biliar se transeccionan, y el hígado se retira de forma cuidadosa del abdomen y se sumerge en PBS estéril (Hyclone, Logan, Utah) para minimizar la fuerza de arrastre sobre la vena porta. A la perfusión con PBS heparinizado durante 15
20 minutos le siguen 2-12 horas de perfusión con SDS al 1 % (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) en agua desionizada y 15 minutos de Triton-X al 1 % (Sigma, St. Louis, Mo.) en agua desionizada. Después, el hígado se perfundió de forma continua con PBS que contenía antibióticos (penicilina-G (Gibco, Carlsbad, Calif.) 100 U/ml, estreptomycin 100 U/ml (Gibco, Carlsbad, Calif.), Anfotericina B 0,25 µg/ml (Sigma, St. Louis, Mo.)) durante 124 horas.

120 minutos de perfusión con SDS seguido de perfusión con Triton-X 100 son suficientes para generar un hígado completamente descelularizado. La tinción pentacrómica de Movat del hígado descelularizado confirma la retención de la organización hepática característica con la vena central y el espacio porta que contiene la arteria hepática, el conducto biliar y la vena porta.

Recelularización de órganos o tejidos

30 Un órgano o tejido descelularizado se pone en contacto con una población de células, bien sean células diferenciadas (maduras o primarias), células madre o células parcialmente diferenciadas. Por lo tanto, las células pueden ser totipotentes, células pluripotentes o células multipotentes, y pueden ser no comprometidas o comprometidas y pueden ser células de única estirpe. Las células pueden ser células indiferenciadas, células parcialmente diferenciadas o células completamente diferenciadas, incluyendo células obtenidas de feto. Las células pueden incluir células progenitoras, células precursoras o células madre obtenidas de "adulto" incluyendo células de
35 cordón umbilical y células madre fetales. Las células útiles en las matrices de la invención incluyen células madre embrionarias (según define el Instituto Nacional de Salud (NIH, siglas del inglés *National Institute of Health*); véase, por ejemplo, el Glosario en stemcells.nih.gov en Internet) y células iPS.

Los ejemplos de células que pueden utilizarse para recelularizar un órgano o tejido incluyen, pero sin limitación, células madre embrionarias, células sanguíneas de cordón umbilical, células madre o progenitoras obtenidas de
40 tejido, células madre o progenitoras obtenidas de médula ósea, células madre o progenitoras obtenidas de sangre, células madre mesenquimatosas (CMM), células obtenidas de músculo esquelético, células progenitoras adultas multipotentes (CPAM) o células iPS. Las células adicionales que pueden utilizarse incluyen células madre cardíacas (CMC), células madre obtenidas de cardíacas adultas multipotentes, fibroblastos cardíacos, células endoteliales de la microvasculatura cardíaca, células endoteliales aórticas, células endoteliales coronarias, células endoteliales
45 microvasculares, células endoteliales venosas, células endoteliales arteriales, células de músculo liso, cardiomiocitos, hepatocitos, células beta, queratinocitos, fibras de Purkinje, neuronas, células epiteliales del conducto biliar, células de islotes, neumocitos, células Clara, enterocitos o podocitos. También pueden utilizarse como células, células madre obtenidas de médula ósea tales como células mononucleares de médula ósea (CMN-MO), células madre o progenitoras endoteliales o vasculares y células madre obtenidas de sangre periférica tales
50 como células progenitoras endoteliales (CPE).

La cantidad de células que se introducen en o sobre un armazón descelularizado por perfusión puede depender tanto del órgano (por ejemplo, qué órgano, el tamaño y el peso del órgano) o tejido como del tipo y fase del desarrollo de las células regenerativas. Distintos tipos de células pueden tener distintas tendencias en cuanto a la densidad de población a la que llegarán esas células. De manera similar, distintos órganos o tejidos pueden
55 celularizarse a densidades distintas. A modo de ejemplo, un órgano o tejido descelularizado puede "sembrarse" con al menos aproximadamente 1000 (por ejemplo, al menos 10.000, 100.000, 1.000.000, 10.000.000 o 100.000.000) células o pueden tener de aproximadamente 1000 células/mg de tejido (peso húmedo, por ejemplo, antes de la descelularización) a aproximadamente 10.000.000 de células/mg de tejido (peso húmedo) unido a él.

Las células pueden introducirse (“sembrarse”) en un órgano o tejido descclularizado mediante inyección en uno o más emplazamientos. Además, en un órgano o tejido descclularizado puede introducirse más de un tipo de célula. Por ejemplo, puede inyectarse en múltiples posiciones en un órgano o tejido descclularizado una población de tipos celulares diferenciados o pueden inyectarse distintos tipos de células en distintas porciones de un órgano o tejido descclularizado. Como alternativa, o además de la inyección, pueden introducirse células o un cóctel de células mediante perfusión en un órgano o tejido descclularizado en el que se ha introducido una cánula. Por ejemplo, pueden perfundirse células en un órgano descclularizado utilizando un medio de perfusión que puede cambiarse después a un medio de expansión y/o diferenciación, para inducir el crecimiento y/o la diferenciación de las células. La diferenciación específica de emplazamiento puede conseguirse colocando las células en diversos emplazamientos dentro del órgano, por ejemplo, en regiones del corazón, tales como, la auricular, ventricular o nodular.

Durante la recellularización, un órgano o tejido se mantiene en condiciones en que al menos algunas de las células puedan multiplicarse y/o diferenciarse dentro o sobre el órgano o tejido descclularizado. Las condiciones incluyen, pero sin limitación, la temperatura y/o presión apropiadas, actividad eléctrica y/o mecánica, fuerza, las cantidades apropiadas de O₂ y/o CO₂, una cantidad apropiada de humedad y condiciones estériles o casi estériles. Durante la recellularización, el órgano o tejido descclularizado y las células regenerativas unidas al mismo se mantienen en un entorno adecuado. Por ejemplo, las células pueden necesitar un complemento nutritivo (por ejemplo, nutrientes y/o una fuente de carbono tal como glucosa), hormonas exógenas o factores de crecimiento, y/o un pH particular.

Las células pueden ser alogénicas para un órgano o tejido descclularizado (por ejemplo, un órgano o tejido descclularizado humano sembrado con células humanas) o pueden ser xenogénicas para un órgano o tejido descclularizado (por ejemplo, un órgano o tejido descclularizado de cerdo sembrado con células humanas). “Alogénico” como se usa en el presente documento se refiere a células obtenidas de la misma especie de la que se originó el órgano o tejido (por ejemplo, individuos relacionados o no relacionados), mientras que “xenogénico” como se usa en el presente documento se refiere a células obtenidas de una especie distinta de la que se originó el órgano o tejido.

Los medios para células madre o progenitoras pueden contener una diversidad de componentes que incluyen, por ejemplo, el medio KODMEN (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco *Knockout*), DMEM, medio F12 de Ham, SFB (suero fetal bovino), FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2), KSR o LIFh (factor inhibidor de leucemia humana). Los medios de diferenciación celular también pueden contener complementos tales como L-Glutamina, AANE (aminoácidos no esenciales), P/E (penicilina/estreptomina), N2, B27 y beta-mercaptoetanol. Se contempla que puedan añadirse factores adicionales al medio de diferenciación celular, incluyendo, pero sin limitación, fibronectina, laminina, heparina, sulfato de heparina, ácido retinoico, miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (los EGF), miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (los FGF) incluyendo FGF2, FGF7, FGF8 y/o FGF10, miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (los PDGF), antagonistas de la familia de los factores factor de crecimiento transformante (TGF)/proteína morfogénica ósea (BMP, siglas en inglés de *bone morphogenetic proteins*)/factor de crecimiento y diferenciación (GDF) incluyendo, pero sin limitación, nogina, folistatina, cordina, gremlina, proteínas de la familia cerberus/DAN, ventropina, alta dosis de activina y amnionless, o variantes o fragmentos funcionales de las mismas. También pueden añadirse antagonistas de TGF/BMP/GDF en forma de quimeras de receptor de TGF/BMP/GDF-Fc. Otros factores que pueden añadirse incluyen moléculas que pueden activar o inactivar la señalización a través de la familia del receptor Notch, incluyendo, pero sin limitación las proteínas de las familias similar a Delta y Jagged, así como inhibidores del procesamiento o escisión de Notch, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Otros factores de crecimiento pueden incluir miembros de la familia del factor de crecimiento insulínico (IGF), insulina, la familia del factor relacionado Wingless (WNT) y la familia del factor hedgehog, o variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Pueden añadirse factores adicionales para estimular la proliferación y supervivencia de células madre/progenitoras del mesendodermo, madre/progenitoras de endodermo, madre/progenitoras del mesodermo o madre/progenitoras del endodermo definitivo, así como la supervivencia y diferenciación de derivados de estas progenitoras.

