



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0620049-4 A2**

(22) Data de Depósito: 14/12/2006  
(43) Data da Publicação: 01/11/2011  
(RPI 2130)



(51) *Int.Cl.:*  
C12N 5/074

(54) **Título:** CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DO FÍGADO

(30) **Prioridade Unionista:** 21/12/2005 BE 05447286.5, 17/10/2006 BE PCT/EP2006/1001, 17/10/2006 BE PCT/EP2006/1001

(73) **Titular(es):** Universite Catholique de Louvain

(72) **Inventor(es):** Etienne Sokal, Mustapha Najimi

(74) **Procurador(es):** Veirano e Advogados Associados

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006012046 de 14/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/071339 de 28/06/2007

(57) **Resumo:** CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DO FIGADO A presente invenção diz respeito às células-tronco progenitoras isoladas do fígado, e população celular destas, onde a dita célula-tronco progenitoras são originárias de um fígado adulto, sobretudo de um ser humano. A presente invenção também se relaciona à utilização das ditas células-tronco progenitoras isoladas em remédios, hepatologia, erros inatos do metabolismo hepático, transplantes, doenças infecciosas, insuficiência hepática. A presente invenção também se relaciona aos métodos de isolamento destas células, sua cultura, a caracterização antes e depois da diferenciação, e seu uso em transplantes, modelos animais de doenças humanas, toxicologias e farmacologias.



PI0620049-4

## CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DO FÍGADO

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere às células-tronco progenitoras isoladas do fígado, originárias de um fígado  
5 adulto, e a seu uso das ditas células-tronco progenitoras isoladas em remédios, hepatologia, erros inatos do metabolismo hepático, transplante, doenças infecciosas, insuficiência hepática. A presente invenção também se relaciona aos métodos de isolamento destas células, sua  
10 cultura, e características antes e depois da diferenciação, e seu uso em transplante, modelos animais de doenças humanas, toxicologia e farmacologia.

### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O fígado é um órgão chave que realiza muitas funções  
15 vitais, como a homeostase da glicose, desintoxicação dos xenobióticos ou síntese de macromoléculas. Assim, uma falha de uma das múltiplas funções do fígado poderá causar um impacto dramático na saúde. A incidência mundial do conjunto de doenças do fígado aguda ou crônica está entre a  
20 5ª e 9ª causa de morte, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Até agora, o único tratamento curativo para a fase final de doença hepática continua sendo o transplante de fígado. Os resultados para os pacientes que passaram por cirurgia para substituição do fígado são bastante  
25 razoáveis, com mais de 95% de recuperação. No entanto,

apesar de novas técnicas cirúrgicas, incluindo a doação do fígado e a vida relacionada ao doador, a crescente escassez do órgão leva a uma alta mortalidade na lista de espera. Por conseguinte, um importante objetivo na pesquisa médica de transplante é a demonstração do potencial de uso de células do fígado na regeneração do fígado e tratamento de doenças hepáticas.

O transplante de células do fígado (TCF) é um processo emergente, envolvendo a infusão de células do fígado suspensão no sistema portal do receptor. Este se destina à recuperação da função do fígado do receptor, como uma consequência do enxerto e repovoamento de parênquima doentes. O TCF foi pela primeira vez validado em modelos animais onde hepatócitos singênicos têm mostrado sobreviver indefinidamente e ser capaz de corrigir vários defeitos enzimáticos (para revisão, ver Najimi and Sokal. 2005. *Minerva Pediatr* 57 (5): 243-57).

Em humanos, os primeiros estudos foram concebidos para o tratamento de insuficiência hepática aguda. Estes estudos clínicos levaram a aumentar ainda mais a indicações do TCF e, até agora, pelo menos, trinta casos foram relatados pelo mundo a fora por ter vários defeitos (Strom et al. 1997. *Transplant Proc* 29(4): 2103-6). No campo específico de doenças metabólicas, treze casos foram relatados usando hepatócitos, para o tratamento da, entre

outros, síndrome de Crigler-Najjar tipo I, defeitos do ciclo da uréia ou as doenças raras, como, por exemplo, doença de Refsum infantil. Estes estudos demonstraram o enxerto de hepatócitos dentro do parênquima e, 5 consequentemente, uma melhoria do estado do paciente até 18 meses pós-transplante.

No entanto, devido ao fornecimento hepatócitos humanos maduros para transplantes ainda ser limitado, de fato, mais ou menos tão limitado quanto à disponibilidade 10 de todo fígado, a pesquisa também visa obter células transplantadas a partir de outras fontes, tais como células-tronco e progenitoras, por exemplo, origem embrionária ou adulta, que poderia ser expansível, por exemplo, *in vitro*, e capazes de se diferenciarem em 15 hepatócitos maduros funcionais, esp. *in vivo* após o transplante. Assim, existe uma grande necessidade de desenvolver novos meios úteis no tratamento de várias doenças ou condições associadas com doenças associadas ao fígado, principalmente dada à insuficiência dos tratamentos 20 atualmente disponíveis para a maioria dessas doenças.

Historicamente, células-tronco embrionárias (TE) foram pensadas para serem envolvidas apenas na organogênese, devido à sua observada divisão clonal ilimitada e diferenciação dos pluripotentes em células 25 derivadas de tecidos inteiros. Por outro lado, nos

processos de regeneração dos órgãos adultos foi tipicamente atribuída às células progenitoras adultas. No entanto, esta teoria foi revista, tendo em vista a descoberta de células-tronco em órgãos adultos que expressa marcadores embrionários conhecido. Por conseguinte, características de células-tronco e progenitoras são agora baseadas não só no processo de desenvolvimento (embrionário versus adulto), mas também com a presença de marcadores celulares específicos neste. Com efeito, expressão de marcadores celulares, tais como a proteínas de membrana ou fatores de transcrição, podem variar ao longo da diferenciação de percursos diferentes e os vários estímulos refletidos (por exemplo, estímulos ambientais) e necessidades celulares. Freqüentemente, é observado no decurso de um processo de diferenciação, que uma célula-tronco irá gradualmente deixa de exibir seus marcadores indicativos de pluripotencia, por exemplo, Oct-4, e sendo para expressar marcadores atribuíveis aos estágios posteriores, por exemplo, marcadores de uma linhagem específica. Como um exemplo não limitativo, Oct-4 pode ser progressivamente perdidos através maturação e, por outro lado, as células que entram na linhagem endodermal podem começar a expressar a alfa-fetoproteína.

No que diz respeito à regeneração do fígado através do transplante celular, vários tipos de fonte de células podem

ser considerados. Por exemplo, se espera que células ES possam ser capazes de regenerar em qualquer órgão, devido à sua pluripotencia. De fato, isto é amplamente explorado na arte. No entanto, células ES são propensas a gerar crescimento tumoral quando introduzidas em qualquer outro tecido do que *in utero*. Portanto, seu uso *in vivo* continua limitado pelo risco de desvio cancerígeno. Mesmo antes do sucesso *in vitro* a diferenciação de células ES pode não ser segura o suficiente para considerar a inoculação humana.

10 Uma alternativa segura poderia ser o uso de células progenitoras adultas que, ao contrário de células ES, tendem a mostrar capacidade limitada para a divisão clonal sua diferenciação dá origem às células filhas com destinos mais limitados. No fígado, progenitoras adultas, tal como 15 células ovais (precursores hepatócitos e colangiócitos) ou pequenas células semelhantes a hepatócitos têm sido descritas. No entanto, seu uso médico tem se tornado difícil pela sua escassez em órgãos adultos normais.

Por conseguinte, as células-tronco adultas mostrariam 20 a capacidade de divisão clonal sem risco ou com pouco risco de desvios cancerígenos representaria uma grande melhoria no transplante de células fontes. Vários tipos de células-tronco adultas estão sendo atualmente avaliados em estudos transplante de células do fígado. Por exemplo, as células-tronco mesenquimais (MSC) do sangue do cordão umbilical ou 25

periférico vêm sendo estudadas devido a sua capacidade de transdiferenciarem em células mais maduras de outra linhagem. Além disso, as células-tronco hematopoiéticas da medula foram também estudadas em termos de potências de regeneração do fígado.

Embora, a caracterização *in vitro* de células-tronco adultas ainda apresenta dificuldades, é atualmente aceita no campo que tal essa caracterização pode vantajosamente envolver detecção (i) marcadores da sua origem embrionária ou linhagem (esp., mesodermal, endodermal, ectodérmico ou hematopoiético), (ii) expressão de marcadores que refletem o nível de diferenciação e, portanto, de certo modo preditivo dos diferentes progênies possível e, (iii) destino *in vitro* ou *in vivo* após a diferenciação. Por conseguinte, a caracterização e distintividade de células-tronco adultas obtidas a partir de um fígado normal pode vantajosamente envolver avaliação da presença ou ausência do(s) (i) marcador(es) que reflitam na complexa origem embrionária deste órgão, (ii) marcador (es) de diferenciação (por exemplo: presença de albumina) e, (iii) pelo menos um marcador indicativo de células-tronco de destino.

De acordo com os conhecimentos atuais, o fígado provém principalmente da endoderme e hepatócitos que são partes da linhagem endodermal. No entanto, a formação das

células hepáticas também envolve a interação entre o epitélio endodermal e a mesoderme cardiogênica. Além disso, no desenvolvimento fetal hematopoiese também ocorre no fígado. Tendo em conta esta interação durante o desenvolvimento, é necessário ter uma mente aberta quando se contempla com marcadores presentes de células-tronco do fígado adulto, uma vez que marcadores endodermal, mesodermal e/ou linhagens hematopoiéticas é que poderiam ser previstos.

10 Ao avaliar os diferentes níveis e células tipo comprometida, vários marcadores de células podem ser avaliados, tal como será realizado ainda nesta divulgação. Por exemplo, durante o processo da diferenciação células alguns marcadores podem diminuir ou desaparecer, outros 15 podem aumentar ou podem ser adquiridos, e ainda outros podem ser mantidos em todas as formas de uma célula especializada e funcional. Por meio de exemplo não limitativo, durante a organogênese, ou seja, durante a vida fetal, hepatoblastos são considerados progenitores comum de 20 células que formam parênquima (esp. hepatócitos e células biliar), e, expressa *inter alia* citoqueratina-7 (CK-7) bem como CK-19, albumina e  $\alpha$ -fetoproteína. Em fígados adultos, um conhecido progenitor comum de hepatócitos e células biliares é a célula oval, que expressa CK-19, albumina e  $\alpha$ - 25 fetoproteína. Depois da diferenciação em células biliares,

expressão de CK-19 e  $\alpha$ -fetoproteína é mantida enquanto a expressão de CK-7 (considerada uma característica de células mais imaturas) tende a cessar. Por outro lado, os hepatócitos mantêm expressão de  $\alpha$ -fetoproteína e albumina, mas não mostram a expressão de CK acima. Também a partir deste exemplo, segue-se que a caracterização das células-tronco pode ser complexa, mas que a avaliação dos marcadores, que podem ser utilizadas para indicar a vantagem do tipo ou propriedade das células.

10 Para conhecimentos dos inventores, estudos prévios descreveram o isolamento de células progenitoras de fígado normal adulto, que demonstraram mais de uma célula de destino. Uma linhagem de células-tronco fígado adulto capaz de amplificação *in vitro* e diferenciação *in vivo* em hepatócitos e, preferencialmente, apenas com as células hepatócitas de destino não tem sido descrita. Além disso, estudos anteriores utilizam técnicas complicadas, como FACS, meio de cálcio-implementado ou gradientes de densidades específicas para isolar suas células-tronco do fígado.

Deste modo, é um objeto da invenção prover um novo progenitor derivado do fígado ou células-tronco com propriedades melhoradas, e particularmente útil em, por exemplo, transplante de células do fígado. A invenção também estabelece proporcionar um método simples para

isolar as ditas células.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção provê progenitor do fígado adulto ou  
5 células-tronco, linhagens de células a este, ou populações  
celulares que compreende as mesmas populações, obtidas a  
partir de um tecido hepático normal. Métodos de isolar  
estas células, sua cultura, a caracterização antes e depois  
da diferenciação, e seu uso para fins de transplante,  
10 modelos animais de doenças humanas, toxicologia e  
farmacologia também estão dentro da invenção.

Em um aspecto, a presente invenção realiza uma nova  
célula-tronco ou progenitor isolado de (um vertebrado,  
preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente ainda uma  
15 célula humana), originado a partir do fígado adulto,  
caracterizada, na medida em que co-expressa (ou seja, é  
positiva para), pelo menos, um marcador mesenquimal, esp.  
um, mais de um, por exemplo, 2, 3 ou 4, ou todos os  
marcadores CD90, CD44, CD73, vimentina e  $\alpha$ -actina de  
20 músculo liso (ASMA), com o marcador hepatócito de albumina  
(ALB) e, possivelmente com um ou mais outros marcadores  
hepatócitos ou hepáticos, preferivelmente um, mais de um,  
ou todos os CD29, alfa-fetoproteína (AFP), alfa-1-  
antitripsina e/ou transportador MRP2. Os ditos progenitores  
25 do fígado adulto ou células-tronco podem ainda expressar

um, mais de um, ou todas as seguintes todas as moléculas a seguir indicativas de funções ou propriedades semelhantes dos hepatócitos: G6P, CYP1B1, CYP3A4, HNF-4, TDO, TAT, GS, GGT, CK8, EAAT2. O dito progenitor do fígado ou células-tronco podem ainda ser caracterizado por um, mais de um, ou todos os seguintes: negativas para pelo menos os marcadores hematopoiéticos CD45 e CD34 e também, eventualmente, para uma ou vários outros marcadores hematopoiéticos, tais como, por exemplo, CD105, HLA-DR, negativa para o marcador epitelial colangiólite citoqueratina-19 (CK-19) e, eventualmente, para mais marcadores epiteliais; negativas para pelo menos os marcadores de células-tronco indiferenciadas CD117 e Oct-4, e possivelmente também para um ou mais do que um marcador de células-tronco embrionárias; expressão de baixo nível de AFP. Preferencialmente, a dito célula-tronco ou progenitora do fígado podem ter morfologia similares a mesenquimal, em especial envolvendo um, mais de um ou todo o crescimento em monocamadas de forma achatada, citoplasma amplo e/ou núcleos ovóides com um ou dois nucléolos.

Em uma modalidade, Particularmente a presente invenção prevê uma célula-tronco isolada originada do fígado adulto, que é CD90, CD29 e CD44 positivo que é albumina positiva, vimentina-positivas e alfa-actina positiva de músculo liso. Em uma modalidade, o isolamento

de células-tronco é também CK-19 negativos, CD45 negativo, CD34 negativos e CD117 negativos. A presente invenção proporciona também uma população celular que compreende células-tronco progenitoras mesenquimais com pelo menos

5 três das seguintes características: expressão de anticorpos detectáveis de albumina; expressão de anticorpos detectáveis de vimentina; expressão de anticorpos detectáveis de alfa actina de músculo liso; ausência de CK-19; ausência de CD45, ausência do marcador CD45, ausência

10 de marcadores CD34, ausência de marcador CD117, provas de marcador CD90; provas do marcador CD29, ou provas do marcador CD44. Preferencialmente as células possuem todas as características acima. Em uma modalidade preferida, as células-tronco são células-tronco do fígado humano.

15 Em uma modalidade, o isolamento das células-tronco fígado adulto é originado de CD90, CD73, CD29 e CD44 positivo e albumina positiva, vimentina positiva e alfa-actina positiva de músculo liso.

A invenção fornece também um método para a obtenção

20 progenitor isolado ou célula-tronco ou uma população celular que compreende o dito progenitor ou célula-tronco, o método compreendendo: (a) dissociar o fígado adulto ou de parte deste para formar uma população celular primárias a partir do dito fígado adulto ou parte deste, (b) plaquear a

25 população celular primária sobre um substrato que permite a

aderência das células a este, e (c) cultivar as células da população primária, que aderem ao dito substrato, por pelo menos 7 dias, preferivelmente por pelo menos 10, preferivelmente ainda por pelo menos 13 ou mais preferivelmente ainda por pelo menos 15 dias.

A invenção fornece também um método para a obtenção de células-tronco isolada do fígado ou a população do mesmo de acordo com a invenção compreendendo as etapas de cultivar células do fígado adulto, isolar hepatócitos das mesmas, plaquear os hepatócitos e cultivar os ditos hepatócitos por pelo menos 7 dias, preferivelmente por pelo menos 10, preferivelmente ainda por pelo menos 13 ou mais preferivelmente ainda por pelo menos 15 dias.

Em ainda um outro aspecto, a invenção fornece um progenitor isolado do fígado adulto ou célula-tronco, linhagem celular destas e/ou de uma população celular que compreende tal, podem ser obtidas por ou diretamente obtidas utilizando os métodos da invenção.