En una realización, las matrices descclularizadas de perfusión se combinan con células iPS o ME diferenciadas utilizando el procedimiento del cuerpo embrioide (CE). Por ejemplo, se emplean líneas celulares iPS humanas reprogramadas por transducción, por ejemplo, transducción mediada por lentivirus, de factores de transcripción (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *LIN28*; Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc; u Oct3/4, Sox2 y Klf4). Pueden emplearse clones de iPS de origen fetal o de origen de recién nacido. También pueden emplearse líneas celulares de ME humanas. Las células iPS y ME pueden mantenerse sobre fibroblastos embrionarios de ratón (los FER) irradiados a una densidad de 19.500 células/cm² en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc) en medio de cultivo DMEM/F12 complementado con reemplazante de suero KnockOut (Invitrogen) al 20 %, aminoácidos no esenciales 0,1 mmol/l, L-glutamina 1 mmol/l y β-mercaptoetanol (Sigma) 0,1 mmol/l. Además, el medio puede complementarse con factor de crecimiento de fibroblastos básico de pez cebra para las células iPS 100 ng/ml y con factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (Invitrogen) 4 ng/ml para las células MEh. Las líneas celulares de iPS y ME también pueden mantenerse en placas de 100 mm gelatinizadas en DMEM (Sigma-Aldrich) que contienen suero fetal de ternera al 15 % (SFT; Sigma-Aldrich), 2-mercaptoetanol (2ME) 0,1 μmol/l y LIF (Chemicon International) 1.000 unidades/ml. Para la diferenciación, estas células pueden tratarse con Tripsina/ácido etilendiaminotetracético (GIBCO) al 0,25 % y

transferirse a placas de 6 pocillos gelatinizadas en medio esencial mínimo α (GIBCO) complementado con SFT al 10 % y 2ME 0,05 $\mu\text{mol/l}$, a una concentración de 3×10^4 células/pocillo.

5 Las colonias pueden desprenderse de las placas de cultivo incubando con solución de dispasa (Gibco) 1 mg/ml a 37 °C durante 8 a 15 minutos y colocarse en cultivo en suspensión en placas de adherencia ultrabaja, por ejemplo, durante 4 días. Durante el cultivo en suspensión, el medio puede cambiarse en el día 1 seguido de cultivo durante otros 3 días sin cambio de medio. Los CE se siembran después en placas de cultivo recubiertas con gelatina al 0,1 %, por ejemplo, a una densidad de 50 a 100 CE por pocillo, o en la MEC descelularizada de perfusión y se cultivan en medio de diferenciación (por ejemplo, cambiado de forma diaria).

10 En algunos casos, un órgano o tejido generado mediante los procedimientos descritos en el presente documento han de trasplantarse a un paciente. En estos casos, las células utilizadas para recelularizar un órgano o tejido descelularizado pueden obtener del paciente, de forma que las células son "autólogas" para el paciente. Las células procedentes de un paciente pueden obtenerse de, por ejemplo, sangre, médula ósea, tejidos u órganos en distintas fases de la vida (por ejemplo, de forma prenatal, neonatal o perinatal, durante la adolescencia o como un adulto) utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Como alternativa, las células utilizadas para recelularizar un
15 órgano o tejido descelularizado pueden ser singénicas (es decir, procedentes de un gemelo) para el paciente, las células pueden ser células coincidentes con el antígeno linfocitario humano (HLA) de, por ejemplo, un familiar del paciente o un individuo que coincida con el HLA no relacionado con el paciente o las células pueden ser alogénicas para el paciente, por ejemplo procedentes de un donante con un HLA no coincidente.

20 Independientemente de la fuente de las células (por ejemplo, autólogas o no), el órgano sólido descelularizado puede ser autólogo, alogénico o xenogénico para un paciente.

Durante la recelularización puede controlarse el progreso de las células. Por ejemplo, puede evaluarse el número de células sobre o dentro de un órgano o tejido tomando una biopsia en uno o más puntos temporales durante la recelularización. Además, la cantidad de diferenciación que las células han experimentado puede controlarse determinando si en una célula o una población de células están presentes o no diversos marcadores. Los
25 marcadores asociadas con distintos tipos celulares y distintas fases de diferenciación para esos tipos celulares son conocidos en la técnica, y pueden detectarse fácilmente utilizando anticuerpos e inmunoensayos convencionales. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, 2005, Coligan y col., Eds., John Wiley & Sons, Capítulos 3 y 11. Pueden utilizarse para controlar la recelularización ensayos de ácidos nucleicos así como evaluación morfológica y/o histológica.

30 Diferenciación ejemplar de células cardíacas

El medio de diferenciación para las células cardíacas (EB20) puede incluir DMEM/F12 al 80 %, aminoácidos no esenciales 0,1 mmol/l, L-glutamina 1 mmol/l, β -mercaptoetanol 0,1 mmol/l y SFB al 20 % (Gibco. n.º de catálogo 16000-044, n.º de lote 291526). Tras 10 días de diferenciación puede reducirse la concentración del SFB, por
35 ejemplo, al 2 %. La cantidad de células contráctiles, por ejemplo, los CE y las velocidades de contracción pueden medirse en, por ejemplo, el día 10, 20, 30 y 60, por ejemplo, desde la formación de CE, utilizando un microscopio con una fase calefaccionada (37°) y puede medirse la expresión de cualquiera de los siguientes marcadores del conjunto: *OCT4*, *NANOG*, *NKX2-5*, *TNNT2*, *MYH6*, *ACTN2*, *MYL7*, *MYL2*, *HPPA*, *PLN*, *ACTB*, *GAPDH3*, *OCT4* (total), *OCT4* (endógeno), *NANOG* (total) y/o *NANOG* (endógeno). Otras medidas de la diferenciación de la estirpe cardíaca incluyen estudios de electrofisiología, por ejemplo, la diferenciación en los fenotipos de tipo nodular, auricular y ventricular puede detectarse a base de las características del potencial de acción. Los cardiomiocitos
40 obtenidos de células iPS y ME también pueden presentar sensibilidad a la estimulación β -adrenérgica, tal como un aumento de la velocidad espontánea y una disminución de la duración del potencial de acción.

Diferenciación ejemplar de la estirpe de células pancreáticas

45 Tras la activación de *Pdx1* y *Ptf1a*, el destino pancreático se induce a partir de los progenitores del endodermo. Los progenitores pancreáticos dan origen a los progenitores ductales, de los ácinos y endocrinos (los últimos dan origen a las células secretoras ϵ (grelina), PP (péptido pancreático), β , α (glucagón) y δ (somatostatina). Los progenitores endocrinos se diferencian después (*Ngn3*, *Hnf6* y *Hnf1*) en distintas células secretoras de hormona, α , β , δ , PP y ϵ . Los factores de transcripción clave implicados en distintas etapas de la formación de células beta son *Pax4*, *Arx*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *Pdx1* y *Mafa*.

50 Las ME humanas tienen la capacidad de diferenciación parcial, por ejemplo, en las estirpes del endodermo pancreático fetal o del epitelio pancreático, como se caracteriza por la coexpresión de *PDX1*, *FOXA2*, *HNF6* y *NKX6-1* en, por ejemplo, el día 12 de la diferenciación *in vitro*.

55 Para obtener células beta funcionales, se emplea un armazón de MEC pancreática perfundible para sustentar la diferenciación de células beta en un entorno definido de cultivo 3D. La matriz descelularizada perfundida permite la perfusión a través de la red vascular intacta mientras que otras tecnologías de descelularización alteran la red vascular y la matriz extracelular, lo que no permite la perfusión.

El protocolo de diferenciación de células beta puede ser como se describe en D'Amour y col., Nat. Biotech., 24: 1392 (2006), pero con modificaciones en dos de las fases. La primera modificación elimina la ciclopamina (inhibidor de Hedgehog) y KGF sustituye a FGF10 durante la fase 2 (días 4-6). La otra modificación, en la fase 3, sustituye a FGF10 por Nogina. El protocolo de diferenciación completo es el siguiente. Se inicia en los días 4-6 tras el pase (dependiendo de la densidad del cultivo), se realizan cambios diarios y secuenciales de medio durante todo el protocolo de diferenciación. Tras un breve lavado en PBS (con Mg/Ca), las células se cultivan el primer día en RPMI (sin SFB), activina A (100 ng/ml) y Wnt3a (25 ng/ml). El siguiente día el medio se cambia a RPMI con SFB al 0,2 % vol/vol y activina A (100 ng/ml), y las células se cultivan durante 2 días adicionales. A continuación, las células se lavan brevemente con PBS (con Mg/Ca) y después se cultivan en RPMI con SFB al 2 % vol/vol y KGF (25-50 ng/ml) durante 3 días. El medio se cambia a DMEM con complemento B27 al 1 % vol/vol, KAAD-ciclopamina (0,25 M), ácido todo trans retinoico (AR, 2 M) y Nogina (50 ng/ml) durante 3 días. El medio se cambia a DMEM con complemento B27 al 1 % vol/vol durante 3 días.

Como alternativa, se describen las líneas celulares de ME humanas de referencia H1 y H9 y fibroblastos embrionarios de ratón. El medio de cultivo de células ME humanas incluye DMEM/F12 (Invitrogen) con Reemplazo de Suero Knockout (RSK) al 20 % (Invitrogen) que contiene 8 ng/ml de bFGF (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (1:100, Invitrogen), 1-Glutamina 4 mM, 2-Mercaptoetanol 0,1 mM (Invitrogen), Penicilina/Estreptomina (1:100, Invitrogen); se almacena a 4 °C.

El medio de diferenciación de células ME humanas incluye (a) Medio Definido de forma Química (MDQ): IMDM (Invitrogen) al 50 % más Mezcla de Nutrientes F12 (Invitrogen) al 50 %, complementado con Insulina-Transferrina-Selenio-A (1:100, Invitrogen), Monotioglicerol (Sigma) 450 mM y Fracción de Albúmina V (Sigma) 5 mg/ml. (b) Medio de Maduración de Islotes (IMM):DMEM/F12, fracción V de Insulina-Transferrina-Selenio-A (Sigma). Los factores para la diferenciación de células ME humanas en células productoras de insulina son: Activina A (R&D System) 50-100 ng/ml, ácido todo trans retinoico (Sigma) 10^{-6} M, bFGF (Invitrogen) 10 ng/ml y Nicotinamida (Sigma) 10 mM.

Las líneas celulares de MEh se mantienen siguiendo un protocolo típico. Antes de la inducción, las células MEh se dividen, por ejemplo, en 1:3 (confluentes al 60 %) y se resiembran en placas de cultivo de tejido, por ejemplo, placas de cultivo de tejido recubiertas con Matrigel al 1 % o se introducen en la MEC. Para la adherencia las células MEh se incuban con medio de cultivo de MEh durante una noche.

Las células ME humanas no diferenciadas se cultivan en primer lugar en MDQ que contiene Activina A durante 4 días. Después, las células diferenciadas se inducen adicionalmente con AR en MDQ, durante 4 días y se transfieren del medio de cultivo MDQ a medio DMEM/F12 de maduración de islotes con bFGF añadido como factor de maduración de células pancreáticas, durante 3 días. Para finalizar, las células diferenciadas se cambian a medio DMEM/F12 de maduración de islotes que contiene bFGF y nicotinamida, durante otros 5 días. Para inducir que las células ME humanas se diferencien en células de endodermo definitivas, el medio se cambia a medio MDQ o DMEM/F12 con Activina A 50-100 ng/ml. Para células específicas de la estirpe pancreática, tras una diferenciación de 4 días, las células ME humanas se inducen adicionalmente con AR 10^{-6} M en medio MDQ o DMEM/F12, durante otros 4 días. Para células productoras de insulina, las células específicas de la estirpe pancreática se tratan con Activina A y AR, y después se transfieren del medio MDQ o DMEM/F12 a IMM que contiene bFGF 10 ng/ml como factor de maduración de células pancreáticas, durante 3 días. Las células diferenciadas se cambian a IMM que contiene Nicotinamida 10 mM y bFGF 10 ng/ml durante otros 3-7 días para la maduración de células productoras de insulina.

Diferenciación ejemplar de la estirpe de células hepáticas

La diferenciación de hepatocitos a partir de diversas poblaciones de células madre es un procedimiento de múltiples etapas que consiste en tratamientos distintos con las BMP y FGF para comprometer células a la estirpe hepática seguido de una etapa de maduración que utiliza dexametasona e IL6, o en una única etapa de diferenciación que utiliza HGF y EGF. Ambos procedimientos producen células de tipo hepatocito que tienen la capacidad de expresar marcadores de hepatocito clave que incluyen CXCR4, SOX17, FOXA2, albúmina, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK), glutamina sintasa (GS) y diversas enzimas P450. Para obtener hepatocitos funcionales, se emplea un armazón de MEC de hígado perfundible para sustentar la diferenciación de hepatocitos en un entorno de cultivo 3D definido. La matriz descelularizada perfundida permite la perfusión a través de la red vascular intacta mientras que otras tecnologías de descelularización alteran la red vascular y la matriz extracelular, lo que no permite la perfusión.

Puede cultivarse y mantenerse como se describe en los protocolos del proveedor una línea de CMEh de referencia, H9 (Madison, WI, <http://www.wicell.org>). La inducción de las CMEh a endodermo definitivo (ED) se inicia en condiciones sin suero en medio RPMI 1.640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) complementado con Activina A 100 ng/ml (R&D Systems Inc., Minneapolis, <http://www.rndsystems.com>), L-glutamina 2 mM y antibiótico-antimicótico al 1 % durante 48 horas. Después, el mismo medio se complementa con complemento B27 1x (Invitrogen) y butirato de sodio 0,5 mM durante otros 3-6 días. Las células de ED se separan después con tripsina y se resiembran a una proporción de 1:1-2 en placas recubiertas con colágeno I para la diferenciación hepática con el medio de cultivo, complementado con FGF-4 (20 ng/ml), HGF (20 ng/ml), BMP2 y BMP4 (R & D Systems) (10 ng/ml cada una). Al día siguiente el medio se renueva con el mismo medio más dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5 % durante 10-14 días. Como alternativa, las células de ED se diferencian de forma directa, sin dividir las, utilizando el

mismo medio mencionado anteriormente. Después, las células se diferencian adicionalmente y se mantienen en medio de cultivo de hepatocitos complementado con SingleQuots (Lonza, Walkersville, MD, <http://www.lonza.com>), más suero fetal bovino (SFB) al 2-5 %, FGF-4 (20 ng/ml), HGF (20 ng/ml), Oncostatina M (R & D Systems) (50 ng/ml), Dexametasona 100 nM y DMSO al 0,5 % hasta el uso.