Em um outro aspecto, os presentes inventores têm estabelecido uma determinada população celular (linhagem celular) do células-tronco ou progenitoras do fígado humano de acordo com a invenção e depositada em 20 de fevereiro de 2006 a dita linhagem celular isolada no abrigo do Tratado de Budapeste com o Consórcio belga de coleções coordenadas de microrganismos (BCCM / LMBP), sob o número de acesso

LMBP 6452CB (dada pela Autoridade Internacional depositária; identificação referência dada pelo depositante: ADHLSC). Assim, a presente invenção relata uma célula isolada, linhagem celular e população celular depositadas junto ao BCCM sob número de acesso LMBP 6452CB (aqui, linhagem celular "LMBP 6452CB"), sublinhagem destas inclui sublinhagem clonal, e a sua descendência, incluindo a descendência diferenciada destas, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos preparadas a partir delas, e modificadas geneticamente ou de outra forma os seus derivados.

A presente invenção proporciona também uma composição que compreende o progenitor isolado do fígado ou célula-tronco ou a população destes de acordo com a invenção. Preferencialmente, células do fígado são células do fígado humano, ou células do fígado de mamíferos.

As células-tronco ou progenitoras, de acordo com a invenção (especificamente menciona, embora obviamente não se limitam à linhagem LMBP 6452CB) comporta várias vantagens consideráveis. Por exemplo, ao contrário de células de origem embrionária, o presente progenitor ou células-tronco são de origem adulta e apresentar menor risco de descontrolo (tumor) do crescimento ou transformação maligna, quando utilizado na terapia.

Além disso, os inventores compreenderam que as

células-tronco ou progenitoras, de acordo com a invenção substancialmente não exibem capacidade para se diferenciarem em tipos de célula mesodermiais (por exemplo, osteócitos ou condrócitos, células do tecido conjuntivo), o que diminui a formação ectópica de tais tecidos, quando as células são administradas e implantadas no tecido hepático.

Os presentes inventores também compreenderam que as células-tronco ou progenitoras da invenção pode ter preferência particular para a diferenciação de hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, o que as torna particularmente adequadas para a reconstituição das funções hepatócitas em um fígado.

As presentes células-tronco ou progenitoras são claramente diferentes das células-tronco derivadas do fígado descritas anteriormente, como células ovais, por exemplo, nas suas características morfológicas e marcador de expressão.

As células-tronco ou progenitoras do fígado adulto, de acordo com a invenção são particularmente úteis na medicina, hepatologia, erros inatos do metabolismo hepático, transplante, doenças infecciosas, insuficiência hepática. Células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção são particularmente úteis para o transplante de células do fígado (humano), a elaboração de modelos animais de transplante de células do fígado humano,

fígados bio-artificiais, in vitro fígado linhagem de células do fígado e modelos animais de doenças humanas adquiridas, testes de seleção do metabolismo hepático (farmacocinética, citotoxicidade, genotoxicidade) e terapia 5 direcionada a genética de células do fígado. As células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção pode ser ainda diferenciadas em hepatócitos.

A presente invenção proporciona também uma composição farmacêutica compreende as células-tronco ou progenitoras 10 do fígado, linhagem celular, ou população celular, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a invenção e de um portador farmacêuticamente aceitável. 15 Preferencialmente, as células do fígado são células do fígado humano, ou células do fígado de mamíferos.

A presente invenção fornece também um método de tratamento de doenças hepáticas compreendendo administrar uma quantidade efetiva de células-tronco ou progenitoras do 20 fígado, uma linhagem celular, ou população celular destas, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a invenção. Em uma modalidade, as doenças do 25 fígado incluem, mas não estão limitadas a fenilcetonúria e

outras aminoacidopatias, hemofilia e outras deficiências do fator de coagulação, hipercolesterolemia familiar, outras desordens do metabolismo lipídico, perturbações do ciclo da ureia, glicogenoses, galactosemia, fructosemia, 5 tirosinemia, deficiências do metabolismo dos carboidratos e proteínas, acidúria orgânica, doenças mitocondriais, doenças lisossomais e peroxissomais, anormalidade da síntese protéica, defeitos dos portadores das células do fígado, defeito de glicosilação, hepatite, cirrose, erros 10 inatos de metabolismo, insuficiência hepática aguda, infecção hepática aguda, toxicidade química aguda, insuficiência hepática crônica, colangite, cirrose biliar, síndrome de Alagille, deficiência de alfa-1-antitripsina, hepatite autoimune, atresia biliar, câncer de fígado, 15 doença cística hepática, gordura no fígado, galactosemia, cálculos biliares, síndrome de Gilbert, hemocromatose, hepatite A, hepatite B, hepatite C, e outras infecções virais hepáticas, porfiria, colangite esclerosante primária, síndrome de Reye, sarcoidose, tirosinemia, 20 glicogenose tipo 1, ou doença de Wilson.

A presente invenção fornece também um método para tratar erros de expressão genética que compreende: (i) introduzir em uma célula-tronco ou progenitora do fígado, incluindo, incluindo a descendência diferenciada, esp. 25 hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, de acordo

com a invenção uma cópia funcional de um gene para fornecer uma população transformada, e (ii) introduzir em um paciente do fígado, que está doente com necessidade de uma cópia funcional do gene, pelo menos uma porção da população transformada. Alternativamente, a população transformada pode ser introduzida em um fígado de mamífero não-humano, para produzir um novo modelo animal de patologia hepática.

A presente invenção também proporciona uma composição para o tratamento de erros de uma expressão genética que compreende células-tronco ou progenitoras do fígado transformadas ou, linhagem celular, ou população celular, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a invenção em que uma cópia funcional de um gene foi introduzido.

A presente invenção proporciona também uma composição farmacêutica para tratar erros de uma expressão genética que compreende células-tronco ou progenitoras do fígado transformadas ou, linhagem celular, ou população celular, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a invenção em que uma cópia funcional de um gene foi introduzido e introduzido e um portador

farmaceuticamente aceitável.

A presente invenção fornece também um método para melhorar a regeneração de fígado doente ou ferido que compreende administrar no fígado uma quantidade efetiva de  
5 células-tronco ou progenitoras do fígado, linhagem celular ou população celular destas, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a invenção.

10 A presente invenção fornece também um dispositivo para assistir o fígado que compreende um recipiente para acolher as células-tronco ou progenitoras do fígado, a linhagem celular ou população de célula destas, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada,  
15 esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a invenção.

A presente invenção fornece também um método para realizar de testes de toxicidade in vitro compreendendo:  
20 expor a um agente de teste uma célula-tronco ou progenitora do fígado, uma linhagem celular, ou população celular, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a  
25 invenção, e observando pelo menos um efeito, se for o caso,

do agente de teste sobre a população celular do fígado. Preferencialmente, a pelo menos um efeito inclui um efeito sobre a viabilidade celular, função celular, ou ambas.

A presente invenção fornece também um método de  
5 realização de estudos do metabolismo da droga in vitro compreende: (i) expor as células-tronco ou progenitoras do fígado, linhagem celular ou população celular ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos,  
10 opcionalmente modificadas geneticamente, de acordo com a invenção, para um agente de teste, e (ii) observar pelo menos uma mudança, se for o caso, envolvendo o agente de teste após o período de teste predeterminado. Preferencialmente, pelo menos uma mudança inclui uma  
15 mudança na estrutura, concentração, ou em ambas do agente de teste.

A presente invenção fornece também um método eficaz para realizar um teste de detecção de agentes para tratar infecções do fígado compreendendo: (i) infectar com um  
20 agente infeccioso de interesse as células-tronco ou progenitoras do fígado, linhagem celular ou população celular ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente, de  
25 acordo com a invenção para proporcionar uma população

infectada, (ii) expor a população infectada a uma determinada quantidade de agente de teste, e (iii) observar os efeitos, se for o caso, da exposição sobre a população infectada. Em uma modalidade, o agente infeccioso incluir  
5 um microorganismo. Em uma modalidade, o agente infeccioso incluir um ou mais vírus, bactérias, fungos, ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, os efeitos observados incluem os efeitos sobre a replicação viral de um agente infeccioso viral. Preferencialmente, o agente infeccioso  
10 viral incluir um vírus da hepatite.

A presente invenção fornece também um método para produzir uma proteína de interesse que compreende (i) introduzir nas células-tronco ou progenitoras do fígado, linhagem celular ou população celular ou descendentes  
15 destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, de acordo com a invenção um gene funcional que codifica uma proteína de interesse, (ii) incubar a dita população celular sob condições efetivas para transcrição, translação e,  
20 opcionalmente, a modificação pós-translacional toma lugar, e (iii) coletar a proteína de interesse. Preferencialmente, as células do fígado são células do fígado humano. Em uma modalidade, a proteína de interesse compreende uma vacina com antígeno.

25 A presente invenção fornece também um método de

condução in vitro ou in vivo de estudos sobre desenvolvimento do fígado e diferenciação dos hepatócitos compreendendo: expor uma célula-tronco ou progenitora do fígado, uma linhagem celular, ou população celular, ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, de acordo com a invenção, in vitro ou in vivo, às condições que afetam as condições de diferenciação e observar pelo menos um efeito sobre a população das células.

A presente invenção abrange as células, a preparação, a caracterização, a cultura, e o método de produção das mesmas.

A presente invenção abrange também a preservação destas células em por criopreservação e cultura das células.

A presente invenção abrange também a técnica de transplante de células em animais e seres humanos.

A presente invenção abrange também a utilização de células-tronco do fígado, de acordo com a invenção, para a preparação de um medicamento para o tratamento das doenças acima mencionadas. A presente invenção abrange também a utilização de células-tronco do fígado, de acordo com a invenção em um kit ou em parte de um kit.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Figura 1**, mostra a aparência morfológica de um

fígado humano adulto derivado de células-tronco ou progenitoras da invenção (ADHLSC), com preparado no exemplo 1, após 1 mês de cultura, utilizando microscopia óptica (contraste de fase). A, em menor confluência; B, em maior  
5 confluência. Ampliação 100 x

A **Figura 2A:** a presença de coloração por imunofluorescência do fígado humano adulto derivado de células-tronco ou progenitoras da invenção (ADHLSC), com preparado no exemplo 1, depois de 1 mês-cultura, para a  
10 alfa-actina músculo liso (A1), vimentina (A2) e albumina (A3, policlonal, A4, monoclonal), **B:** perfis de expressão genética RT-PCR do referido (ADHLSC, faixa 1) linhagem celular, em comparação com hepatócitos humanos (hHep, faixa 2), células estreladas humanas (HSC, faixa 3) e  
15 hepatoblastoma humano (HepG2, faixas 4).

A **Figura 3,** mostra a diferenciação do fígado humano adulto derivado de células-tronco ou progenitoras da invenção (ADHLSC) em linhagem semelhante aos hepatócitos in vitro. As células foram diferenciadas como no exemplo 1,  
20 fotografias foram tiradas no dia 2 (J2), dia 14 (J14) e dia 30 (J30) do processo.

A **Figura 4** mostra várias imagens de coloração com hematoxilina e eosina do fígado quimérico de uPA/SCID camundongos transplantados com células ADHLSC  
25 indiferenciadas, conforme detalhado no exemplo 1,

demonstrando que estas células se tornam hepatócitos diferenciados.

A **Figura 5** mostra várias imagens de coloração de albumina humana revelou a origem humana da população semelhante a hepatócitos humanos 10 semanas pós-transplante como no exemplo 1 com ADHLSC indiferenciados.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

Como usado aqui, as formas singulares de "a", "um" e "o" incluem tanto singular como plural referentes ao contexto a menos que claramente se diga o contrário. A título de exemplo, "uma célula" se refere a uma ou mais células.

Os termos "compreendendo", "compreende" e "composto de" como usados aqui são usados sinônimos de "incluindo", "inclui" ou "contendo", "contém", e são inclusivos, ou estão em aberto e que não exclui adicional, elementos não recitados, elementos ou etapas de métodos.

Todas as referências citadas no presente relatório são incorporadas por referência na sua totalidade. Particularmente, os ensinamentos de todas as referências aqui especificamente citadas são incorporados como referência.

#### A obtenção de células da invenção

Em um aspecto, a presente invenção fornece um método

para a obtenção de célula-tronco ou progenitora isolada ou a uma população celular que compreende a dita célula-tronco ou progenitora, o método inclui: (a) dissociar o fígado adulto ou parte dele para formam uma população celular primárias, apartir do dito fígado adulto ou parte deste, 5 (b) plaquear a população celular primária sobre um substrato que permite a aderência de células a este, e (c) cultivar células da população celular primárias, que aderiu ao dito substrato, por pelo menos 7 dias, preferivelmente, 10 por pelo 10, pelo menos 13 ou pelo menos 15 dias.

Como usado aqui, o termo "célula isolada" se refere geralmente a uma célula que não está associada a uma ou mais células ou a um ou mais componentes celulares com que a célula está associada *in vivo*. Por exemplo, uma célula 15 isolada pode ter sido removida de seu ambiente nativo, ou pode resultar de propagação, por exemplo, propagação *ex vivo*, de uma célula que foi removida de seu ambiente nativo.

O termo "*in vitro*", como usado aqui denota exterior, 20 ou externo ao corpo humano ou animal. O termo "*in vitro*" como usado aqui deve ser entendido para incluir "*ex vivo*". O termo "*ex vivo*" normalmente se refere a tecidos ou células retiradas de um corpo humano ou animal ou propagadas fora do corpo, por exemplo, em uma meio de 25 cultura.

O termo "população celular" se refere geralmente a um agrupamento de células. Salvo indicação contrária, o termo se refere a um agrupamento de células constituído de ou compreendendo células isoladas, como definido neste  
5 documento.

A população celular pode ser composta de células com um fenótipo comum ou pode compreender, pelo menos, uma fracção de células com um fenótipo comum. As células são ditas por ter um fenótipo comum quando são substancialmente  
10 semelhantes ou idênticas, em uma ou mais características demonstráveis, incluindo, mas não limitadas a aparência morfológica, presença, ausência ou nível de expressão de determinados produtos ou componentes celulares, por exemplo, RNA, proteínas ou outras substâncias, a atividade  
15 de determinadas vias bioquímicas, a capacidade de proliferação e/ou cinética, diferenciação potencial e/ou resposta a sinais de diferenciação ou comportamento durante o cultivo in vitro (por exemplo, aderência, não-adesão, crescimento da monocamada, cinética da proliferação, ou  
20 algo do gênero). Tais características demonstráveis podem, portanto, definir uma população celular ou uma fracção desta.

Quando uma população celular é dita aqui como sendo "heterogênea", isto geralmente denota uma população celular  
25 que compreende duas ou mais células ou frações de células

que não têm um fenótipo comum, por exemplo, uma população celular que compreende células de dois ou mais diferentes tipos de células. Por meio do exemplo e sem limitar, uma população celular heterogênea pode ser isolada do fígado, e  
5 pode incluir diversos tipos de células do fígado, incluindo, mas não se limitado aos hepatócitos (por exemplo, hepatócitos pequenos e grandes), colangiócitos, Células Kupffer, células estreladas do fígado (Célula de Ito) e células endoteliais do fígado.

10 Quando uma população celular é citada aqui como sendo "homogênea", esta é constituída por células que um fenótipo em comum. A população celular mencionada aqui como sendo "substancialmente homogênea" compreende uma maioria substancial de células tendo um fenótipo em comum. A  
15 população celular "substancialmente homogênea" pode compreender pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos, 80%, preferivelmente, pelo menos, 90%, por exemplo, pelo menos, 95%, ou ainda pelo menos, 99% das células que têm um fenótipo em comum, tais como o fenótipo especificamente  
20 referido (por exemplo, o fenótipo das células-tronco ou células progenitoras). Como usado aqui, o termo "substancialmente homogênea", conforme usado neste documento podem, portanto, também abranger uma população homogênea.

25 A expressão "população celular compreende as células-

tronco ou progenitoras" se refere a uma população celular, tal como definido aqui compreende pelo menos uma célula-tronco ou progenitora e normalmente uma fração de célula-tronco ou célula progenitora, como aqui definida.

5 Normalmente, as células-tronco ou progenitoras da dita fração podem ter um fenótipo comum.

O termo "células progenitoras" se refere geralmente a uma célula de proliferação competente e relativamente menos especializada ou não especializada, que ou as descendentes

10 destas podem dar origem a pelo menos um tipo de célula relativamente mais especializada. Por meio de exemplo e não de limitação, uma célula progenitora pode dar origem aos descendentes que podem diferenciar em uma ou mais linhagens para produzir mais células relativamente mais

15 especializadas, onde tais células relativamente mais especializada crescente e/ou descendentes podem ser elas próprias células progenitoras, ou mesmo para produzir células diferenciadas terminalmente, ou seja, células totalmente especializadas, que pode ser pós-mitose. O termo

20 abrange também as células-tronco definidas aqui.

Uma célula progenitora é dito para "dar lugar" a uma outra, relativamente mais células especializadas, quando, por meio de exemplo e não de limitação, as células progenitoras diferenciadas se tornam outras células, sem

25 sofrer a primeira divisão celular, ou a outra célula é

produzida após um ou mais ciclos de divisão celular e/ou diferenciação das células progenitoras ou descendentes.