5 Como alternativa, la diferenciación de las CMM se inicia con una etapa de desmetilación que utiliza 5'-azacitidina y continúa en un medio de cultivo específico que se diseñó originalmente para mantener las funciones de los hepatocitos de los hepatocitos humanos primarios en cultivos prolongados sin suero (Runge y col., BBRC, 209: 46 (2000)). Cuando se sigue el protocolo, las CMM presentan características típicas de hepatocitos tras otras 2-3 semanas de cultivo.

10 La presencia de un conducto con lecho vascular funcional en una matriz descelularizada, tal como una matriz de hígado, permite el control de la incorporación del injerto de células madre y la caracterización la función metabólica *in vitro*. Por ejemplo, las células se introducen a través de la recirculación de perfusión de la vena porta en la matriz de hígado. Las células pueden introducirse una o más veces, por ejemplo, con intervalos de 10 minutos entre cada infusión. Pueden determinarse la viabilidad y la distribución de las células en el parénquima. Se determina la eficacia del injertado. Además, la presencia de los conductos biliares en la matriz de hígado descelularizada permite la siembra y el control de la incorporación del injerto de células madre. Después de la siembra, los injertos de hígado recelularizado pueden transferirse a una cámara de perfusión especialmente diseñada para el cultivo *in vitro*. La cámara de perfusión tiene dos láminas de silicio selladas de forma hermética, que forman una bolsa lleno de medio de cultivo; este diseño evita las superficies rígidas lo que previene el desarrollo de puntos de presión; mientras se permite el cultivo estéril de los injertos recelularizados hasta 2 semanas *in vitro*.

Los injertos recelularizados se perfunden de forma continua. La viabilidad celular se mantiene durante el cultivo y puede realizarse una cuantificación de células positivas para TUNEL, por ejemplo, para determinar las células que son apoptóticas. Las características funcionales de las células injertadas en la matriz descelularizada puede evaluarse a través de inmunotinción de la UDP glucuronosiltransferasa, familia 1, polipéptido A1 (Ugt1a), una enzima sensible con una semivida corta (por ejemplo, aproximadamente 50 minutos) cuya presencia indica la viabilidad y función de los hepatocitos, la glucosa-6-fosfatasa, subunidad catalítica (G6pc) y la albúmina. El nivel de inmunotinción para estos marcadores en los hepatocitos injertados es similar al de los hígados normales.

La función de los hepatocitos puede evaluarse mediante detección inmunohistoquímica de las proteínas CYP1A1 y CYP3A4, mediante la tinción con ácido periódico de Schiff (APS) para comprobar la síntesis de glucógeno y mediante la expresión de los marcadores de hepatocitos fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK) y glutamina sintasa (GS) a nivel de proteína, utilizando análisis de transferencia de western.

Para evaluar la actividad metabólica de los hepatocitos injertados, pueden cuantificarse la producción de albúmina y la síntesis de urea de los hepatocitos. El análisis de la expresión de las enzimas del metabolismo de fármacos a través de RT-PCR cuantitativa puede revelar los niveles de expresión de las enzimas del metabolismo de fármacos, por ejemplo, *Cyp2c11* (que codifica el citocromo P450, subfamilia 2, polipéptido 11), *Gstm2* (glutatión S-transferasa mu 2), *Ugt1a1* (que codifica la UDP glucuronosiltransferasa-familia 1, polipéptido A1) y *Cyp1a1* (que codifica el citocromo P450, familia 1, subfamilia a, polipéptido 1) pueden expresarse en el hígado recelularizado a niveles similares que los del hígado normal. También pueden determinarse los niveles de expresión de *Adh1* (que codifica la alcohol deshidrogenasa-1) y *Cyp3a18* (que codifica el citocromo P450, familia 3, subfamilia a, polipéptido 18).

40 Sistema controlado para descelularizar y/o recelularizar un órgano o tejido

Un sistema (por ejemplo, un biorreactor) para descelularizar y/o recelularizar un órgano o tejido en general incluye al menos un dispositivo de canulación para introducir una cánula en un órgano o tejido, un aparato de perfusión para perfundir el órgano o tejido a través de la cánula (o cánulas) y medios (por ejemplo, un sistema de contención) para mantener un entorno estéril para el órgano o tejido. La canulación y la perfusión son técnicas bien conocidas en la materia. Un dispositivo de canulación en general incluye un tubo hueco de tamaño apropiado para la introducción en un vaso, conducto y/o cavidad de un órgano o tejido. Normalmente, en un órgano se introduce una cánula en uno o más vasos, conductos y/o cavidades. Un aparato de perfusión puede incluir un recipiente que contiene el líquido (por ejemplo, un medio de ruptura celular) y un mecanismo para mover el líquido a través del órgano (por ejemplo, una bomba, presión de aire, gravedad) a través de una o más cánulas. La esterilidad de un órgano o tejido durante la descelularización y/o recelularización puede mantenerse utilizando una diversidad de técnicas conocidas en la materia, tales como el control y filtrado del flujo de aire y/o la perfusión con, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos u otros antimicrobianos para prevenir el crecimiento de microorganismos no deseados.

Un sistema para descelularizar y recelularizar órganos o tejidos, como se describe en el presente documento, puede tener la capacidad de controlar determinadas características de perfusión (por ejemplo, presión, volumen, patrón de flujo, temperatura, gases, pH), fuerzas mecánicas (por ejemplo, movimiento y tensión de la pared ventricular) y estimulación eléctrica (por ejemplo, electroestimulación). Dado que el lecho vascular coronario cambia a lo largo del transcurso de la descelularización y recelularización (por ejemplo, resistencia vascular, volumen), para evitar grandes fluctuaciones es ventajoso un aparato de perfusión regulado por presión. La eficacia de la perfusión puede evaluarse en el efluente y en cortes de tejido. El volumen de perfusión, el patrón de flujo, la temperatura, las

presiones parciales de O₂ y CO₂, y el pH pueden controlarse utilizando procedimientos convencionales.

Para controlar el sistema (por ejemplo, un biorreactor) y/o el órgano o tejido pueden utilizarse sensores. Puede utilizarse sonomicrometría, micromanometría y/o mediciones de la conductancia para adquirir información de presión-volumen o de trabajo sistólico reclutable por precarga con respecto al movimiento y funcionamiento de la pared del miocardio. Por ejemplo, pueden utilizarse sensores para controlar la presión de un líquido que se mueve a través de un órgano o tejido en el que se ha introducido una cánula; la temperatura ambiente en el sistema y/o la temperatura del órgano o tejido; el pH y/o el caudal de un líquido que se mueve a través del órgano o tejido en el que se ha introducido una cánula; y/o la actividad biológica de un órgano o tejido de recelularización. Además de tener sensores para controlar tales características, un sistema para descelularizar y/o recelularizar un órgano o tejido también puede incluir medios para mantener o ajustar tales características. Los medios para mantener o ajustar tales características pueden incluir componentes tales como un termómetro, un termostato, electrodos, sensores de presión, válvulas de control de flujo, válvulas de cambio del caudal de un líquido, válvulas para la apertura o cierre de conexiones de líquidos para las soluciones utilizadas para cambiar el pH de una solución, un globo, un marcapasos externo y/o una cámara de ajuste. Para ayudar a asegurar las condiciones estables (por ejemplo, temperatura), las cámaras, depósitos y tubos pueden tener una camisa de agua.

Durante la recelularización puede ser ventajoso colocar una carga mecánica sobre el órgano y las células unidas al mismo. Como ejemplo, para colocar tensión mecánica sobre un corazón puede utilizarse un globo introducido en el ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda. Puede conectarse al globo una bomba de pistón que permite el ajuste del volumen y la velocidad para simular el movimiento y la tensión de la pared de ventrículo izquierdo. Para controlar el movimiento y la tensión de la pared, el movimiento y la presión de la pared del ventrículo izquierdo puede medirse utilizando micromanometría y/o sonomicrometría. En algunas realizaciones, puede conectarse un marcapasos externo a una bomba de pistón para proporcionar estimulación sincronizada con cada deflación del globo ventricular (que es equivalente a la sístole). El ECG periférico puede registrarse a partir de la superficie cardiaca para permitir el ajuste del voltaje de electroestimulación, el control de la des- y repolarización, y para proporcionar un mapa de superficie simplificado de la recelularización o del corazón recelularizado.

La distensión ventricular mecánica también puede conseguirse acoplando una bomba peristáltica a una cánula introducida en el ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda. De forma similar al procedimiento descrito anteriormente que implica un globo, la distensión ventricular conseguida mediante el movimiento de líquidos periódico (por ejemplo, flujo pulsátil) a través de la cánula puede sincronizarse con estimulación eléctrica.

Utilizando los procedimientos y materiales desvelados en el presente documento, un corazón de mamífero puede descelularizarse y recelularizarse y, cuando se mantiene en las condiciones apropiadas, puede generarse un corazón funcional que experimenta función contráctil y responde a estímulos de electroestimulación, y/o a agentes farmacológicos.

Un sistema para generar un órgano o tejido puede controlarse mediante un medio de almacenamiento que se puede leer en un ordenador en combinación con un procesador programable (por ejemplo, un medio de almacenamiento que se puede leer en un ordenador como se utiliza en el presente documento tiene instrucciones almacenadas en él para hacer que un procesador programable realice etapas particulares). Por ejemplo, tal medio de almacenamiento, en combinación con un procesador programable, puede recibir y procesar información procedente de uno o más de los sensores. Tal medio de almacenamiento, junto con un procesador programable, también puede transmitir información e instrucciones de vuelta al biorreactor y/o el órgano o tejido.

Puede controlarse la actividad biológica de un órgano o tejido que experimenta recelularización. La actividad biológica puede ser la del propio órgano o tejido, tal como, para el tejido cardiaco, la actividad eléctrica, la actividad mecánica, la presión mecánica, la contractilidad y/o la tensión de la pared del órgano o tejido. Además, puede controlarse la actividad biológica de las células unidas al órgano o tejido, por ejemplo, la actividad de transporte/intercambio iónico, la división celular y/o la viabilidad celular. Véase, por ejemplo, Laboratory Textbook of Anatomy and Physiology (2001, Wood, Prentice Hall) y Current Protocols in Cell Biology (2001, Bonifacino y col., Eds, John Wiley & Sons). Como se discute anteriormente, puede ser útil estimular una carga activa sobre un órgano durante la recelularización. Puede utilizarse un medio de almacenamiento que se puede leer en un ordenador de la invención en combinación con un procesador programable, para coordinar los componentes necesarios para controlar y mantener una carga activa en un órgano o tejido.

En una realización, puede introducirse el peso de un órgano o tejido en un medio de almacenamiento que se puede leer en un ordenador como se describe en el presente documento que, en combinación con un procesador programable, puede calcular los tiempos de exposición y las presiones de perfusión para ese órgano o tejido particular. Tal medio de almacenamiento puede registrar la precarga y poscarga (la presión antes y después de la perfusión, respectivamente) y el caudal. En la presente realización, por ejemplo, un medio de almacenamiento que se puede leer en un ordenador en combinación con un proceso programable puede ajustar la presión de perfusión, la dirección de perfusión y/o el tipo de solución de perfusión a través de una o más bombas y/o controles de válvula.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el ámbito de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1Comparación de la perfusión frente a la inmersión

La Figura 1A muestra una fotografía de un hígado porcino que descelularizó por perfusión, y las Figuras 1B y 1C muestran una MEB de un vaso y la matriz parenquimatosa, respectivamente, del hígado porcino descelularizado por perfusión. Estas fotografías muestran los conductos vasculares y la integridad de la matriz de un órgano descelularizado por perfusión. Por otro lado, la Figura 2 muestra una vista general de un hígado de rata descelularizado por inmersión, en que puede observarse el deshilachamiento de la matriz tanto a un aumento bajo (izquierda) como alto (derecha).

La figura 3 muestra una MEB de un hígado de rata descelularizado por inmersión (A y B) y de un hígado de rata descelularizado por perfusión (C y D). Estos resultados indican claramente que la descelularización por inmersión compromete de forma significativa la cápsula del órgano (cápsula de Glisson), mientras que la descelularización por perfusión retuvo la cápsula. Además, la Figura 4 muestra la histología de un hígado descelularizado por inmersión (A, tinción con HyE; B, tinción Tricrómica) y de un hígado descelularizado por perfusión (C, tinción con HyE; D, tinción por Tricrómica). El hígado de rata descelularizado por inmersión no conservó células o colorante tras la inyección.

La Figura 5 muestra una comparación entre la descelularización por inmersión (fila de la parte superior) y la descelularización por perfusión (fila de la parte inferior) de un corazón de rata. Las fotografías en la columna de la izquierda muestran el órgano entero. Como puede observarse en las dos fotografías, el órgano descelularizado por perfusión (parte inferior izquierda) es mucho más translúcido que el órgano descelularizado por inmersión (parte superior izquierda), el cual conserva el color "marrón-rojizo" rico en hierro del tejido muscular cadavérico y parece contener todavía células. Las fotografías en la columna intermedia muestran el patrón de tinción con HyE de los tejidos descelularizados. La tinción demuestra que después de la descelularización por inmersión quedan varias células, tanto dentro del parénquima como en las paredes de la vasculatura (parte superior intermedia), mientras que se han eliminado prácticamente todas las células y también los restos celulares después de la descelularización por perfusión (parte inferior intermedia), aun cuando son evidentes aparentes conductos vasculares. Además, las micrografías electrónicas de barrido en la columna derecha muestran que en la ultraestructura de la matriz existe una diferencia significativa después de la descelularización por inmersión (parte superior derecha) frente a la de por perfusión (parte inferior derecha). Otra vez, en toda la sección transversal del miocardio se observó en todas las paredes del corazón descelularizado por inmersión la conservación completa de los componentes celulares, pero se observó una pérdida casi completa de estos componentes celulares en el corazón descelularizado por perfusión junto con la conservación de las características espaciales y arquitectónicas del miocardio intacto incluyendo los conductos vasculares. Por ejemplo, la matriz descelularizada por perfusión conservó las características arquitectónicas dentro de la matriz incluyendo las tramas (t), las espirales (e) y las trabéculas (t) a pesar de la pérdida completa de células.

La Figura 6 muestra las mismas comparaciones (descelularización por inmersión (fila de parte superior) frente a descelularización por perfusión (fila de la parte inferior) utilizando riñón de rata. A diferencia del corazón, el riñón entero descelularizado por inmersión (parte superior izquierda) parece a grandes rasgos similar al riñón entero descelularizado por perfusión (parte inferior izquierda) en que ambos son bastante translúcidos. Sin embargo, en el riñón descelularizado por perfusión la red de conductos vasculares dentro del órganos descelularizado por perfusión es más obvia y puede visualizarse un mayor grado de ramificación que en la construcción descelularizada por inmersión. Además, el riñón descelularizado por perfusión conserva la cápsula del órgano intacta, está rodeado de mesenterio y, como se muestra, puede descelularizarse junto con la glándula suprarrenal unida. Las fotografías de la columna central muestran el patrón de tinción con HyE de los dos tejidos. La tinción muestra que después de la descelularización por inmersión quedan los componentes y/o los restos celulares, y posiblemente incluso los núcleos intactos (tinción morada) (parte superior central), mientras que después de la descelularización por perfusión (parte inferior central) se han eliminado prácticamente todas las células y/o todos los restos celulares. Asimismo, las fotografías de MEB demuestran que la matriz de riñón descelularizado por inmersión (parte superior derecha) experimentó mucho más daño que la matriz de riñón descelularizada por perfusión (parte inferior derecha). En el riñón descelularizado por inmersión la cápsula del órgano se pierde o daña de forma que los "agujeros" de la superficie o el deshilachamiento de la matriz son obvios, mientras que en el órgano descelularizado por perfusión la cápsula está intacta.