O termo "células-tronco" se refere a uma das células progenitoras capazes de auto-renovação, ou seja, podem  
5 proliferar sem diferenciação, segundo o qual a descendência de uma das células-tronco ou pelo menos parte dela mantém substancialmente o não especializado ou relativamente menos especializados fenótipo, a diferenciação potencial, e a competência da proliferação da célula-tronco mãe. O termo  
10 engloba as células-tronco substancialmente capazes de auto-renovação ilimitada, ou seja, onde a capacidade da descendência ou parte desta para uma proliferação adicional não seja substancialmente reduzida em comparação com a célula mãe, assim como as células-tronco que exibem auto-  
15 renovação limitada, ou seja, onde a capacidade da descendência ou parte desta para uma maior proliferação é comprovadamente reduzida em comparação com a célula mãe.

Uma pessoa versada sabe que geralmente as propriedades acima se referem a comportamento *in vivo* das  
20 células-tronco e progenitoras e, e pode em condições adequadas ser totalmente ou em parte, pelo menos, reproduzida *in vitro* e/ou *ex vivo*.

Baseado na capacidade de dar origem a diversos tipos de células, uma célula-tronco ou progenitora podem ser  
25 geralmente descritas como totipotentes, pluripotentes,

5 multipotente ou unipotente. Uma única célula "totipotentes" é definida como sendo capaz de crescer, ou seja, desenvolver, em todo um organismo. A célula "pluripotente" não é capaz de crescer em todo um organismo, mas é capaz de dar lugar a todos os tipos de células provenientes de três camadas germinais, isto é, mesoderme, endoderme e ectoderme, e podem ser capazes de dar origem a todos os tipos de células de um organismo. A célula "multipotente" é capaz de dar lugar a pelo menos um tipo de célula de cada de dois ou mais órgãos diferentes ou tecidos de um organismo, onde os ditos tipos de células podem ser da mesma ou de diferentes camadas germinais, mas não é capaz de dar lugar a todos os tipos de células de um organismo. A célula "unipotente" é capaz de diferenciar as células de apenas uma linhagem celular.

15 Os termos "diferenciação", "diferenciando" ou seus derivados são utilizados aqui para denotar o processo pelo qual uma célula não especializada ou relativamente menos especializada se torna relativamente mais especializadas. No contexto da célula ontogenia, o adjetivo "diferenciado" é um termo relativo. Assim, uma "célula diferenciada" é uma célula que diminui progressivamente certo percurso de desenvolvimento ao qual a célula está sendo comparada. Uma célula diferenciada pode, por exemplo, ser um terminal de 25 células diferenciadas, ou seja, uma célula especializada

plenamente que ocupa funções especializadas em diferentes tecidos e órgãos de um organismo, e que pode, mas não precisa de ser pós-mitose. Em outro exemplo, uma célula diferenciada também pode ser uma célula progenitora dentro de linhagem diferenciada, que pode ainda se proliferar e/ou 5 diferenciar. Do mesmo modo, uma célula é "relativamente mais especializada", se esta reteve o progresso de um certo percurso de desenvolvimento ao qual a célula está sendo comparada, onde este último é, por conseguinte, 10 considerados "não especializado" ou "relativamente menos especializados". Uma célula relativamente mais especializada pode diferir de célula relativamente menos especializada ou não especializada em uma ou mais características fenotípicas demonstráveis, tais como, por 15 exemplo, a presença, ausência ou nível de expressão de determinados produtos ou componentes celulares, por exemplo, RNA, proteínas ou outras substâncias, a atividade de determinadas vias bioquímicas, aparência morfológica, a capacidade de proliferação e/ou cinética, diferenciação 20 potencial e/ou resposta a sinais de diferenciação, etc, onde tais características significam a progressão da célula ainda mais relativamente especializada, ao longo do dito caminho do desenvolvimento.

Exemplos não limitadores da diferenciação podem 25 incluir, por exemplo, a uma mudança de células-tronco

pluripotentes em um determinado tipo de células-tronco ou progenitoras multipotentes, a mudança de uma célula-tronco ou progenitoras multipotente em um determinado tipo de célula-tronco ou progenitoras unipotente, ou a mudança de  
5 uma célula-tronco ou progenitoras unipotente para mais tipos de células especializadas ou para células especializadas terminalmente dentro de uma determinada linhagem celular. A diferenciação de uma célula menos especializada ou não especializada para uma célula mais  
10 especializada pode progredir através da aparência das células com grau intermediário da especialização.

*Dissociação do tecido hepático*

Como mencionado, o método da invenção compreende uma etapa de dissociar o fígado adulto ou parte deste para  
15 formar uma população celular primárias, a partir do dito fígado adulto ou parte deste.

O termo "fígado" se refere ao órgão fígado. A expressão "parte do fígado" geralmente se refere a qualquer parte do fígado, sem qualquer limitação quanto à quantidade  
20 da referida parte ou a região do fígado onde se origina. Preferencialmente, todos os tipos de células presentes no fígado podem também ser representados na referida parte do fígado. A quantidade da parte do fígado pode, pelo menos em parte, seguir considerações de ordem prática, por exemplo,  
25 a necessidade de obter células hepáticas primárias

suficientes para realizar razoavelmente o método da invenção. Essas considerações serão aparentes a uma pessoa versada, tendo em vista os presentes ensinamentos. Assim, por meio de exemplo e não de limitação, uma parte do fígado  
5 pode representar (tipicamente w/w), pelo menos, 0,1% do fígado, ou pelo menos 1%, ou pelo menos 10% ou pelo menos 20%, ou pelo menos 30% ou pelo menos 40% ou pelo menos 50% ou pelo menos 60% ou pelo menos 70% ou pelo menos 80% ou pelo menos 90% ou mais do fígado. Em outros exemplos não  
10 limitativos, uma parte do fígado pode ser de pelo menos 1 g, ou pelo menos 10g, 100g ou pelo menos ou pelo menos 200g, ou pelo menos 300g, ou pelo menos 400g, ou pelo menos 500g ou pelo menos 600g, ou pelo menos 700g, ou pelo menos 800g, ou pelo menos 900g ou pelo menos 1000g, ou pelo menos  
15 1100g, ou pelo menos 1200g, ou pelo menos 1300g ou pelo menos 1400g ou mais. Por exemplo, uma parte do fígado pode ser um lobo hepático, por exemplo, lobo direito ou esquerdo, ou segmento IV ressecado durante a operação de dividir o fígado.

20 O termo "fígado adulto", conforme usado neste documento se refere ao fígado que tenha atingido maturidade substancial de desenvolvimento da organização do tecido e composição celular.

Particularmente, sabe-se que uma pessoa versada que o  
25 fígado pode sofrer alterações durante um período de tempo,

imediatamente após o nascimento, se depois ele atingir uma organização de maturidade substancial. Por exemplo, no ser humano, o fígado ao nascimento contém uma considerável população celular hematopoiéticas, que desaparecem  
5 substancialmente a partir do fígado dentro de cerca de 1-2 semanas após o nascimento. Além disso, o fígado de seres humanos no nascimento contém uma população celular progenitoras hepática, que são substancialmente substituídas por células hepatócitas e biliares maduras  
10 dentro de vários meses após o nascimento.

Assim, no ser humano, "fígado adulto" se refere ao fígado de um sujeito que a qualquer momento após o nascimento, preferivelmente em um tempo integral, e pode ser, por exemplo, pelo menos um mês de idade, por exemplo,  
15 pelo menos 2 meses, pelo menos 3 meses, por exemplo, pelo menos 4 meses, pelo menos 5 meses, por exemplo, pelo menos 6 meses após o nascimento, tal como, por exemplo, 1 ano ou mais, 5 anos ou mais, pelo menos 10 anos ou mais, 15 anos ou mais, 20 anos ou mais, ou 25 anos ou mais após o  
20 nascimento. Assim, um "fígado adulto", ou fígado maduro, pode ser encontrado em seres humanos que de outro modo seriam descritas nos termos convencionais de "recém-nascido", "infantil", "juvenil", "adolescente" ou "adulto".

Uma pessoa versada irá apreciar que o fígado pode  
25 atingir uma maturidade substancial de desenvolvimento em

diferentes intervalos de tempo pós-natal em diferentes espécies animais, e pode adequadamente construir o termo "fígado adulto", com referência a cada espécie.

O fígado ou parte deste é obtido a partir de um "sujeito" ou "doador", referindo-se a um animal vertebrado, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um humano.

O termo "mamífero" inclui quaisquer animais classificados como tal, incluindo mas não limitado a seres humanos, animais domésticos e de criação, animais selvagens, animais de estimação, animais de companhia e animais de experimentais, como, por exemplo, ratos, ratinhos, coelhos, cães, gatos, vacas, cavalos, porcos e primatas, por exemplo, macacos e gorilas.

Em uma modalidade particularmente preferida, o fígado adulto ou parte deste é de um ser humano. Como detalhado em outra parte deste relatório, células-tronco ou progenitoras ou linhagem celular ou descendente destas derivadas de acordo com a invenção de fígados de seres humanos, podem ser vantajosamente utilizadas, por exemplo, na pesquisa e na terapia de doentes, esp. pacientes humanos, que sofrem de doenças hepáticas.

Em outra modalidade, o fígado adulto ou parte deste pode ser proveniente de animal não humano, preferivelmente um mamífero não-humano. As células-tronco ou progenitoras

ou linhagem celular, ou descendentes, derivados de acordo com a invenção a partir de fígados de animal não-humano ou mamífero não-humano pode ser vantajosa utilizadas, por exemplo, na pesquisa e na terapia de doenças hepáticas nos membros do mesmo, relacionadas ou outros animais não-humanos ou espécies de mamíferos não-humanos, ou mesmo na terapia de pacientes humanas que sofrem de doença hepática (por exemplo, xenotransplantação, bio-fígado artificial compreendendo dispositivos não-humanos ou animais de mamíferos não-humanos). Por meio de exemplo e não de limitação, especialmente células de mamífero não-humano são adequadas para uso em terapias humanas podem ser originárias de suínos.

Um doador vivo ou morto, conforme determinado pelos critérios da arte adotada, tais como, por exemplo, critérios de "coração-pulmão" (geralmente envolvendo uma cessação funções circulatórias e respiratórias irreversíveis) ou a critérios de "morte cerebral" (geralmente envolvendo uma cessação irreversível de todas as funções do cérebro, incluindo o tronco encefálico). A colheita pode envolver procedimentos conhecidos na arte, como, por exemplo, biópsia, ressecção ou excisão.

Uma pessoa versada irá apreciar que, pelo menos, alguns aspectos da colheita fígado ou parte deste proveniente de doadores podem ser sujeitas a normas éticas

e legais respectivamente. Por meio de exemplo e não de limitação, a colheita de tecidos do fígado proveniente de um ser humano pode necessitar de ser compatível com o organismo da vida do doador. Assim, apenas uma parte do fígado pode normalmente são removidas de um doador humano, por exemplo, utilizando biópsia ou ressecção, assim um nível adequado de funções fisiológicas do fígado é mantido no doador. Por outro lado, a colheita do fígado ou parte deste a partir de um animal não-humano pode, mas não necessariamente precisa ser compatível com a sobrevivência de animais não-humanos. Por exemplo, os animais não-humanos pode ser abatidos após a colheita do tecido. Estas considerações análogas e será evidente para uma pessoa versada e refletem padrões legais e éticos e não estão substancialmente relacionadas com a essência da invenção.

Em uma modalidade, o fígado ou parte deste pode ser obtido a partir de um doador, esp. doador humano, que tem circulação prolongada, por exemplo, a batida do coração, e funções respiratórias prolongada, por exemplo, respiração pulmonar ou respiração artificial . Sob reserva da ética e normas legais, os doadores podem ter ou não morte cerebral (por exemplo, a retirada de todo o fígado ou parte deste, o que não seria compatível com uma maior sobrevivência de um doador humano, pode ser autorizada em cérebro de ser humano morto). A Colheita do fígado ou de parte deste proveniente

de tais doadores é Vantajosamente, uma vez que o tecido não sofre substancial anoxia (falta de oxigenação), o que geralmente resulta em isquemia (cessação da circulação).

Em outra modalidade, e como surpreendentemente  
5 realizado pelos presentes inventores, o fígado ou parte deste pode ser obtido a partir de um doador, esp. doador humano, que no momento da colheita de tecidos tenha cessado a circulação, por exemplo, sem batimentos do coração, e/ou tenha cessado as funções respiratórias, por exemplo, sem  
10 respiração pulmonar e sem respiração artificial . Enquanto, o fígado ou parte deste proveniente de tais doadores podem ter sofrido pelo menos um certo grau de anoxia, os presentes inventores compreenderam que a viabilidade de células-tronco ou progenitoras, de acordo com a presente  
15 invenção também pode ser obtida a partir desses tecidos. O fígado ou parte deste pode ser colhido no dentro de cerca de 24h após a cessada a circulação do doador (por exemplo, batimento cardíaco), por exemplo, dentro de cerca de 20h, por exemplo, dentro de cerca de 16h, mais preferivelmente  
20 dentro de cerca de 12h, por exemplo, dentro de cerca de 8h, ainda mais preferencialmente dentro de cerca de 6h, por exemplo, dentro de cerca de 5h, dentro de cerca de 4h ou dentro de cerca de 3h, ainda mais preferivelmente dentro de cerca de 2h, e mais preferivelmente dentro de cerca de 1h,  
25 tais como, dentro de cerca de 45, 30 ou 15 minutos após o

interrompimento da circulação do doador (por exemplo, batimento cardíaco).

Os tecidos colhidos como acima podem ser resfriados a temperatura ambiente, ou a uma temperatura inferior à temperatura ambiente, mas geralmente o congelamento do tecido ou de partes dos mesmos é evitado, especialmente porque tal congelamento poderia resultar em nucleação ou aparecimento de cristais de gelo. Por exemplo, os tecidos podem ser mantidos em qualquer temperatura entre cerca de 10 1°C, e temperatura ambiente, entre cerca de 2°C e a temperatura ambiente, entre cerca de 3°C, e temperatura ambiente ou entre cerca de 4°C, e temperatura ambiente, e podem ser vantajosamente mantidos a cerca de 4°C. Os tecidos também podem ser mantidos "no gelo", tal como conhecidos, na arte. O tecido pode ser resfriado por todo ou parte do tempo isquêmico, ou seja, o período após a cessação da circulação do doador. Ou seja, os tecidos podem ser submetidos à isquemia quente, isquemia fria, ou uma combinação de isquemia quente e fria. Os tecidos podem ser 20 colhidos e conservados durante, por exemplo, até 48h antes do processamento, preferivelmente por menos de 24h, por exemplo, menos de 16h, mais preferivelmente por menos de 12h, por exemplo, menos de 10h, menos de 6h, menos de 3h, menos de 2h ou menos de 1h.

25 Os tecidos colhidos podem ser vantajosamente, mas não

precisam ser mantidos em, por exemplo, totalmente ou pelo menos parcialmente submersos em um meio adequado e/ou pode ser, mas não precisam ser perfundidos no meio adequado, antes ainda do processamento do tecido. Uma pessoa versada  
5 é capaz de selecionar um meio adequado, que pode ajudar na sobrevivência das células do tecido durante o período antes do processamento.

O método da invenção compreende desassociar o fígado tecido adulto, como descrito acima, para formar uma  
10 população celular primárias.

O termo "desassociação" como usado aqui geralmente se refere à ruptura parcial ou total da organização celular de um tecido ou órgão, ou seja, perturbar parcial ou totalmente a associação entre as células e os componentes  
15 celulares de um tecido ou órgão. Como pode ser entendido por uma pessoa versada, com o objetivo de desassociar um tecido ou órgão é obter uma suspensão das células (uma população celular), do dito tecido ou órgão. A suspensão pode compreender células únicas ou solitárias, bem como as  
20 células fisicamente anexadas para formar clusters ou clumps de duas ou mais células. A desassociação de preferência não provoca ou causa a menor redução possível da viabilidade celular.

Um método adequado para desassociação do fígado ou  
25 parte deste para obter uma população (suspensão) de células

primárias destes pode ser qualquer método conhecido na arte, incluindo, mas não limitado a, digestão enzimática, separação mecânica, filtragem, centrifugação e suas combinações. Em uma modalidade, o método de desassociação do fígado ou parte deste pode compreender digestão enzimática do tecido hepático para libertar as células do fígado. Em uma modalidade, o método de desassociação do fígado ou parte deste pode compreender ruptura mecânica ou separação do tecido hepático para libertar as células do fígado. Em uma modalidade, o método de desassociação do fígado ou parte deste pode incluir uma combinação de digestão enzimática e de ruptura mecânica ou separação do tecido hepático para libertar as células do fígado.

Os métodos para desassociação do fígado ou parte deste como acima estão documentados na arte. Por exemplo, o isolamento das células do fígado do tecido hepático é bem conhecido desde meados dos anos 1960 (Howard et al. 1967. J Célula Biol 35: 675-84). Hepatócitos de ratos foram isolados usando a combinação da técnica de digestão enzimática e mecânica, posteriormente modificado por Berry and Friend (J Célula Biol 43: 506-20, 1969). Essa técnica foi desenvolvida por Seglen para se tornar a técnica de colagenase duas etapas, vastamente utilizada. (Methods Célula Biol 13: 29-83, 1976).

Assim, em uma modalidade, o método de desassociação

do fígado ou parte deste para obter uma população (suspensão) de células primárias deste é ou compreendendo a técnica de colagenase duas etapas. Uma pessoa versada é ciente de que, desde a publicação da referida técnica citada acima, diversas modificações têm sido descritas e/ou são concebíveis, e estão incluídas na invenção.

Por meio de ilustração e não limitação segue uma breve descrição da técnica das de colagenase em duas etapas. Por todo o fígado, uma cânula pode ser colocada no maior vaso sanguíneo existente no fígado, e colocada e presa por suturas. Quanto às partes ou segmentos do fígado, a cânula pode ser colocada na abertura do vaso sanguíneo do paciente na superfície de corte, e presa por suturas. Neste caso, as pequenas aberturas dos vasos sanguíneos geralmente precisam ser fechadas para impedir que as soluções de perfusão escapem da superfície de corte. O tecido hepático é perfundidos com uma solução de tampão bivalente livre de cátion pré-aquecida a 37°C contendo um agente quelante, como, por exemplo, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido etilenoglicol tetracético (EGTA).

Soluções tampões podem compreender soluções salinas, tais como, por exemplo, N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-ácido etanosulfônico (HEPES), Williams E. medium, solução salina equilibrada Hank's, ou solução salina equilibrada de Earl's, e pode incluir também sais como NaCl e KCl, entre

outros. Isto leva a uma perturbação das estruturas desmosomal que prendem as células juntas. O tecido é então perfundido com a solução tampão contendo cátions bivalentes (s), tais como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e a matriz de enzimas degradantes que atuam ao digerir o tecido. As células primária do fígado, esp. hepatócitos, geralmente são liberados pelo rompimento mecânico suave, por exemplo, raspado com um pente, agitando, pressionando através de filtros, por exemplo, filtros de aço inoxidável, gaze de algodão ou tecido de náilon, para mecanicamente completar o processo de dissociação da célula. Esses filtros podem ter peneiras com espessuras que permitem a passagem de hepatócitos através destas, por meio de exemplo e não de limitação, com cerca de 0,1 milímetros ou mais, cerca de 0,25 milímetros ou mais, cerca de 0,50 milímetros ou mais, cerca de 1 milímetro ou mais, ou cerca de 2 milímetros, 3 milímetros, 4 milímetros ou 5 milímetros. Uma sucessão de filtros com peneiras com poros de dimensões que diminuem progressivamente pode ser utilizada para dissociar gradualmente o tecido ou células desprendidas. As células são dissociadas são enxaguadas com um tampão contendo um inibidor de protease, soro e/ou plasma para a desativação da colagenase e outras enzimas utilizadas no processo de perfusão, separadas por centrifugação a baixa velocidade, por exemplo, compreendida entre 10 x g e 500 x g

(vantajosamente, todas células vivas podem ser substancialmente revestidas, enquanto que as células mortas e detritos celulares são substancialmente eliminados), e as pelotas obtidas são lavadas com solução de tampão gelada para purificar a suspensão celular.

O número e a qualidade de células do fígado isoladas pode variar dependendo, por exemplo, da qualidade dos tecidos utilizados, as composições de perfusão das soluções de tampão, bem como o tipo e a concentração da enzima. Freqüentemente, as enzimas usadas incluem, mas não se limitam a, colagenase, pronase, tripsina, dispase, hialuronidase, termolisina e pancreatina, e suas combinações. A colagenase é mais usada, muitas vezes, preparada a partir de bactérias (por exemplo, a partir de *Clostridium histolyticum*), e pode muitas vezes constituir de uma mistura de enzimas mal purificadas, que pode ter ação enzimática inconsistente. Algumas das enzimas apresentam atividade protease, que pode causar reações indesejáveis que afetam a qualidade e a quantidade de células saudáveis/viáveis. É entendido por aqueles versados na arte que é preciso usar enzimas com pureza e qualidade suficientes para conseguir populações de células do fígado viáveis.

Outros métodos de colheita células hepáticas primárias podem excluir técnicas de digestão enzimática.

A perturbação mecânica tem sido amplamente utilizada, apesar do rendimento das células do fígado produzidas por esta forma tenderem a ser menor do que por digestão colagenase, além de ser menos consistentes. No entanto, os métodos recentes envolvendo perfusão sacarose-EDTA em combinação com vibração controlada em um resfriamento ambiente têm sido desenvolvida com razoável sucesso (Kravchenko et al. 2002. *Célula Biol Int* 26: 1003-1006). O fígado é realizado no local de perfusão utilizando uma solução de sacarose contendo EDTA (pH 7,4). Após a perfusão, o fígado é retirado do corpo, colocado em um prato e, finamente dividido em um pequeno volume do meio de gelo. As células dos fragmentos do fígado são libertadas por meio de desagregação vibração mecânica controlada (MVD), utilizando um motor para homogenisar. A mistura resultante produzida por este método pode então ser filtrada através de malha grossa para dar uma primeira suspensão de células do fígado. As células podem ser suspensas no meio, e recuperadas por centrifugação. Assim sendo, em uma modalidade, o desassociação de fígado ou parte deste pode ser a ruptura mecânica.

Uma pessoa versada está consciente de que a técnica de colagenase de duas etapas pode ser especialmente adaptada para a libertação pelo menos dos hepatócitos provenientes do tecido hepático. As suspensões celulares

obtidas utilizando a referida técnica pode incluir uma parte considerável dos hepatócitos, e podem também incluir outros tipos de células do fígado. Como mencionado, os presentes inventores perceberam que tais suspensões celulares são particularmente uma matéria-prima adequada para a obtenção de células-tronco ou progenitoras da invenção.

Em uma modalidade, o método de desassociação do fígado ou parte deste pode formar uma suspensão celular (que poderá ser facilmente otimizado por uma pessoa versada) com pelo menos 10%, por exemplo, pelo menos 20%, no mínimo 30%, por exemplo, pelo menos 40%, no mínimo 50%, por exemplo, pelo menos 60%; pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 80%, ou pelo menos 90%, ou até cerca de 100% de células individuais, ou seja, células únicas.

Como mencionado, a desassociação do tecido hepático, assim fornece uma população celular primárias a partir do dito fígado adulto ou parte deste.

Como usado aqui, o termo "célula primária" inclui células presentes em uma suspensão de células obtidas a partir de um tecido ou órgão de um sujeito, por exemplo, por desassociação dos mesmos (ou seja, uma população de célula antes de serem chapeadas), as células presentes em um tecido transplantado, tanto os tipos anteriores de células quanto os chapeados pela primeira vez, e as células

da suspensão de células provenientes destas células chapeadas pela primeira vez. O termo "célula secundária" se refere às células em cultura, em todas as etapas subseqüentes. Por conseguinte, quando as células primárias  
5 chapeadas pela primeira vez são passadas, por exemplo, levantadas a partir de um substrato de superfície e re-chapeadas, então elas são mencionadas neste documento como células secundárias, assim como são todas as células nas passagens subseqüentes.

10 A população celular primárias, tal como definida e obtida aqui na desassociação do fígado ou parte deste pode normalmente ser heterogêneo, ou seja, ela pode compreender células pertencentes a mais de um tipo de célula que estão compreendidas no fígado. Exemplos de tipos de células que  
15 constituem o fígado incluem, mas não estão limitadas a hepatócitos, colangiócitos (células do canal biliar), células de Kupffer, células estreladas hepáticas (células Ito), células ovais hepáticas e células endoteliais. Os termos acima mencionados têm significados e estabelecidos  
20 na arte e são amplamente entendida aqui como abrangendo qualquer tipo de célula classificado como tal. Tipos de células que constituem o fígado ainda englobam células hepáticas tanto parenquimatosas quanto não-parenquimatosas.

Por meio de uma ilustração adicional, mas não  
25 limitativa, "hepatócitos" engloba epiteliais, células

hepáticas parenquimatosas incluindo, mas não limitado a hepatócitos de diferentes tamanhos (por exemplo, hepatócitos de dimensão "pequena", "média" e "grande"), ploidia (por exemplo: diplóides, tetraplóides, octaploides) ou outras características. Por exemplo, alguns autores propõem que os hepatócitos "grandes", tal como definidos aqui, são as células parenquimatosas responsáveis por funções fisiológicas do fígado, enquanto que hepatócitos "pequenos" fornecem um reservatório de células progenitoras empenhada no sentido do desenvolvimento dos hepatócitos (ver, por exemplo, Mitaka et al. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 310-7, 1995). Além disso, através de ilustração e de não limitação, "colangiócitos" englobam células epiteliais dos canais biliares. Também por meio de ilustração e não limitação, "célula oval" engloba célula de morfologia distinta (por exemplo, forma do núcleo) e célula marcadora de expressão, tal como é conhecida na arte, que se propõe a ser células progenitoras capazes de, sob certas condições, dar origem a hepatócitos e células do canal biliar (Lowe et al. *KN. 2003. J Gastroenterol Hepatol* 18: 4-12; Yi et al. 1999. *J do Hepatology* 31: 497-507).

Assim, em uma modalidade, uma população heterogênea de células hepáticas primárias pode compreender de pelo menos duas células, por exemplo, pelo menos, três ou pelo menos quatro ou mais tipos de células hepáticas,

constituindo, por exemplo, as células que pertencem a todas ou quase todos os tipos de células que constituem o fígado, incluindo, mas não limitado aos tipos de células hepáticas acima listadas. Uma pessoa versada apreciará que a  
5 heterogeneidade da população pode incluir tipos de células do fígado que tenham sido previamente descritas como tal, seja *in vivo* ou *in vitro*, bem como tipos de células do fígado, que não tenham sido anteriormente descritos, classificados, isolados e/ou caracterizados na arte.

10 Uma pessoa versada também irá apreciar que a população celular heterogêneas pode, mas não precisam compreender vários tipos de células hepáticas na mesma ou substancialmente as mesmas proporções relativas como presentes no fígado ou parte deste tendo sido dissociado.  
15 Por exemplo, uma pessoa versada sabe que particulares maneiras de desassociação dos tecidos hepáticos podem levar a uma isolação mais eficaz de um ou mais tipos de células, em comparação com um ou vários outros tipos de células, segundo a qual a suspensão das células podem ser obtida  
20 propositadamente ou inadvertidamente enriquecer o antigo ou mais tipos de células. Além disso, alguns métodos desassociação podem diferentemente afetar a sobrevivência e/ou a viabilidade de diferentes tipos de células do fígado. Além disso, uma pessoa versada na arte está bem  
25 ciente de métodos para enriquecer uma população celular

obtidas por desassociação do fígado ou parte deste para um ou mais tipos de células do fígado desejado. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a centrifugação diferencial, centrifugação gradiente do dinamismo da densidade, filtração, purificação celular, purificação da afinidade, digestão por protease, ou algo do gênero.

Em uma modalidade, a heterogeneidade da população primárias das células do fígado pode incluir células que pertencem a todos ou substancialmente todos os tipos de células que constituem o fígado. Os presentes inventores realizaram um método para a obtenção de um tipo não revelado anteriormente de célula-tronco ou progenitora proveniente do fígado. No entanto, os inventores não desejam vincular por qualquer hipótese sobre a origem da dita nova células-tronco ou progenitoras.

Por meio de exemplo e não de limitação, a dita célula-tronco ou progenitora, ou uma antecessora da mesma, pode ter estado presente no fígado, por exemplo, no parênquima ou não-parênquim do messo. Por exemplo, tal antecessora poderá ter tido fenótipo idêntico, similares ou diferentes a partir do isolamento das células-tronco ou progenitoras (por exemplo, cultivar de acordo com a invenção pode ter alterado o fenótipo da antecessora). Alternativamente, ou, em adição, as células-tronco ou progenitoras isoladas podem ter surgido devido à alteração,

por exemplo, a diferenciação ou de diferenciação, de um ou mais tipos de células do fígado, por exemplo, um tipo de célula do fígado que tem ou não tenha sido previamente conhecidas. Tendo em vista, o método da presente invenção  
5 pode preferivelmente começar a partir de uma população celular representativa de todos ou substancialmente todos os tipos de células do fígado.

Os inventores perceberam que as células-tronco ou progenitoras da invenção podem ser vantajosamente obtidas a  
10 partir de uma célula da população formada por desassociação do fígado ou parte deste, onde a referida população celular compreende hepatócitos. Assim, um método adequado para desassociação do fígado ou parte deste, de acordo com a invenção representa uma população celular que compreende  
15 hepatócitos. Sem se prender a nenhuma teoria, os inventores pensaram que as células-tronco ou progenitoras da invenção, ou uma antecessora, é co-liberada a partir de tecido hepático por desassociação do fígado de maneira que libera pelo menos hepatócitos do fígado.

20 Em uma modalidade, o método de desassociação do fígado ou parte deste pode formar uma população celular que compreende uma proporção de hepatócitos que é pelo menos cerca de 10% pelo menos cerca de 20% pelo menos 30% pelo menos 40%, preferivelmente, pelo menos, cerca de 50%, por  
25 exemplo, pelo menos, 60%, mais preferivelmente, pelo menos,

cerca de 70%, por exemplo pelo menos cerca de 80%, mais preferivelmente ainda, pelo menos, cerca de 90% ou mais como, por exemplo, pelo menos, cerca de 95% pelo menos cerca de 96% pelo menos cerca de 97% pelo menos cerca de 98%  
5 ou pelo menos cerca de 99%. Os inventores compreenderam que o método de desassociação do fígado ou parte deste que forma uma população celular que compreende uma proporção substancial dos hepatócitos, por exemplo pelo menos cerca de 50% ou mais como acima, prevê populações de células de  
10 partida conveniente para a obtenção de células-tronco ou células progenitoras da invenção.

Em uma modalidade preferida, uma população celular que compreende as percentagens acima dos hepatócitos podem ser obtidas pela desassociação do fígado ou parte deste,  
15 sem incluir etapas para enriquecer ainda mais a população celular de hepatócitos e/ou outros tipos celulares.

Em outra modalidade, uma população celular que compreende as percentagens acima de hepatócitos pode ser obtida pela desassociação do fígado ou parte deste e um ou  
20 mais etapas novas para enriquecer a população celular de hepatócitos e/ou outros tipos de células, esp. para hepatócitos.

No entanto, uma pessoa versada irá apreciar que as células-tronco ou progenitoras da invenção ou antecessoras  
25 pode ser libertada do fígado desassociação sob condições

adequadas para libertar hepatócitos deste, pode, mas não precisam sempre de, co-purificar com hepatócitos, ou um ou mais subgrupos de hepatócitos (por exemplo, hepatócitos "grandes" ou "pequenos"), ou outros tipos de células, nos  
5 métodos para enriquecer uma população celular de hepatócitos, subgrupos do mesmo, ou outros tipos de células. É dentro da capacidade de uma pessoa versada para selecionar métodos para enriquecer hepatócitos ou outros tipos de células, esp. por hepatócitos, que mantêm as  
10 células-tronco ou progenitoras da invenção, ou antecessoras, resultando na população celular.

Além disso, uma pessoa versada, compreenderá que as células-tronco ou progenitoras da invenção, ou uma antecessora, pode ter certas propriedades (por exemplo,  
15 propriedades físicas ou superfície marcadora de expressão) que podem permitir que seu enriquecimento na população celular obtidas a partir do fígado, utilizando uma técnica de separação adequada. Pode estar dentro do alcance de uma pessoa versada determinar qual fração de uma população  
20 celular separada em função de um ou mais critérios compreende, ou é enriquecida para, as células-tronco ou progenitoras da invenção, ou uma antecessora. Isto pode ser feito, por exemplo, pela cultura das células dos vários testes de fração de acordo com o método da invenção e  
25 verificar qual o rendimento da fração ou frações das

células-tronco ou progenitoras da invenção.

Uma "população enriquecida" de células se refere a uma população celular em que um ou mais tipos de células estão presentes em maiores proporções do que a relação que  
5 poderia ser encontrada *in vivo* ou na população celular submetida ao enriquecimento.

Plaqueamento de células primárias provenientes do tecido hepático

O método da invenção compreende cultivar a população  
10 de célula primária obtida por dissociar o tecido hepático, como explicado. Para este objetivo, a população principal das células do fígado é chapeada sobre um substrato que permite a aderência de células.