La Figura 7 muestra fotografías de MEB de un riñón descelularizado. La Figura 7A muestra un riñón descelularizado por perfusión, mientras que la Figura 7B muestra un riñón descelularizado por inmersión. La Figura 8A muestra una fotografía de MEB de un corazón descelularizado por perfusión, mientras que la Figura 8B muestra una fotografía de MEB de un corazón descelularizado por inmersión. Estas imágenes demuestran adicionalmente el daño que provocó la descelularización por inmersión a la ultra-estructura del órgano y la viabilidad de la matriz después de la descelularización por perfusión.

Ejemplo 2

Antes de la recelularización de la MEC o durante el cultivo en la MEC, el fenotipo cardíaco puede evaluarse utilizando los siguientes marcadores: c-MHC, c-TNT, formación de sarcómeros y organización miofibrilar, así como las contracciones espontáneas. Durante la inducción de la diferenciación puede controlarse el curso temporal de los niveles de ARNm de los genes específicos cardíacos. Pueden seguirse los genes que codifican un factor de transcripción específico cardíaco, Nkx2.5, una proteína de estructura cardíaca, la cadena pesada de la α -miosina (α -MHC) y una hormona peptídica específica cardíaca, el factor auricular natriurético (FAN).

Además, pueden evaluarse los potenciales eléctricos de las células por el latido espontáneo de las células que muestran potenciales de campo extracelulares, y la frecuencia y la temporización del latido. Para evaluar de forma cuantitativa la cantidad de cardiomiocitos en la población total, pueden realizarse análisis de FACS intracelular utilizando un anticuerpo anti c-MHC. También puede realizarse un análisis de FACS intracelular con un anticuerpo frente a la troponina T cardíaca (c-TNT), una proteína específica para células del músculo cardíaco. Otros marcadores que pueden detectarse son el factor de transcripción de dedos de cinc, GATA4, un marcador de mesodermo lateral, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) 2 (Flk-1), su ligando, VEGF, una histona acetiltransferasa intrínseca, p300, un miembro de HDAC de clase II, HDAC4 y un marcador de células madre, Oc3/4.

Los armazones recelularizados (por ejemplo, con 50×10^6 células parcialmente comprometidas, opcionalmente en combinación con fibrocitos, células endoteliales y/o células de músculo liso) pueden montarse en un biorreactor perfundible, por ejemplo uno que simula la fisiología cardíaca incluyendo la distensión pulsátil del ventrículo izquierdo con aumento gradual de la precarga y poscarga, flujo coronario pulsátil y estimulación eléctrica en condiciones de cultivo de tejido cardíaco estériles (CO_2 al 5 %, H_2O al 60 %, 37 °C). El cultivo del órgano perfundido se mantiene durante una a cuatro semanas. Las presiones, los flujos y ECG pueden registrarse durante 30 segundos cada 15 minutos durante todo el periodo de cultivo.

En puntos temporales posteriores puede realizarse una valoración funcional con más profundidad, incluyendo la inserción de una sonda de presión en el ventrículo izquierdo para registrar la presión ventricular izquierda (PVI) a medida que la frecuencia de estimulación se aumenta de forma gradual de 0,1 Hz a 10 Hz y se realiza una estimulación farmacológica con fenilefrina (FE). El corazón recelularizado puede mostrar una respuesta contráctil a electroestimulaciones individuales, con contracciones espontáneas después de las contracciones electroestimuladas con los correspondientes aumentos en la PVI. De forma similar a las contracciones estimuladas, las despolarizaciones espontáneas provocan un correspondiente aumento en la PVI y un complejo QRS registrable que posiblemente indica la formación de un patrón de conducción estable en desarrollo.

Ejemplo 3

Un uso para una matriz recelularizada de la invención es la exploración de fármacos. Por ejemplo, para conseguir un sistema de análisis farmacéutico para el metabolismo y la toxicidad de fármacos, pueden sembrarse hepatocitos humanos en una matriz de hígado descelularizado por perfusión. Si se desea la construcción también puede sembrarse con células endoteliales sinusoides. Después, la construcción hepática puede perfundirse en condiciones fisiológicas normales con medios de cultivo celular diseñados para mantener hepatocitos funcionales tal como, pero sin limitación, Medio E de Williams. Las construcciones hepáticas se exponen después a diversos fármacos durante un periodo especificado de tiempo. Después se ensayan diversas funciones hepáticas de las construcciones incluyendo albúmina, urea, G6PDH y diversas funciones CYP incluyendo CYP1A2, CYP3A4, etc., para determinar el efecto global sobre la construcción de hígado y proporcionar información metabólica y de toxicidad. Pueden realizarse estudios similares utilizando otros órganos incluyendo, pero sin limitación, construcciones humanas sembradas para corazón y riñón, para examinar la toxicidad de fármacos específicos de órgano.

Ejemplo 4

Otro uso para una matriz recelularizada es proporcionar una fuente de células de un determinado tipo, por ejemplo, células diferenciadas o células funcionalmente maduras. En una realización, las células iPS o EM cardíacas parcialmente diferenciadas se cultivan durante un tiempo en una matriz cardíaca descelularizada por perfusión (armazón de MEC), por ejemplo, aproximadamente 2 a aproximadamente 80 días, y en condiciones para producir células cardíacas, por ejemplo, una población sustancialmente pura tal como una que tenga más de aproximadamente el 50 % de cardiomiocitos auriculares cuando se cultiva en una MEC cardíaca auricular, más de aproximadamente el 50 % de cardiomiocitos ventriculares cuando se cultiva en una MEC ventricular y/o más de aproximadamente el 50 % de cardiomiocitos nodulares cuando se cultiva en una MEC nodular, cuyos cardiomiocitos se identifican por sus formas del potencial de acción funcionales y/o las duraciones del potencial de acción, por ejemplo, un potencial de acción auricular que presenta potenciales de acción de tipo triángulo típicos en comparación con la meseta prominente que presentan los cardiomiocitos ventriculares. Esta clasificación es a base de las propiedades del potencial de acción medido por la velocidad máxima de elevación del potencial de acción ($dV/dt_{\text{máx}}$), la duración del potencial de acción (DPA), la amplitud de potencial de acción (APA) y la importancia de la despolarización de fase 4. Los potenciales de acción de tipo nodular se caracterizaron por la prominente despolarización de fase 4, una velocidad máxima de despolarización lenta ($dV/dt_{\text{máx}}$) y una APA más pequeña. Los