O termo "galvanoplastia" é aqui utilizado como  
15 sinônimo de semeadura ou inoculação, e, em geral, se refere à introdução de uma população celular *in vitro* em um ambiente capaz de promover a sobrevivência e/ou crescimento das células introduzidas. Tipicamente, o dito ambiente pode ser feito em um sistema que é devidamente delimitado a  
20 partir do meio envolvente, de tal forma que se possa evitar uma troca indesejável de matéria entre o meio ambiente e as ditas imediações (evitando assim, por exemplo, a contaminação do meio ambiente ou escapamento do meio de cultura ou células deste), enquanto que pode permitir a  
25 troca contínua ou intermitente de outros componentes de

matérias úteis entre os componentes o dito ambiente e arredores (por exemplo, uma troca ocasional de uma parte ou todo o meio de cultura, a troca continua de gases, ou a colheita de células após a cultura, etc.) Normalmente, 5 ambientes adequados para a cultura de células podem ser gerados em meios de cultura bem conhecidos na arte, como, por exemplo, frascos para cultura celular, placas e pratos de poço de vários formatos.

Na presente invenção, células (por exemplo, células 10 primária do fígado) são chapeadas sobre um substrato que permite a aderência de células, ou seja, uma superfície que geralmente não é repugnante a adesão celular ou anexação. Isso pode ser realizado, por exemplo, por plaqueado as células em sistema de cultura (por exemplo, um meio de 15 cultura), que exhibe uma ou mais superfícies de substrato compatíveis com a adesão celular. Quando a dita uma ou mais superfícies de substrato cantata a suspensão de células (por exemplo, a suspensão em um médio) introduzidos no sistema de cultura de células, a aderência entre as células 20 e a superfícies de substrato pode ser assegurada. Assim, a expressão "plaquear em um substrato que permite a aderência de células neste" se refere à introdução de células em um sistema que apresenta pelo menos uma superfícies de substrato que é geralmente compatível com a aderência das 25 células, de tal forma que as células chapeadas possam

entrar em contato com a dita superfície de substrato. EM princípios gerais de manutenção de culturas de células aderentes são bem conhecidos na arte.

Em geral, um substrato que permite a aderência de  
5 células que pode ser substancialmente qualquer substrato hidrofílico. Como são conhecidas na arte, meio de cultura, por exemplo, frascos de cultura, placas de poço, pratos, ou similares, pode ser normalmente feitos de uma grande variedade de materiais poliméricos incluindo, mas não  
10 limitado a poliacrilato, polimetilacrilato, policarbonatos, poliestirenos, polissulfonas, polihidroxiácidos, polianidridos, poliortoésteres, polifosfaceno, polifosfatos, de poliésteres, náilons ou misturas destes, etc. Geralmente, meios de culturas feitos de tais materiais  
15 são feitos de superfície tratada após moldagem para prover superfícies de substrato hidrofílica, aumentando assim a probabilidade de uma ligação celular efetiva.

A superfície de tratamento pode tomar a forma de uma superfície de revestimento, ou pode envolver o uso de  
20 energia dirigida à superfície com a intenção de gerar grupos químicos sobre a superfície polimérica. Estes grupos químicos terão uma afinidade geral para água ou por outro modo polaridade suficientes para permitir a adsorção estável para outro grupo polar. Estes grupos funcionais  
25 permitem a hidrofiliabilidade e ou um aumento da superfície de

oxigênio e são propriedades reconhecidas para aumentar o crescimento celular sobre as superfícies de substratos modificadas. Esses grupos químicos podem incluir grupos, tais como as aminas, amidas, carbonilas, carboxilatos, 5 ésteres, hidroxilas, sulfidrila e similares. Exemplos de energias dirigidas incluem descargas atmosféricas corona, radiofrequência (RF) tratamento por plasma a vácuo, Descarga de brilho DC de tratamento a plasma (por exemplo, US 6,617,152). O padrão das práticas atuais para 10 crescimento de células aderentes pode envolver a utilização de meios químicos definidos com adição de animais de espécies se soro bovino, humano ou de outro soro animal. O soro adicionado, para fornecer nutrientes e/ou promotores de crescimento, também podem promover a adesão celular com 15 as superfícies tratadas com revestimento plástico com uma camada de matriz de células que podem aderir melhor.

Uma superfície de substrato alternativa compatível com a adesão celular pode ser de vidro, opcionalmente a superfície tratada para introduzir grupos funcionais, como, 20 por exemplo, listados acima, para aumentar a sua hidrofiliabilidade.

Outras superfícies de substrato aderente podem ser geradas por meio de superfície de revestimento, por exemplo, os revestimentos de superfícies poliméricas ou 25 superfícies poliméricas tratadas como acima. Em um exemplo

não-limitativo pode envolver policátions, tais como, por exemplo, poliomitina ou polilisina.

Em outro exemplo, o revestimento preferido, e, conseqüentemente o substrato compreendendo um ou mais  
5 componentes de matriz extracelular, por exemplo, as proteínas ECM, fibrina, laminina, colágeno, preferivelmente colágeno tipo 1, glicosaminoglicanos, por exemplo, heparina ou sulfato de heparano, fibronectina, gelatina, vitronectina, elastina, tenascina, agrecana, agrina,  
10 sialoproteína do osso, cartilagem de matriz protéica, fibrinogênio, fibulina, mucinas, entactina, osteopontina, plasminogênio, restrictina, serglicina, SPARC/osteonectina, versicana, trombospondina 1, ou células de adesão moléculas incluindo caderina, conexinas, selectinas, por si só ou em  
15 várias combinações.

Exemplos preferidos podem incluir fibrina, laminina ou colágeno. Outros exemplos preferidos podem envolver composições compreendendo componentes ECM, tais como, por exemplo, Matrigel® Basement Membrane Matrix (BD  
20 Biosciences), que é a preparação membrana basal solubilizada extraída do sarcoma EHS do camundongo, um tumor ECM rico em proteínas, com laminina como um importante componente, seguido de colágeno tipo 4, sulfato de heparano proteoglicanos, e entactina.

25 Uma modalidade preferida inclui revestimento que

consiste de ou compreende colágeno, esp. colágeno tipo 1.

Como apreciado por aqueles versados na arte, as células podem ser contadas de forma a facilitar o posterior plaqueamento das células em uma densidade desejada. Como na  
5 presente invenção, quando as células são plaqueadas estas podem primeiro aderir a superfície de substrato presente no sistema de cultura (por exemplo, em um meio de cultura), a densidade pode ser expressa em número de células por  $\text{mm}^2$  ou placas por  $\text{cm}^2$  da dita superfície de substrato. Na presente  
10 invenção, a densidade da desassociação primária é obtida a partir de células do fígado ou parte deste e pode estar entre  $1 \times 10^6$  célula/ $\text{mm}^2$ , por exemplo, entre  $1 \times 10^1$  e  $1 \times 10^5$  células/ $\text{mm}^2$  entre  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^5$  células/ $\text{mm}^2$ , por exemplo, entre  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^5$  células/ $\text{mm}^2$ , entre  $5 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^1$   
15 e  $1 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ , entre  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^4$ , entre  $5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^4$  células/ $\text{mm}^2$ , entre  $1 \times 10^1$  e  $1 \times 10^3$ , entre  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^4$ , por exemplo, cerca de  $1 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^1$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ , ou  $1 \times 10^5$  células/ $\text{mm}^2$ .

20 Normalmente, após o plaqueamento das células primária do fígado, a suspensão celular é deixada em contato com a superfície aderente para permitir a adesão de células da população celular ao dito substrato. Em contato com as células hepáticas primárias substrato aderente, as células  
25 podem ser vantajosamente suspensas em um ambiente que

compreende pelo menos um meio, nos métodos da invenção tipicamente um meio líquido, que apóia a sobrevivência e/ou crescimento das células. O meio pode ser adicionado ao sistema antes, junto com ou após a introdução das células  
5 deste.

O meio pode ser fresco, ou seja, que não foi usado anteriormente para a cultura de células, ou pode compreender pelo menos, uma parte que tenha sido condicionada previamente pela cultura de células, por  
10 exemplo, a cultura de células que estão sendo chapeadas ou antecessoras destas, ou cultura de células mais distantes relacionadas com as células ou não relatada a serem chapeadas.

Para facilitar a dita aderência, em modalidades, a  
15 suspensão da célula principal pode ser contatada com a superfície aderente por pelo menos cerca de 0 h, por exemplo, pelo menos cerca de 1h, preferivelmente por pelo menos cerca de 2h, por exemplo, pelo menos cerca de 4h, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 8h, por exemplo,  
20 por pelo menos cerca de 12h, até mesmo mais preferivelmente por pelo menos cerca de 16h, por exemplo, por menos cerca de 20h, e mais preferivelmente por pelo menos cerca de 20 horas ou mais, por exemplo, por pelo menos, cerca de 30, 32, 36, 40, 44 ou 48h.

25 Em outras modalidades preferidas, a suspensão da

célula principal pode ser contatada com a superfície aderente entre cerca de 2h e cerca de 48h, por exemplo, entre cerca de 12h e cerca de 48h, preferivelmente entre cerca de 12h e cerca de 36h, por exemplo, entre cerca de 5 16h e cerca de 32h, ainda mais preferivelmente entre cerca de 20h e cerca de 28h, e mais preferivelmente por cerca de 24h.

Apesar dos tempos acima serem preferidos, tempos mais curto ou mais longo podem também prever a anexação de 10 células compatíveis com a presente invenção, e uma pessoa versada na arte pode otimizar esses tempos.

Após as células da população celular do fígado primárias que são permitidas a se anexarem ao substrato aderente, tal como descritas acima, as matérias não- 15 aderentes são removidas do sistema de cultura. Matérias não-aderentes podem incluir, mas não se limitam às células que não tenham sido anexadas ao substrato aderente (como, por exemplo, as células que não são propensas à aderência, ou células que não se anexam dentro do tempo permitido), 20 portanto são não viáveis ou células mortas, restos celulares, etc. matérias aderentes não podem ser normalmente removidas por meio de descarte do sistema de cultura, sendo que as células aderentes permanecem ligadas ao substrato e, opcionalmente, fazem a lavagem, de uma vez 25 ou repetidamente, as células aderentes e o sistema de

cultura com meio adequado ou tampão isotônico (por exemplo, PBS). Nestes termos, as células da população celular hepáticas primárias, que tem aderido à superfície do substrato, são selecionadas para uma cultura adicional.

5 O ambiente no qual as células podem se anexar compreende pelo menos um meio, nos métodos da invenção tipicamente um meio líquido, que suporta a sobrevivência e/ou de crescimento das células. O suporte pode ser adicionado ao sistema antes, junto, ou após a introdução  
10 das células deste. O meio pode ser fresco, ou seja, que não foi usado anteriormente para a cultura de células, ou pode compreender pelo menos, uma parte que tenha sido condicionada previamente pela cultura de células, por exemplo, a cultura de células que estão sendo chapeadas ou  
15 antecessoras destas, ou cultura de células mais distantes relacionadas com as células ou não relatada a serem chapeadas.

O meio pode ser um meio para cultura adequado, como descrito em outras partes deste relatório descritivo.

20 Preferencialmente, a composição do meio pode ter as mesmas características, pode ser o mesmo ou substancialmente o mesmo da composição do meio usados nas etapas subseqüentes ao cultivo das células anexadas. Caso contrário, o meio pode ser diferente. Vantajosamente, o  
25 meio pode compreender soro ou plasma, o que pode facilitar

ainda mais a aderência da célula.

Cultivo de células primária provenientes do tecido hepático

As células da população primária, que aderiram ao  
5 dito substrato, preferivelmente no dito ambiente, são  
cultivadas posteriormente, por pelo menos 7 dias, por  
exemplo, por pelo menos 8 dias ou por pelo menos 9 dias,  
preferencialmente, por pelo menos 10 dias, por exemplo,  
pelo menos 11 ou pelo menos 12 dias, pelo menos 13 dias ou  
10 pelo menos 14 dias, mais preferivelmente por pelo menos 15  
dias, por exemplo, por pelo menos 16 dias, ou por pelo  
menos 17 dias, ou até mesmo por pelo menos 18 dias, por  
exemplo, por pelo menos 19 dias ou pelo menos 20 dias ou  
mais. O termo "cultura" é comum na arte e se refere de  
15 maneira ampla a manutenção e/ou de crescimento de células  
e/ou descendentes da mesma.

Na modalidade, as células primárias podem ser  
cultivadas por pelo menos entre cerca de 10 dias e cerca de  
40 dias, preferivelmente por pelo menos, entre cerca de 15  
20 dias e cerca de 35 dias, por exemplo, por pelo menos entre  
cerca de 15 dias e 20 dias, tal como, por pelo menos cerca  
de 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 dias. Preferencialmente, as  
células primárias podem ser então cultivadas por um período  
não maior do que 45 dias, ou no mais tardar 50 dias, ou no  
25 mais tardar ainda 60 dias.

Como apreciado por aqueles versados na arte, o prolongamento da cultura de células em um sistema de cultura pode tornar necessário uma troca regular do meio de cultura para um novo meio. Uma pessoa versada é capaz de

5 avaliar a necessidade de trocar o meio através do controle dos parâmetros da cultura celular, tais como, por exemplo, o pH, a densidade celular ou aparência da célula. Tipicamente, o meio pode ser modificado em intervalos regulares, por exemplo, a cada 1 a 10 dias, preferivelmente

10 entre 16 e 32 horas (por exemplo, cerca de 24 horas) após o plaqueamento e, em seguida, preferivelmente a cada 2 a 6 dias, ou mais preferivelmente a cada 2 a 4 dias, por exemplo, cerca de cada 2, 3 ou 4 dias. O volume de todo meio pode ser alterado ou, alternativamente, apenas parte

15 do meio pode ser mudado, de tal forma que uma porção do meio condicionado para o cultivo de células anteriores é mantida. Em uma modalidade, todo o volume do meio é substancialmente trocado por um meio novo. Em outra modalidade preferida, o meio não é trocado durante cultivo

20 prolongado das células.

A suspensão da célula primária e mais células aderentes são cultivadas na presença de um meio de cultura líquido. Tipicamente, o meio terá uma formulação do meio basal como conhecida na arte. Muitas formulações do meio

25 basal (disponível, por exemplo, a partir do American Type

Culture Collection, ATCC, ou a partir de Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) pode ser utilizada para a cultura de células primárias neste documento, incluindo, mas não limitado a Eagle's Minimum Essential Medium (MEM),  
5 Dulbecco's Modificado Eagle's Medium (DMEM), alfa modificado Minimum Essencial Médium (alfa-MEM), Basal Medium Essencial (BME), Iscove's Modified Dulbecco's Médium (IMDM), BGJb medium, F-12 Nutrient Mistura (HAM), Liebovitz L-15, DMEM/F-12, Essential Modified Eagle Médium (EMEM),  
10 RPMI-1640, Médium 199, Weymouth's MB 752/1 ou Williams Médium E, e modificações e/ou combinações dos mesmos. Composições dos meios basais acima são geralmente conhecidas na arte, e estão dentro da habilidade na arte de modificar ou modular as concentrações dos meios e/ou  
15 complementos dos meios quando necessários para o cultivo das células. Em uma modalidade preferida uma formulação do meio basal diferente de Williams Medium E, que é uma rica formulação relatada para sustentar cultura *in vitro* de células do fígado adulto. Outras modalidades podem empregar  
20 mais formulações do meio basal, tais como as que foram escolhidas a partir das acima.

Tais formulações do meio basal que contêm ingredientes necessários para o desenvolvimento de células de mamíferos, são conhecidos por si só. Por meio de  
25 ilustração e não de limitação, esses ingredientes podem

incluir sais inorgânicos (particularmente, contendo sais Na, K, Mg, Ca, Cl, P e possivelmente, Cu, Fe, Se e Zn), tampões fisiológicos (por exemplo, HEPES, bicarbonato), nucleótidos, nucleósidos e/ou bases de ácidos nucléicos, ribose, desoxirribose, aminoácidos, vitaminas, antioxidantes (por exemplo, glutathiona) e das fontes de carbono (por exemplo, glicose, piruvato, por exemplo, piruvato de sódio, acetato, por exemplo, acetato de sódio), etc. Será ainda evidente que muitos meios estão disponíveis como formulações de baixa glicose, com ou sem piruvato de sódio.

Para utilização na cultura, o meio basal pode ser fornecido com um ou mais componentes. Por exemplo, suplementos adicionais podem ser usados para fornecer as células com os elementos de traço necessários e substâncias necessárias para a otimização do crescimento e expansão. Tais suplementos incluem insulina, transferrina, selênio sais, e suas combinações. Esses componentes podem ser incluídos em uma solução de sal, tais como, mas não limitado a, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Earle's Salt Solution. Outras suplementos antioxidantes podem ser adicionados, por exemplo,  $\beta$ -mercaptoetanol. Enquanto muitos meios basais já contêm aminoácidos, alguns aminoácidos podem ser complementados mais tarde, por exemplo, L-glutamina, que é conhecida por ser menos estável quando em

solução. O meio pode ainda ser fornecido com antibióticos e/ou compostos antimicóticos, tais como, normalmente, misturas de penicilina e estreptomicina, e/ou de outros compostos, exemplificada, mas não limitado a, anfotericina, 5 ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, ácido micofenólico, ácido nalidíxico, neomicina, nistatina, paromomicina, polimixina, puromicina, rifampicina, espectinomicina, tetraciclina, tilosina, e zeocina.

10 Os hormônios também pode ser vantajosamente utilizados na cultura celular e incluem, mas não estão limitados a D-aldosterona, dietilstilbestrol (DES), dexametasona, estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormônio do 15 crescimento humano (HGH), tirotropina, tiroxina, L-tironina, fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF). Células do fígado também podem se beneficiar do cultivo com triioditironina,  $\alpha$ -tocoferol acetato, e glucagono.

20 Os lipídios e portadores lipídicos também podem ser utilizado para complementar os meios de cultura celular. Esses lipídeos e portadores podem incluir, mas não estão limitados a ciclodextrina, colesterol, ácido linoleico conjugado com albumina, ácido oleico e ácido linoleico 25 conjugado com albumina, ácido linoleico não conjugado,

ácido araquidônico oléico linoléico conjugado a albumina, ácido oleico conjugado e não conjugado a albumina, entre outros. Albumina pode igualmente ser usada em ácidos graxos livres de formulações.

5 Também está contemplada a suplementação do meio de cultura celular com plasma ou soro de mamíferos. Plasma ou soro muitas vezes contém fatores celulares e componentes que são necessários para a viabilidade e expansão. A utilização adequada do soro também é contemplada.

10 O termo "plasma" é como convencionalmente definido. O plasma é normalmente obtido a partir de uma amostra de todo o sangue, que é fornecida ou contatada com um anticoagulante, tais como heparina, citrato (por exemplo, citrato de sódio ou ácido citrato dextrose), oxalato ou  
15 EDTA, durante ou logo após a colheita do sangue, para prevenir a coagulação. Portanto, o termo plasma se refere a uma composição que não faz parte de um corpo humano ou animal.

O termo "soro" é definido como convencionalmente. O  
20 soro pode ser obtido geralmente a partir de uma amostra de todo o sangue, permitindo que a primeira coagulação tome lugar da amostra e, conseqüentemente separando o assim para formar o coágulo e os componentes celulares da amostra sangue dos componentes líquidos (soro) com uma técnica  
25 adequada, geralmente por centrifugação. Um catalisador

inerte, por exemplo, esferas de vidro ou pó, podem facilitar a coagulação. Vantajosamente, o soro pode ser preparado utilizando tubo separador de soro (SST) conhecidos na arte, que contêm os catalisador para  
5 facilitar a coagulação e ainda incluir gel com uma densidade projetada para ser posicionada entre o componente líquido e os coágulos e os componentes celulares após a centrifugação, simplificando a separação. Alternativamente, o soro pode ser obtido a partir de plasma pela remoção do  
10 anticoagulante e fibrina. O termo "soro", portanto, se refere a uma composição que não faz parte de um corpo humano ou animal.

Os plasmas ou soros isolados podem ser usados diretamente nos métodos da presente invenção. Eles também  
15 podem ser armazenados adequadamente para uma utilização posterior do método da presente invenção. Tipicamente, o plasma ou soro pode ser armazenado por curtos períodos de tempo, por exemplo, até cerca de 1-2 semanas, a uma temperatura acima dos respectivos pontos de  
20 congelamento do plasma ou soro, mas abaixo da temperatura ambiente. Normalmente, essa temperatura será de cerca de 15°C ou menos, preferivelmente cerca de 10°C ou menos, mais preferivelmente cerca de 5°C ou menos, por exemplo, cerca de 5°C, 4°C, 3°C, 2°C ou cerca de 1°C, a maior parte  
25 preferivelmente cerca de 5°C ou cerca de 4°C.

Alternativamente, o plasma ou soro pode ser armazenado em sob seus respectivos pontos de congelamento, ou seja, armazenagem sob congelamento. Como é habitual na arte, o armazenamento sob temperaturas de congelamento do plasma ou soro pode ser de cerca de  $-70^{\circ}\text{C}$  ou menos, por exemplo, 5 cerca de  $-75^{\circ}\text{C}$  ou menos cerca de  $-8^{\circ}\text{C}$  ou menos. Essas temperaturas podem impedir vantajosamente o descongelamento do plasma ou soro armazenados, preservando assim a qualidade destes. O armazenamento sob congelamento pode ser 10 utilizado independentemente do período de tempo para o qual o plasma ou soro deve ser armazenado, mas pode ser particularmente adequado quando se exige mais tempo de armazenagem, por exemplo, por mais de alguns dias ou semanas por um período superior a 1 ou 2 semanas.

15 Antes do armazenamento ou uso, os plasmas isolados ou soro pode ser inativados ao calor. A inativação do calor é usada na arte principalmente para remover o complemento. A inativação do calor normalmente envolve incubar o plasma ou soro a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 a 60min, por exemplo, 30min, com 20 mistura estável, após o qual o plasma ou soro é permitido a resfriar a gradualmente à temperatura ambiente. Uma pessoa versada deve ter conhecimento que eventuais modificações e exigências do referido processo podem ocorrer.

Opcionalmente, o plasma ou soro pode também ser 25 esterilizado antes do armazenamento ou utilização. Meios

habituais de esterilização podem envolver, por exemplo, filtração através de um ou mais filtros com poros menores que 1  $\mu\text{m}$ , preferivelmente menor que 0,5  $\mu\text{m}$ , por exemplo, menor que 0,45  $\mu\text{m}$ , 0,40  $\mu\text{m}$ , 0,35  $\mu\text{m}$ , 0,30  $\mu\text{m}$  ou 0,25  $\mu\text{m}$ ,  
5 mais preferivelmente 0,2  $\mu\text{m}$  ou menor, por exemplo, 0,15  $\mu\text{m}$  ou menor, 0,10  $\mu\text{m}$  ou menor.

Os soros ou plasmas adequados para utilização nos meios da presente invenção pode incluir soro ou plasma humanos, ou soro ou plasma de animais não-humanos,  
10 preferivelmente mamíferos não humanos, tais como, por exemplo, primatas não humanos (por exemplo, lêmures, chimpanzés, macacos), fetos ou adultos bovinos, cavalo, suíno, ovino, caprino, cachorro, coelho, camundongo ou soro ou plasma de rato, etc. Em outra modalidade, a invenção  
15 prevê o uso de qualquer combinação dos plasmas e/ou soro acima.

Assim sendo, em uma modalidade, o soro ou plasma pode ser obtido a partir de um organismo da mesma espécie das espécies das quais as células do fígado primária são  
20 obtidas. Em um exemplo não limitativo, o soro humano ou plasma podem ser utilizados para a cultura de células hepáticas primárias humano.

Em outra modalidade preferida, o meio compreende soro ou plasma bovino, preferivelmente soro ou plasma de feto de  
25 bovino (bezerro), mais preferivelmente soro de feto bovino

(bezerro) (FCS ou FBS).

Em outra modalidade, o meio utilizado para cultura de células hepáticas primárias humano compreende soro ou plasma bovino, preferivelmente soro ou plasma do feto 5 bovino (bezerro), mais preferivelmente soro do feto bovino (bezerro) (FCS ou FBS).

Nas modalidades, o meio compreende entre cerca de 0,5% e cerca de 40% (v/v) de soro ou plasma ou soro de substituição, preferivelmente entre cerca de 5% e 20% 10 (v/v), por exemplo, entre cerca de 5% e 15% (v/v), mais preferivelmente entre cerca de 8% (v/v) e cerca de 12% (v/v), por exemplo, cerca de 10% (v/v) de soro ou plasma ou soro de substituição, esp. o soro ou plasma preferido, tal como definido anteriormente.

15 Em uma nova modalidade preferida, o meio utilizado para células hepáticas primárias humano compreende soro ou plasma bovino, preferivelmente soro ou plasma de feto bovino (bezerro), mais preferivelmente soro de feto de bovino (bezerro) (FCS ou FBS), no valor de entre cerca de 20 0,5% e cerca de 40% (v/v), preferivelmente entre cerca de 5% e 20% (v/v), por exemplo, entre cerca de 5% e 15% (v/v), mais preferivelmente entre cerca de 8% (v/v) e cerca de 12% (v/v), por exemplo, cerca de 10%.

Ainda em outras modalidades, um meio pode incluir 25 plasma ou soro provenientes de mais de uma espécie. Por

exemplo, o meio pode incluir uma mistura de soro ou plasma provenientes de uma espécie correspondente à cultura de células hepáticas primárias, e de outra espécie. Por exemplo, um meio para cultivar células do fígado humano  
5 pode incluir uma mistura de soro ou plasma humano, preferivelmente soro humano, plasma ou soro bovino, preferivelmente soro de bovino.

Adicionalmente, o meio pode preferivelmente, compreender pelo menos uma exógena (isto é, em adição ao  
10 plasma ou soro) adicionado o fator de crescimento. Uma pessoa versada apreciaria que os componentes ordinários do meio basal (antes da adição do soro ou plasma), por exemplo, particularmente, solução salina, tampões, sais inorgânicos, aminoácidos, fontes de carbono, vitaminas,  
15 antioxidantes, indicadores pH e antibióticos, não são considerados fatores de crescimento ou fatores de diferenciação na arte. Por outro lado, soro ou plasma é uma composição complexa que possivelmente compreende um ou mais desses fatores de crescimento ou fatores de crescimento.

20 O termo "fator de crescimento", conforme usado neste documento se refere a uma substância biologicamente ativa que influencia na proliferação, crescimento, diferenciação, sobrevida e/ou migração de vários tipos de células, e pode dar efeito de mudanças funcionais, morfológicas e de  
25 desenvolvimento em um organismo, por si só ou quando

modulado por outras substâncias. Um fator de crescimento em  
pode tipicamente agir por ligação, como um ligante, para um  
receptor (por exemplo, superfície ou receptor intracelular)  
presente nas células respondam ao fator de crescimento. Um  
5 fator de crescimento aqui pode ser particularmente uma  
entidade protéica que compreende uma ou mais cadeias  
polipeptídicas.

Por meio de exemplo e não de limitação, o termo  
"fator de crescimento" engloba os elementos da família do  
10 fator de crescimento fibroblastos (FGF), família das  
proteínas morfogênicas ósseas (BMP), família do fator de  
crescimento derivado de plaquetas (PDGF), família do fator  
de crescimento beta transformado (TGF-beta), família do  
fator de crescimento do nervo (NGF), família do fator de  
15 crescimento epidérmico (EGF), família do fator de  
crescimento relacionado a insulina (IGF) familiar, família  
do fator de crescimento hepatócitos (HGF), fatores de  
crescimento hematopoiéticos (HeGFs), o fator de crescimento  
de células as endoteliais derivadas de plaquetas (PD-ECGF),  
20 angiopoietina, fator de crescimento endotelial vascular  
(VEGF) familiar, glucocorticóides, e similares.

Em uma modalidade preferida, o meio compreende um  
fator de crescimento que é um elemento do fator de  
crescimento epidérmico (EGF) familiar. Em uma modalidade  
25 adicional, o dito elemento da família EGF em qualquer

escolha do grupo que compreende anfiregulina, betacelulina, EGF, epiregulina, HB-EGF (fator de crescimento ligado a heparina como EGF), NRG1 (neuregulina-1) isoforma GGF2, NRG1 isoforma SMDF, NRG1-alfa, beta-NRG1, TGF-alfa, 5 tomoregulina-1 e TMEFF2. Em uma modalidade particularmente preferida, o meio compreende EGF.

Em uma modalidade adicional, o meio compreende um fator de crescimento que é um elemento de insulina relacionado à família do fator de crescimento (IGF). Em uma 10 modalidade adicional, o referido membro da família IGF é escolhidos do grupo que consiste de insulina IGF1A (fator de crescimento como isulina 1A), IGF1B, IGF2, INSL3 (como insulina 3), INSL5, INSL6 e relaxina. Em uma modalidade particularmente preferida, o meio compreende insulina.

15 Em uma modalidade adicional, o meio compreende um fator de crescimento que é um glicocorticóide. Em uma modalidade adicional, a dita glicocorticóide é qualquer uma escolhida do grupo composto de dexametasona, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, 20 prednisona, triancinolona, hidrocortisona, fluocinolona, cortisona, betametasona. Em uma modalidade particularmente preferida, o meio compreende dexametasona.

Em modalidade preferida adicional, o meio pode compreender uma combinação de duas ou mais fatores 25 exogenamente acrescentada aos fatores de crescimento ou

fatores de crescimento preferidos acima definidos. Por meio de exemplo e não de limitação, o meio pode compreender EGF e insulina, ou EGF e dexametasona, ou insulina e dexametasona, ou cada EGF, insulina e dexametasona; um meio  
5 compreendendo estes fatores de crescimento adicionados exogenamente pode preferivelmente compreender soro ou plasma, tal como definido na modalidade acima.

Uma pessoa versada geralmente conhece as concentrações nas quais os fatores de crescimento podem  
10 induzir um efeito, esp. em células cultivadas *in vitro*, e pode usar essas concentrações para os fatores de crescimento mencionado acima. Por meio de exemplo e não de limitação, EGF pode ser utilizada normalmente em concentrações de cerca de 0,1 ng/ml e 1 µg/ml e,  
15 preferivelmente, entre 1ng/ml e 100ng/ml, por exemplo, a cerca de 25ng/ml; a insulina pode ser utilizada normalmente em concentrações entre cerca de 0,1 µg/ml e 1mg/ml e, preferivelmente, entre cerca de 1 µg/ml e 100 µg/ml, por exemplo, a cerca de 10 µg/ml; a dexametasona pode ser  
20 utilizada normalmente em concentrações de cerca de 0,1 nM e 1 µM, preferivelmente entre cerca de 1nM e 100nM, por exemplo, a cerca de 10nM.

Em uma modalidade preferida, esp. onde o método é utilizado para células do fígado humano, o fator de  
25 crescimento usado no presente método pode ser um fator de

crescimento humano. Como usado aqui, o termo "fator de crescimento humano" se refere a um fator de crescimento substancialmente idêntico ao que ocorre naturalmente em um fator de crescimento humano. Por exemplo, quando o fator de crescimento é uma entidade protéica, o(s) peptídeo(s) ou polipeptídeo(s) constituinte(s) destes pode ter seqüência aminoácida primária idêntica para um fator de crescimento humano que ocorre naturalmente. O uso dos fatores de crescimento humano, no presente método é preferido, como tais fatores são o crescimento esperado para obter um efeito desejável na função celular.

Como descrito, os presentes inventores perceberam que a cultura primária de células do fígado pela duração dos tempos, tal como definida anteriormente, e preferivelmente usando as composições do meio, como descritas acima, uma célula-tronco ou progenitora da invenção surge e prolifera, ao mesmo tempo em que tipos de células diferenciadas do fígado se tornam menos prevalente na cultura prolongada de células hepáticas primárias. Sem estar limitado a qualquer hipótese, os tipos de células diferenciadas do fígado, por exemplo, podem falhar na proliferação, morrerem e/ou serem retro-diferenciados durante o cultivo prolongado. Conforme detalhado na seção experimental, as células-tronco ou progenitoras podem ser distinguidas de outros tipos de células presentes na cultura de célula

primária, pela sua morfologia entre outras, que de acordo com o conhecimento dos inventores pode ser denominado mesenquimais ou morfologia similar a mesenquimal e pode normalmente incluir uma forma achatada, citoplasma amplo e  
5 núcleos ovóides com um ou dois nucléolos.

Os inventores também perceberam que o surgimento, a proliferação e enriquecimento da cultura primária para as referidas células-tronco ou progenitoras podem ser promovida através da alteração da cultura, de modo que  
10 favorece ainda a eliminação de um ou mais tipos de células diferenciadas do fígado, esp. de hepatócitos que pode prevalecer em uma cultura de células primária do fígado isolada. Em tais condições, as células-tronco ou progenitoras da invenção podem vantajosamente proliferar e  
15 se tornar um tipo de célula prevalente na cultura de células do fígado primária. Os tipos de células hepáticas diferenciadas podem ser perdidos, por exemplo, porque um ou mais tipos de células diferenciadas são fisicamente reduzidas ou eliminadas durante a cultura;  
20 alternativamente, o fenótipo diferenciado pode ser diminuído, porque um ou mais tipos de células retro-diferenciada durante a cultura.

Qualquer meio que favorece a eliminação de um ou mais tipos de células hepáticas diferenciadas, esp. hepatócitos,  
25 enquanto sustenta a proliferação das células-tronco ou

progenitoras da invenção (como pode ser facilmente avaliada, por exemplo, por inspeção visual da cultura celular para a prevalência dos diferentes tipos de células) pode ser usado. Por meio de ilustração, como exemplificado

5 pelos inventores, uma alteração pode ser usado de um meio basal compreendendo alta concentração de glicose, por exemplo, uma operação de concentração entre 3000mg/l e 6000mg/l, preferivelmente entre 4000mg/l e 5000mg/l, e tipicamente cerca de 4500mg/l. Uma outra alteração pode ser

10 a ausência do adicionamento exógeno (ou seja, em adição aqueles presentes no soro ou plasma) aos fatores de crescimento. Por meio de um exemplo, pelo menos insulina adicionada exogenamente, dexametasona e/ou EGF pode ser ausente do meio. Ainda uma alteração adicional pode ser

15 usada do meio basal diferente de Williams Medium E (que pode ser particularmente adequados para a cultura a longo prazo tipos de células hepática primária, esp. hepatócitos). Por meio de exemplo e não de limitação, meios basais, tais como MEM, DMEM, alfa-MEM ou EMEM podem ser

20 vantajosamente usados. É entendido que o meio pode ser alterado em uma, mais do que uma ou de todas as maneiras acima. É ainda entendido que o meio compreende soro ou plasma ou soro de substituição, como descrito acima, incluindo as modalidades preferidas detalhadas acima do

25 mesmo.