- potenciales de acción ventriculares pueden distinguirse por la presencia de una fase de meseta del potencial de acción significativa que da como resultado una duración significativamente más larga en comparación con los potenciales de acción embrionarios-auriculares de forma más triangular. Estas propiedades electrofisiológicas son bastante distintas del músculo cardiaco neonatal y de adulto. En particular, los potenciales de acción embrionarios se caracterizan por potenciales diastólicos máximos (PDM) más despolarizados y potenciales de acción de tipo "lento" basados en una $dV/dt_{\text{máx}}$ baja (aproximadamente 5 a aproximadamente 30 V/s). Estas células se aíslan después a partir de la construcción a través de la digestión de la matriz con mezclas de enzimas digestivas de matriz que contienen colagenasas, ya sea perfundidas a través del corazón o cortando el corazón y colocando las porciones resultantes en cultivo durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas.
- 5
- 10 En una realización, se siembran hepatocitos parcialmente diferenciados a bajas cantidades y se cultivan en un armazón de hígado descelularizado por perfusión durante un tiempo, por ejemplo, aproximadamente 2 a aproximadamente 80 días, y en condiciones para producir la expansión de hepatocitos seguido de una maduración funcional una vez que estén confluentes, según se define mediante marcadores que incluyen por ejemplo, pero sin limitación, la expresión de albúmina y urea. Después, los hepatocitos funcionales se aíslan de la construcción hepática a través de la digestión de la matriz con diversas enzimas digestivas de matriz tales como colagenasas, ya sea a través de perfusión o de cultivo estático durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas.
- 15
- 20 Mientras que en la anterior memoria descriptiva la presente invención se ha descrito con relación a determinadas realizaciones preferentes de la misma, y muchos detalles se han expuesto con fines ilustrativos, será obvio para los expertos en la materia que la invención es susceptible de realizaciones adicionales y que determinados detalles del presente documento pueden variarse de forma considerable sin apartarse de los principios básicos de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un sistema de cultivo celular 3D *in vitro* a base de perfusión, que comprende:
 - 5 seleccionar una matriz de un hígado o páncreas descelularizada por perfusión que tenga una red vascular intacta y una población de células madre que tengan la capacidad de diferenciarse en un tipo celular presente en un hígado o páncreas nativo; y
 - 10 perfundir la población de células en la matriz descelularizada por perfusión en condiciones que permitan la siembra de la matriz descelularizada por perfusión y la diferenciación y maduración funcional de las células madre en la población a tipos celulares presentes en el hígado o el páncreas antes de la descelularización, en el que las condiciones también incluyen perfundir la matriz con medio que contenga activadores o inhibidores de las rutas de diferenciación, seleccionados para proporcionar la diferenciación específica de células hepáticas o de células pancreáticas.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la matriz es una matriz de hígado.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las células son células iPS.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la matriz es una matriz de páncreas.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que las células tienen la capacidad de diferenciarse en hepatocitos funcionales y opcionalmente expresan albúmina, expresan HepPar1 y/o depositan glucógeno, u opcionalmente liberan albúmina y urea.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que las células tienen la capacidad de diferenciarse en células beta funcionales y opcionalmente liberan insulina en respuesta a la estimulación con glucosa.
- 20 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la población comprende una pluralidad de distintos tipos celulares.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células y el órgano o tejido descelularizado por perfusión son alogénicos o xenogénicos.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que las células y el órgano o tejido descelularizado por perfusión son xenogénicos, y en el que la matriz extracelular de hígado se obtiene de un animal pequeño, por ejemplo, un mamífero no humano.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio que contiene activadores o inhibidores incluye uno o más de Activina A, bFGF, ácido retinoico (AR), Wnt3A, KGF, KAAD-cicloplamina, Nogina o nicotinamida, para la diferenciación y la maduración funcional pancreáticas.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio que contiene activadores o inhibidores incluye uno o más de Activina A, BMP, FGF, dexametasona, IL6, HGF, Oncostatina M o EGF, para la diferenciación y la maduración funcional hepáticas.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células se siembran en el espacio intersticial o la matriz, fuera de los conductos vasculares.