Em uma modalidade, um meio que favoreça a eliminação de um ou mais tipos de células hepáticas diferenciadas e promovendo a célula-tronco ou progenitora da invenção, como descrito acima pode ser acrescentado no início do cultivo das células hepáticas primárias. Em outra modalidade, o meio pode ser alterado durante o cultivo prolongado das células hepáticas primárias. Por meio de exemplo, o meio pode ser modificado de modo a começar a cerca de 1 dia, em cerca de 2 dias, 3 dias, por exemplo, a cerca de 4 ou 5 dias, ou começando com cerca de 6 dias, tal como, por exemplo, cerca de 7 ou 8 dias, ou começando com cerca de 9 dias, como por exemplo, a cerca de 10 ou 11 dias, começando com cerca de 12 dias, por exemplo, a cerca de 13 ou 14 dias, mais preferivelmente começando com cerca de 15 dias, por exemplo, a cerca de 16, 17, 18, 19 ou 20 dias seguintes ao plaqueamento das células hepáticas primárias. Em uma modalidade exemplificativa, o meio pode ser modificado entre 16 e 32 horas após o plaqueamento, por exemplo, cerca de 24 horas. Em modalidade, após o meio ser então alterado, pode ser trocado/renovado, por exemplo, a cada 2 a 6 dias, de preferência a cada 2 a 4 dias, por exemplo, a cada 3 ou 4 dias.

Assim, em uma modalidade exemplificativa preferida, as células hepáticas primárias podem ser cultivadas em seguida do plaqueamento em um meio favorável a tipos de

células hepáticas primárias, incluindo tipos de células hepáticas diferenciadas, tais como hepatócitos, e no momento acima o meio pode ser modificada para a eliminação de um meio favorável de um ou mais tipos de células hepáticas diferenciadas, incl. hepatócitos, e promovendo a célula-tronco ou progenitora da invenção. Por exemplo, células hepáticas primárias podem ser cultivadas em um meio com uma, mais de uma ou todas as características a seguir: compreender um meio basal rico, como, por exemplo, Williams Médio E, compreendendo baixa glicose, por exemplo, entre 500 mg/l e 2999 mg/l, e, de preferência, entre 1000 mg/l e 2000 mg/l, compreendendo pelo menos um fator de crescimento adicionado exogenamente e de preferência, uma ou mais de uma ou toda insulina, dexametasona e EGF. Posteriormente, nos tempos acima, o meio pode ser modificado para incluir uma, mais de uma ou todas as características a seguir: compreendendo meio basal diferente de William Medium E, por exemplo, meio basal como MEM, DMEM, alfa-MEM ou EMEM, compreendendo glicose elevada, não compreendendo fatores de crescimento adicionados exogenamente ou não compreendendo pelo menos, dexametasona, insulina e/ou EGF. É entendido que a média acima compreenderá soro ou plasma ou soro de substituição, como descrito acima, incluindo as modalidades preferidas detalhadas acima.

25 Como descrito, a cultura acima de células hepáticas

primárias leva ao aparecimento de uma proliferação de células-tronco ou progenitoras da invenção na cultura. A dita cultura pode ser vantajosamente continuada até que o aparecimento de células-tronco ou progenitoras da invenção  
5 tenha proliferado suficientemente. Por exemplo, a dita cultura pode continuar até que a população celular atinja um certo grau de confluência, por exemplo, pelo menos 40%, de preferência, pelo menos, 50%, mais preferivelmente, pelo menos, 60% e, mais ainda preferivelmente pelo menos, 70%,  
10 por exemplo, pelo menos 80% ou pelo menos 90% ou mais confluência. O termo "confluência", conforme usado aqui se refere a uma densidade de células cultivadas em que as células contata uma as outras cobrindo substancialmente todas as superfícies disponíveis para o crescimento (ou  
15 seja, totalmente confluyente).

#### Passagem das células

Seguindo a cultura acima das células hepáticas primárias e surgimento da proliferação das células-tronco ou progenitoras da invenção, a população celular pode ser  
20 então obtidas pode ser passadas pelo menos uma vez.

Os inventores perceberam surpreendentemente que as células-tronco ou progenitoras da invenção surgiram na cultura de células primárias substancialmente conservar a sua capacidade de proliferação após a passagem, o que  
25 permite assim enriquecer ainda mais vantajosamente a

população celular dessas células. Por razões de simplicidade, a passagem realizada nesta fase do método é aqui referida como "primeira passagem" (ou passagem 1) no âmbito do método da invenção. As células podem ser passadas  
5 pelo menos uma vez e, de preferência, duas ou mais vezes. Cada passagem posterior a 1 passagem é referida aqui com um número cada vez maior que 1, por exemplo, passagem 2, 3, 4, 5, etc.

Quando passadas, as células cultivadas são destacadas  
10 e dissociadas do substrato da cultura e de cada outro. O desprendimento e a dissociação das células podem ser realizados como normalmente conhecidos como na arte, por exemplo, por tratamento enzimático com enzimas proteolíticas (por exemplo, escolhidos a partir de  
15 tripsina, colagenase, por exemplo, tipo I, II, III ou IV, dispase, pronase, papaína, etc), o tratamento com quelantes ion bivalente (por exemplo, EDTA ou EGTA) ou tratamento mecânico (por exemplo, pipetando repetidamente através de um pequeno furo da pipeta ou ponta da pipeta), ou qualquer  
20 combinação desses tratamentos.

Preferencialmente, o desprendimento e a dissociação das células cultivadas iria render uma porção substancial das células como células únicas. Por exemplo, 40% ou mais das células podem ser recuperado como células únicas, por  
25 exemplo, pelo menos 50%, de preferência, pelo menos 60%,

por exemplo, pelo menos 70%, mais preferivelmente, pelo menos 80%, por exemplo, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das células podem ser recuperados como células únicas. Além disso, as células restantes podem estar presentes nas 5 células clumps ou clusters a maioria dos quais pode conter um número relativamente pequeno de células, por exemplo, nam média, entre mais de 1 e 10 células, por exemplo, menos de 8 células, de preferência menor do que 6 células, mais preferivelmente menor do que 4 células, por exemplo, menor 10 do que 3 ou menor do que 2 células.

Tipicamente, um método de desprendimento e dispersão de células adequado deve preservar a viabilidade das células. De preferência, uma suspensão de células obtidas após desprendimento e dispersão pode compreender pelo menos 15 60% das células viáveis, por exemplo, pelo menos 70%, mais preferivelmente, pelo menos, 80%, e mais preferivelmente ainda, pelo menos, 90% e até 100% de células viáveis. Normalmente, uma pessoa versada na arte saberá escolher as condições que garantam um grau desejado de desprendimento e 20 dispersão das células, enquanto preserva a viabilidade celular.

Em seguida, as células dissociadas e desprendidas (normalmente como uma suspensão isotônica em tampão ou meio isotônico) são plaqueados novamente sobre um substrato que 25 permite a aderência das células neste, e posteriormente são

cultivadas em um meio como descrito acima sustentando as novas proliferação das células-tronco ou progenitoras da invenção. Normalmente, as células podem ser plaqueadas novamente a densidade entre  $1 \times 10^1$  e  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, por exemplo, entre  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> e preferivelmente entre  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, por exemplo, a cerca de entre  $1 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, a cerca de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, a cerca de  $1 \times 10^4$ , a cerca de  $5 \times 10^4$ , a cerca de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, e preferivelmente a cerca de  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$  células/mm<sup>2</sup>.

Alternativamente, as células podem ser plaqueadas novamente em razão de separação, por exemplo, entre cerca de 1/8 e 1/2, de preferência entre cerca de 1/4 e 1/2, e mais preferivelmente em cerca de 1/2 ou cerca de 1/3. A razão de separação denota a fração das células passadas que são semeadas em um tubo de cultura vazio (normalmente novo) da mesma área de superfície do vaso do qual as células foram obtidas.

O substrato aderente onde as células são replaqueadas é como descrito em outras partes deste relatório. O substrato pode preferivelmente ser do mesmo tipo que o substrato para o qual células hepáticas primárias foram chapeadas, incluindo as modalidades preferidas do substrato descrito acima, ou podem ser diferentes. De preferência, este substrato é também

colágeno, esp. colágeno tipo I, como descrito acima.

As células passadas são então cultivadas, vantajosamente até que as células se tornem pelo menos, 50% confluentes, por exemplo, pelo menos, 60%, de preferência, 5 pelo menos, 70%, por exemplo, pelo menos, 80%, mais preferivelmente, pelo menos, 90%, por exemplo, pelo menos 95% ou até mesmo totalmente confluentes.

Os presentes inventores perceberam que enquanto a população celular obtidas nesta fase do método compreende 10 uma fração substancial da célula-tronco ou progenitora da invenção, pode ser vantajosamente passada, pelo menos, mais uma vez (isto é, pelo menos uma segunda passagem), essencialmente como descrito acima para a primeira 15 passagem. Este número aumenta a proporção de células-tronco ou progenitoras da invenção na população celular, conforme avaliação morfológica e/ou a análise de marcação, e até mesmo uma população substancialmente homogênea das células-tronco ou progenitoras da invenção pode ser obtida.

Assim, de acordo com a invenção, na seqüência do 20 plaqueamento e cultura das células hepáticas primárias levando a emergência e a proliferação das células-tronco ou progenitoras na dita cultura, as células cultivadas são passada pelo menos uma vez (isto é, primeira passagem) e, de preferência pelo menos duas vezes (ou seja, primeira e 25 segunda passagem) e, opcionalmente, mais vezes (isto é,

primeira, segunda e cada passagem subsequente). Por exemplo, as células podem ser passadas pelo menos uma vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes ou pelo menos 5 vezes na seqüência das placas de células hepáticas primárias. Em outra modalidade, as células podem ser passadas entre 2 e 10 vezes, por exemplo, entre 2 e 8 vezes, ou entre 2 e 5 vezes, na seqüência das placas de células hepáticas primárias. As passagens adicionais (por exemplo, desprendimento e dispersão celular, repla-  
10 quamento, substrato, etc) e cultivo (por exemplo, meio, mudanças de meios, confluência resultantes, etc.) podem ser efetuadas em condições substancialmente idênticas ou análogas as da primeira passagem, como descrito acima, incluindo as modalidades preferidas, e podem incluir  
15 modificações que seriam óbvias para uma pessoa versada.

O método da invenção pode, portanto, prever uma população celular que compreende uma fração considerável de células-tronco ou progenitoras, tal como definido na presente divulgação, bem como a fração das células-tronco  
20 ou progenitoras pode ser aumentada por uma ou mais passagens da cultura prolongada de células hepáticas primárias. Tipicamente, a população será composta de no mínimo, cerca de 10%, por exemplo, pelo menos cerca de 20% das ditas células-tronco ou progenitoras, mas os inventores  
25 descobriram que normalmente proporções maiores das ditas

células-tronco ou progenitoras serão obtidas, por exemplo, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou mais. Além disso, o método pode ainda render uma população  
5 homogênea ou substancialmente homogênea das ditas células-tronco ou progenitoras. A fração das células-tronco ou progenitoras podem ser avaliadas por qualquer método padrão apropriado, por exemplo, por citometria de fluxo.

*Mantendo as células obtidas*

10 Quando uma população que compreende as células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado é obtida pelo método da invenção, e possivelmente ainda enriquecida pela as ditas células-tronco ou progenitoras, a população celular pode ser mantida e/ou propagada em condições que permitem o  
15 crescimento e a duplicação das ditas células-tronco ou progenitoras sem diferenciação. Tais condições podem ser, por exemplo, aquelas usadas para a obtenção de células-tronco ou progenitoras. Uma pessoa versada que é capaz de avaliar a presença ou ausência da diferenciação celular  
20 pode facilmente criar mais condições. Isto pode vantajosamente aumentar o número de células-tronco ou progenitoras disponíveis para nova utilização.

Os presentes inventores perceberam que a primeira passagem ou qualquer outra passagem posterior poderia ser  
25 criopreservadas para posterior utilização, o que é

geralmente conhecido na arte das células de mamíferos.

Os presentes inventores perceberam que as células-tronco ou progenitoras da invenção que surgiram na cultura de células primárias substancialmente consevaram sua  
5 capacidade de proliferação após congelamento e descongelamento. As ditas células podem ser armazenadas como uma suspensão celular concentrado congelada e descongelada, como geralmente é feito na arte, e replaqueadas nas mesmas condições que as descritas em outras  
10 partes deste relatório descritivo.

As células-tronco ou progenitoras da invenção

Os presentes inventores perceberam que a população celular obtidas após a cultura e preferivelmente também passando as células hepáticas primárias, como descrito  
15 acima compreende as células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado da invenção, que co-expressam (ou seja, são positivas a) pelo menos um marcador mesenquimais, esp. um, mais de um, por exemplo, 2, 3 ou 4, ou todos os marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de  
20 músculo liso (ASMA), com o marcador hepatócito de albumina (ALB) e possivelmente com um ou mais marcadores hepatócitos ou hepáticos, preferivelmente um ou ambos de alfa-1-antitripsina e transportador MRP2.

Em uma modalidade adicional particular, as células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado da invenção  
25

podem co-expressar (ou seja, são positivas para a) pelo menos um marcador mesenquimais, esp. um, mais de um, por exemplo, 2, 3 ou 4, ou de todos os marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de músculo liso (ASMA), com o  
5 marcador hepatócito de albumina (ALB) e possivelmente com um ou mais marcadores hepatócitos, de preferência um ou ambos de alfa-1-antitripsina e transportador MRP2 e com pelo menos um marcador CD29 ou alfa-fetoproteína (AFP).

Qualquer dita célula-tronco ou progenitora do fígado  
10 adulto pode ainda expressar um, mais de um, ou todas as moléculas a seguir indicativas de funções ou propriedades similares a hepatócitos: G6P, CYP1B1, CYP3A4, HNF-4, TDO, TAT, GS, GGT, CK8, EAAT2. As ditas células-tronco ou progenitoras do fígado adulto podem ainda ser compreendidas  
15 por um, mais de um, ou todas as características a seguir: negativas para pelo menos os marcadores CD45 e CD34 hematopoiéticos e eventualmente também para uma ou vários outros marcadores hematopoético, tais como, por exemplo, CD105 & HLA-DR; negativa para o marcador epitelial  
20 colangiolite citoqueratina-19 (CK-19) e, eventualmente, para mais marcadores epiteliais; negativas para pelo menos os marcadores de células-tronco indiferenciadas CD117 e Oct-4, e possivelmente também para um ou mais do que um marcador de células-tronco embrionárias; expressão de baixo  
25 nível de alfa-fetoproteína (AFP). Preferencialmente, a dito

célula-tronco ou progenitora do fígado podem ter morfologias similares a mesenquimal, especialmente envolvendo um, mais de um ou todo o crescimento em monocamadas de forma achatada, citoplasma amplo e/ou  
5 núcleos ovóides com um ou dois nucléolos.

A identificação de moléculas da superfície celular particular pelos seus CD ("determinante comum") é comum na arte. Outros nomes ou designações para as moléculas também são usadas no presente pedido, assim como estabelecido na  
10 arte. Outras especificações de determinadas moléculas também podem ser encontradas nos exemplos.

Quando uma célula é dita ser positiva para um marcador especial, isto significa que uma pessoa versada irá perceber a presença ou provas da existência de um sinal  
15 distinto, por exemplo, anticorpos detectáveis ou a eventual detecção por transcrição reversa por PCR, para que o marcador seja transportando na medida adequada, em comparação com os controles adequados. Sempre que o método permitir uma avaliação quantitativa do marcador, as células  
20 positivas podem em média gerar um sinal que é significativamente diferente do controle, por exemplo, mas sem limitar, pelo menos, 1,5 vezes superior ao sinal gerado por tais células de controle, por exemplo, pelo menos 2 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos  
25 20 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo

menos 50 vezes superior, ou mais.

A expressão de marcadores de células específicas pode ser detectada utilizando qualquer técnica de imunológica adequada conhecida na arte, tal como citometria de fluxo, imuno-citoquímica ou afinidade de adsorção, análise Western Blot, ELISA, etc, ou por qualquer técnica adequada para medir a quantidade mRNA do marcador, por exemplo, Northern blot, semi-quantitativa ou quantitativa RT-PCR, etc.