35

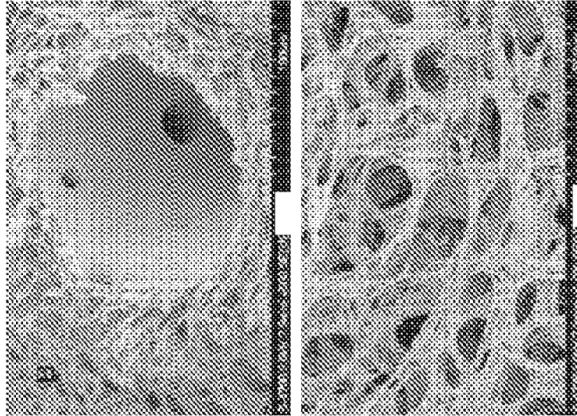


Fig. 1



Fig. 2

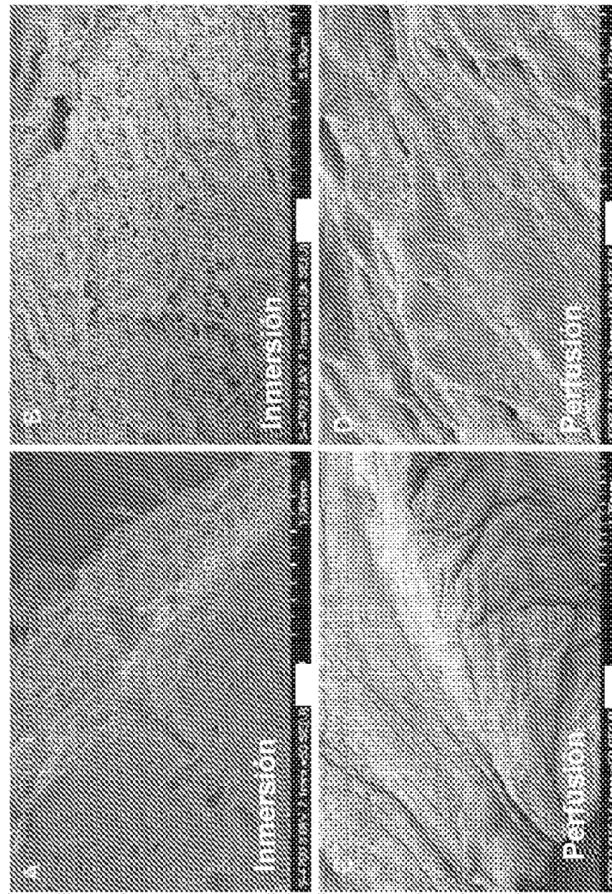


Fig. 3

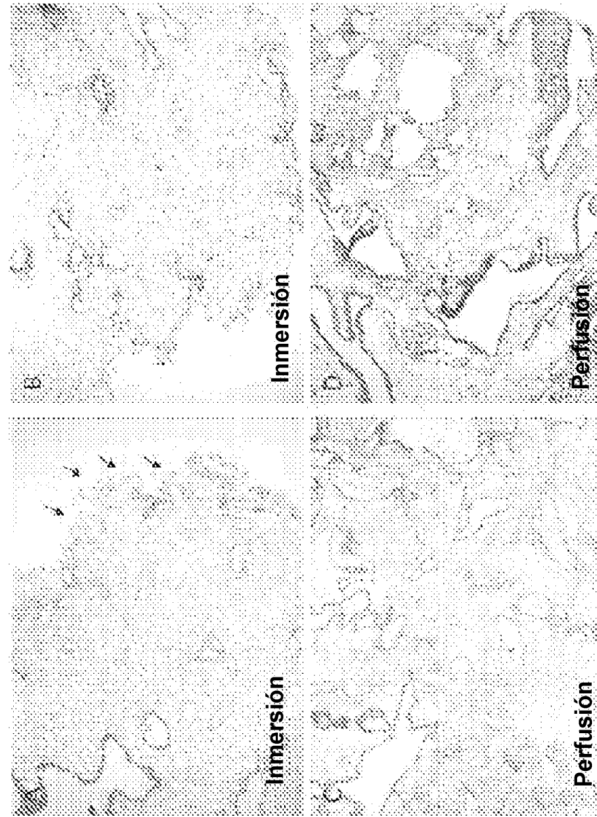


Fig. 4

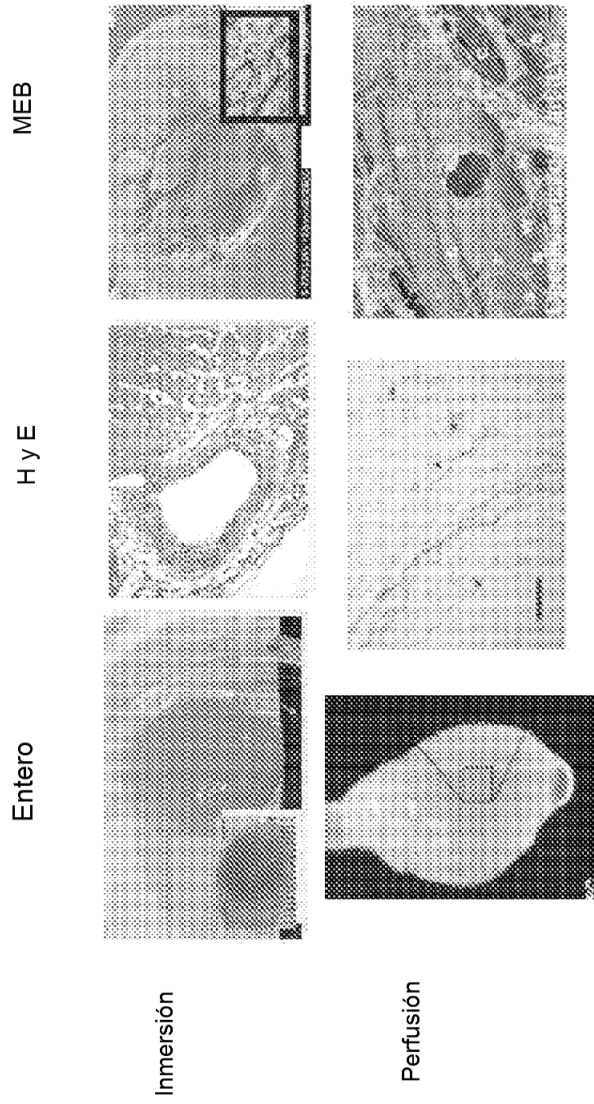


Fig. 5

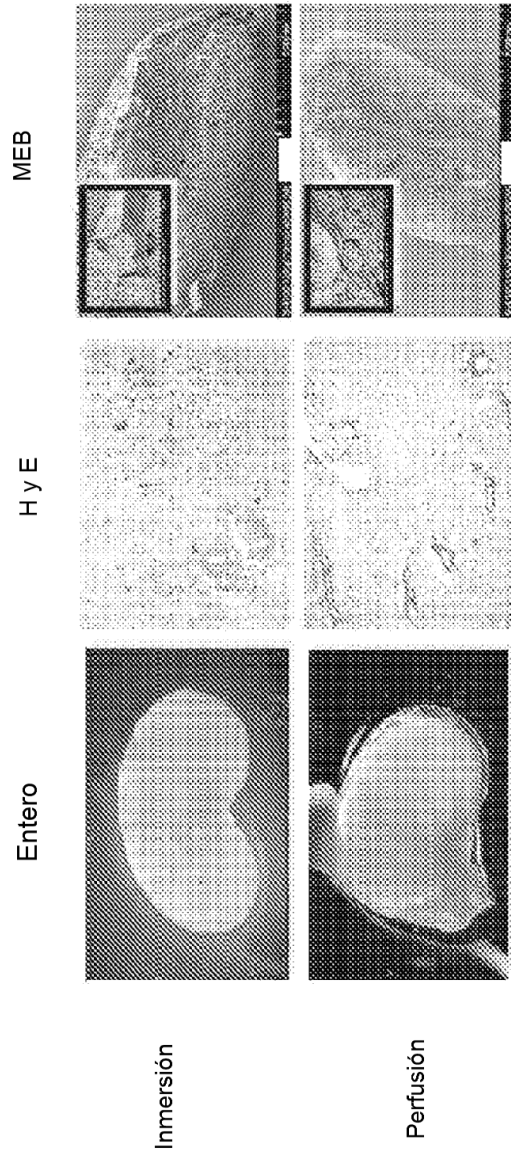


Fig. 6

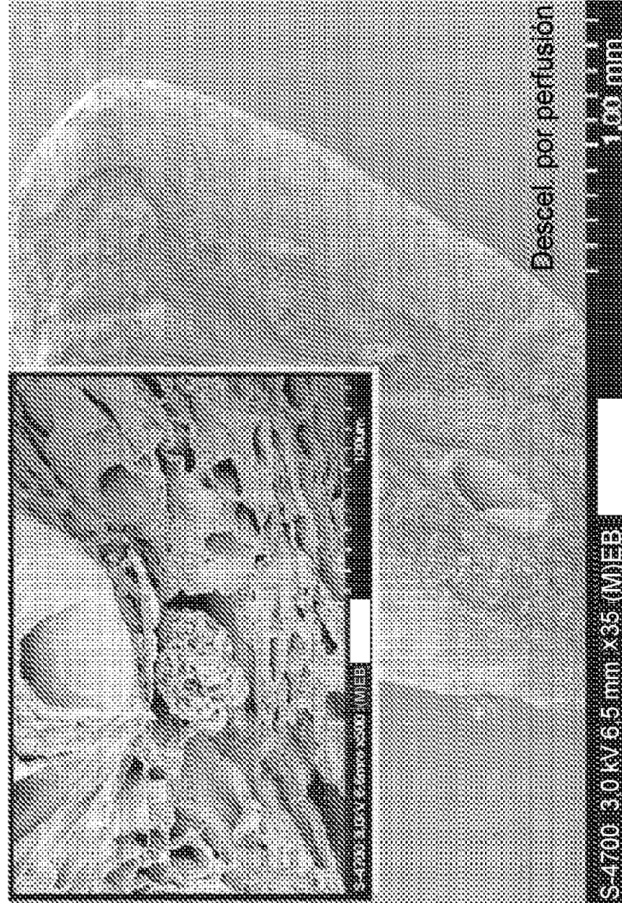


Fig. 7A



Fig. 7B



Fig. 8A

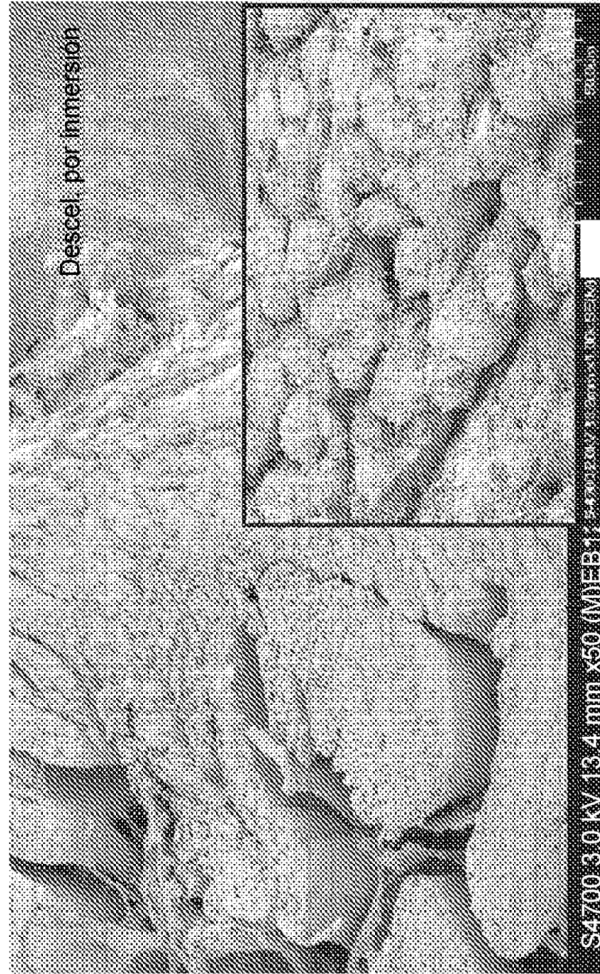


Fig. 8B