Uma pessoa versada apreciará a população celular obtida pelo atual método, que inclui as células-tronco ou progenitoras acima podem ser colhidas (por exemplo, por técnica de desprendimento aceitável) e, opcionalmente, ainda enriquecida por células exibindo características específicas através de métodos geralmente conhecido na arte (assim, essas células podem ser isoladas a partir da dita população). Por meio de ilustração e não de limitação, as células exibindo uma ou mais das características da superfície das moléculas das células-tronco ou progenitoras da invenção, por exemplo, um ou mais dos marcadores listados acima, pode ser reconhecido por anticorpos específicos (etiquetado) ou outros agentes de reconhecimento contra tais marcadores e classificados das células que não exibem essa superfície moléculas, por exemplo, utilizando separação das células por fluorescência ativada ou usando a afinidade vinculativa, por exemplo,

colunas, contas ou superfícies (panning). Quaisquer outras formas de enriquecimento para as células também estão incluídas na invenção.

Em um outro aspecto, os presentes inventores realizaram assim uma nova célula-tronco ou progenitora isolada (um vertebrado, de preferência um mamífero, mais preferivelmente ainda uma célula humana), originada de fígados adultos, sendo co-expressa (ou seja, é positiva para) pelo menos um marcador mesenquimal, esp. um, mais de um, por exemplo, 2, 3 ou 4, ou de todos os marcadores CD90, CD29, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de músculo liso (ASMA), com o marcador hepatócito de albumina (ALB) e, possivelmente com um ou vários outros marcadores hepatócitos. As ditas células-tronco ou progenitoras do fígado adulto podem ainda compreender um, mais de um, ou todos os seguintes: negativas durante pelo menos os marcadores hematopoiéticos CD45, CD34 e CD117 e também, eventualmente, para um ou vários outros marcadores hematopoiéticos; negativas para citoqueratina-19 (CK-19); morfologia similar a mesenquimal e particularmente envolvendo algum ou todo crescimento em monocamadas de forma achatada, citoplasma amplo e núcleos ovóides com um ou dois nucléolos.

Assim, em determinada modalidade (1), as células-tronco ou progenitoras isoladas derivadas do fígado adulto

co-expressa CD90, CD73, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de músculo liso (ASMA), com ALB. Em uma modalidade adicional (2), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado co-expressa CD90, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de 5 músculo liso (ASMA), com ALB e alfa-1 antitripsina. Em uma modalidade adicional (3), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado co-expressa CD90, CD73, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de músculo liso (ASMA), com ALB e MRP2. Em outra modalidade (4), a célula-tronco ou 10 progenitora isolada derivada do fígado co-expressa CD90, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de músculo liso (ASMA), com ALB alfa-1 antitripsina e MRP2. Em modalidades adicionais (5), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (4) ainda 15 expressar CD29. Em modalidades adicionais (6), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (4) ainda expressar alfa-fetoproteína. Em modalidades adicionais (7), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado 20 de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (4) ainda expressar CD29 e alfa-fetoproteína.

Em modalidades adicionais (8), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (7) são negativas para CD45 e 25 CD34. Em modalidades adicionais (9), a célula-tronco ou

progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (7) são negativas para CD117 e Oct-4. Em modalidades adicionais (10), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (7) são negativas para CD45, CD34, CD117 e Oct-4.

Em modalidades adicionais (11), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (10) são negativas para CK19. Em modalidades adicionais (12), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (10) são negativas para CK7. Em modalidades adicionais (13), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (10) são negativas para CK19 e CK7.

Em modalidades adicionais (14), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (13) mostram morfologia similar a mesenquimal, de preferência envolvendo algum ou todo crescimento em monocamadas de forma achatada, citoplasma amplo e núcleos ovóides com um ou dois nucléolos.

Em modalidades adicionais (15), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (14) adicionalmente expressar uma, mais de um, ou todas as moléculas a seguir indicativas

de funções ou propriedades similares a hepatócitos: G6P, CYP1B1, CYP3A4, HNF-4, TDO, TAT, GS, GGT, CK8, EAAT2.

Em modalidades adicionais (16), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (15) adicionalmente expressa, uma, ou mais de uma ou todas as moléculas a seguir: CD49e, CD13, CD54, complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I (HLA-ABC).

Em modalidades adicionais (17), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima de (1) a (16) são negativas para uma, mais de uma, ou todas as moléculas a seguir: CD105, HLA-DR, CD133, CD49b, CD49f & CD140.

Em modalidades adicionais (18), a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado de qualquer uma das modalidades acima (6) a (17) expressam a expressão de baixo nível de alfa-fetoproteína (AFP). De preferência, o dito baixo nível corresponde essencialmente ao nível de expressão medido em hepatócitos normais. Preferivelmente, é inferior ao nível da expressão medida linhagem celular modificada tumorigênica do fígado humano, por exemplo, HepG2.

As células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado isoladas da invenção pode preferivelmente exibir características de células-tronco, esp. pode exibir pelo

menos limitada a (e, possivelmente, substancialmente ilimitado) auto-renovação, ou seja, a capacidade de propagar sem diferenciação. Por meio de exemplo e não limitação, as células-tronco ou progenitoras da invenção  
5 pode ser propagada por pelo menos 4 passagens, por exemplo, pelo menos 6 passagens, pelo menos 10 passagens, ou pelo menos 20 passagens, pelo menos 50 passagens ou mais.

Em outro aspecto, a invenção fornece células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado isoladas, linhagem  
10 celular deste e/ou uma população celular compreendendo estas, obtidas por ou diretamente obtidas usando o método que inclui: (a) dissociar, preferivelmente em duas etapas do método de colagenase, o fígado adulto ou parte deste a partir de um sujeito, preferivelmente um vertebrado,  
15 mamífero e mais preferivelmente um ser humano, para formar uma população celular primárias, a partir do dito fígado adulto ou parte deste; (b) plaquear a população celular primária em um colágeno do tipo I revestido em substrato Williams Medium E compreendendo soro fetal de vitelo,  
20 preferivelmente 10% (v/v), EGF, preferivelmente 25ng/ml, insulina, preferivelmente 10 µg/ml, e dexametasona, preferivelmente 1 µM; (c) permitir a aderência das células a partir da população celular primárias para o dito substrato por 24 horas e, posteriormente, trocar o meio por  
25 um meio novo possuindo a composição com em (b); (d)

cultivar as células no dito meio (c) durante duas semanas (preferivelmente 15 dias); (e) trocar o meio por DMEM compreendendo alta glicose e FCS, preferivelmente 10%, e ainda cultivar as células, segundo a qual as ditas células-  
5 tronco ou progenitoras emergem e proliferam; (f) opcionalmente e preferivelmente, permitir que as células se tornem cerca de 70% confluentes e passar as células pelo menos uma vez e, preferivelmente, pelo menos, duas vezes, onde as células são plaqueadas no substrato como em (b) e  
10 cultivadas em um meio como em (e).

A etapa (a) incluir a desassociar da célula primária através da passagem por uma peneira tendo poros com espessura de 0,25 mm e, preferencialmente, através de uma sucessão de peneiras tendo poros com dimensões diminuindo  
15 gradualmente de 0,25 mm, por exemplo, como no exemplo 1.

O meio da etapa (e) pode preferivelmente não compreender dexametasona, insulina e EGF e em uma modalidade. O meio pode uma modalidade adicional não compreende qualquer fator de crescimento adicionado  
20 exogenamente.

Em um aspecto, a invenção também se refere aos métodos acima.

Em um outro aspecto, a invenção fornece células-tronco ou progenitoras isoladas do fígado, linhagem celular  
25 deste e/ou de uma população que utiliza este tipo de

células, obtida ou diretamente obtidas seguindo o protocolo estabelecido no exemplo 1.

Em um outro aspecto, os presentes inventores estabeleceram uma população celular (linhagem celular) das células-tronco ou progenitoras do fígado humano usando os métodos da invenção, em particular como documentado no exemplo 1, e depositada em 20 de fevereiro de 2006 a dita linhagem celular isolada no abrigo do Tratado de Budapeste com o Consórcio belga de coleções coordenadas de microrganismos (BCCM), sob o número de acesso LMBP 6452CB (dada pela Autoridade Internacional depositária; identificação referência dada pelo depositante: ADHLSC). Desta forma, a presente invenção relata uma célula isolada, linhagem celular e população celular, depositadas junto ao BCCM sob número de acesso LMBP 6452CB (aqui, linhagem celular "LMBP 6452CB"), sublinhagem destas inclui sublinhagem clonal, e a sua descendência, incluindo a descendência diferenciada destas, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos preparadas a partir delas, e modificadas geneticamente ou de outra forma os seus derivados.

Uma pessoa versada apreciará que as células-tronco ou progenitoras, linhas celulares, compreendendo estas, obtidas de acordo com os métodos da invenção do fígado humano adulto pode ter propriedades biológicas, esp. a

capacidade de proliferação e diferenciação, morfologia celular e/ou marcador de expressão, idêntico ou análogo a linhagem celular depositada acima, embora elas possam ser geneticamente diferentes (devido a variação genética entre os seres humanos normais). Assim, a célula-tronco ou progenitora humanas ou população celular, esp. derivadas do fígado, tendo propriedades biológicas idênticas ou análogas às da população celular depositada é também englobada no âmbito do presente invenção.

10 Em um outro aspecto, a invenção fornece uma população celular compreendendo as célula-tronco ou progenitora do fígado adulto com as características acima e, opcionalmente, ainda mais modificadas, por exemplo, modificadas geneticamente. Em uma modalidade, a dita população celular pode incluir cerca de 5% ou mais, por exemplo, cerca de 10% ou mais das ditas células-tronco ou progenitoras, cerca de 20% ou mais, cerca de 30% ou mais, cerca de 40% ou mais, cerca de 50% ou mais, cerca de 60% ou mais, cerca de 70% ou mais, cerca de 80% ou mais ou cerca de 90% ou mais das células-tronco ou progenitoras, ou seja, substancialmente homogêneas ou uma população homogênea da dita célula-tronco ou progenitora.

25 Em um outro aspecto, a invenção fornece uma linhagem celular estabelecida pela propagação da célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado da invenção,

opcionalmente mais modificadas, por exemplo, modificadas geneticamente. Essa propagação pode afastar uma célula-tronco ou progenitoras (linhagem celular clonal) ou mais do que uma célula.

5            Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado isoladas, linhagem celular deste e/ou de uma população celular compreendendo estas, podem ser obtidas ou diretamente obtidas utilizando o método da invenção  
10 descrito acima, incluindo as modalidades preferidas.

          Em uma determinada modalidade, a presente invenção, assim, fornece um método para isolar uma população de célula-tronco progenitora viável semelhante à mesenquimal do fígado (humano) normal (figura 1). As células-tronco são  
15 capazes de proliferar em um meio cultural, e expressa marcadores de vários tipos de células hepáticas, tais como, por exemplo albumina (hepatócitos), vimentina (células estrela), alfa-actina de músculo liso (ASMA) (figura 2A). Eles não têm fenótipo biliar, tal como demonstrado pela  
20 imunocoloração negativa e Ensaios RT-PCR para citoqueratina 19 (figura 2B). Quando testada usando citometria de fluxo, ADHLSC foram negativos para CD45, CD34 e CD117 indicando a sua não-contaminação por linhagem hematopoética. Em  
25 contraste, ADHLSC foram positivas para CD90, CD29 e CD44, marcadores para linhagem mesenquimal.

Em uma modalidade, as células têm a possibilidade de conservar a sua capacidade de proliferação após o tratamento tripsina/EDTA. A incubação em meio definido permite estas células a se diferenciarem especificamente em hepatócitos (figura 3). Como critérios de especificidade  
5 critérios adicionais, estas não estavam em condições de trans-diferenciarem em osteócitos ou adipócitos, como iria ser observada usando células mesenquimais da medula óssea humana multipotente. A sua capacidade de proliferação, bem  
10 como a sua especificidade conduz a um aumento da eficácia e segurança para o transplante de células hepáticas. Além disso, devido à sua origem adulta, estas células-tronco evitam as questões cancerígenas, éticas e imunológicas associadas às células embrionárias.

15 Diferenciação das células-tronco ou progenitoras da invenção

Além de detectar os marcadores de células, estudo de diferenciação das células in vitro e/ou in vivo pode ser informativo.

20 Os presentes inventores adicionalmente perceberam que as células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado obtidas utilizando os métodos acima pode possuir capacidades específicas de diferenciação. Particularmente, as células podem ser diferenciadas em hepatócitos ou  
25 células semelhantes à hepatócitos. Em uma modalidade mais

adicional ainda, as células não se diferenciam dos tipos de células mesodermal (mesenquimal), tais como, por exemplo, osteócitos, condrócitos, miócitos, células do tecido conjuntivo, células estromais ou adipócita.

5 A célula-tronco ou progenitora isolada derivadas do fígado da invenção, linhas celulares, ou populações celulares incluído estas (especificamente mencionadas, embora obviamente não limitada a, LMBP 6452CB linha), ou descendentes desta, poderá ser vantajosamente induzida a se  
10 diferenciar das células de linhagem hepatócitos, em especialmente a hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos. Essa diferenciação pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro* ou *ex vivo*. Assim, a invenção prevê ainda um método para geração de hepatócitos ou células semelhantes a  
15 hepatócitos provenientes de células-tronco ou progenitoras isoladas da invenção, e os hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos resultantes.

Em uma determinada modalidade, a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado da invenção é  
20 definida pela sua capacidade de se diferenciar em hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos e falta de diferenciação para tipos de células mesodermal, tais como, por exemplo, osteócitos e adipócitos.

Tal como entendida por aqueles versados na arte, a  
25 capacidade de diferenciar de um tipo específico de células

ou da ausência de tal capacidade podem ser observados *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Por meio de exemplo, *in vitro* ou *ex vivo* a diferenciação pode ser avaliada pela exposição da célula a um meio para induzir a diferenciação específica como geralmente conhecida na arte. Por outro lado, a diferenciação pode ser avaliada *in vivo*, seguindo o destino de uma introdução (por exemplo, transplantada, injetada, ou de outra célula administrada). Uma pessoa versada é capaz de reconhecer a diferenciação para determinados tipos de células por avaliação dos critérios fenotípicos, incluindo mas não limitado a, morfologia celular e/ou marcador de expressão, e/ou atividades metabólicas específicas ou outras vias fisiológicas.

A diferenciação em células de linhagem hepatócitas pode ser vantajosamente efetuada na presença de citocinas e fatores de crescimento, que podem ser específicas do fígado. Por meio de ilustração, fator de crescimento do hepatócito (HGF), ou fator espalhado, é uma conhecida citocina que promove a diferenciação do fenótipo do hepatócitos. Do mesmo modo, uma lista não-limitativa de citocinas inclui ainda o fator de crescimento epidérmico (EGF), FGF básico, insulina, nicotinamida, oncostatina M, dexametasona, Inibidores HDAC (por exemplo, butirato de sódio), DMSO, vitamina A, ou componentes matriz, tais como sulfato de heparina, que também foram implicados na

diferenciação para hepatócitos. Os protocolos para induzir diferenciação dos hepatócitos são geralmente conhecidos na arte e ainda pode ser otimizado por uma pessoa versada.

A identificação e o subsequente isolamento das  
5 células diferenciadas de suas homólogas indiferenciadas  
podem ser realizados através de métodos bem conhecidos na  
arte. Por exemplo, as células que foram induzidas à  
diferenciação podem ser identificadas por células  
cultivadas seletivamente sob condições em que as células  
10 diferenciadas são mais numerosas do que as células  
indiferenciadas. Do mesmo modo, células diferenciadas podem  
ser identificadas por mudanças morfológicas e  
características que não estão presentes em suas homólogas  
indiferenciadas, tais como o tamanho da célula, forma ou a  
15 complexidade da distribuição das organelas intracelulares.  
Também estão contemplados os métodos de identificação de  
células diferenciadas pela sua expressão do marcador de  
proteínas específicas, tais como marcadores de células da  
superfície. A detecção e o isolamento destas células podem  
20 ser obtidos, por exemplo, através de citometria de fluxo,  
ELISA, e/ou por esferas magnéticas. A transcrição reversa-  
PCR (RT-PCR) também pode ser usada para monitorar as  
mudanças na expressão genética em resposta à diferenciação.  
Além disso, a análise de todo o genoma usando tecnologia de  
25 microarrays pode ser usada para identificar as células

diferenciadas.

Modificação genética das células-tronco ou progenitoras da invenção

A dita célula-tronco ou progenitora do fígado adulto  
5 pode ser ainda modificada, por exemplo, geneticamente  
modificado, tal como descrito acima. A nova invenção se  
relaciona com a descendência, incluindo a descendência  
diferenciada, da célula-tronco ou progenitora do fígado  
adulto.

10 Em uma modalidade, para aumentar a capacidade  
replicativa das células-tronco ou progenitoras obtidas da  
invenção, as células podem ser geralmente conhecidas como  
"telomerasada" na arte. Uma célula é descrito como  
"telomerasada" se tiver sido geneticamente modificada com  
15 uma codificação de ácidos nucleicos codificando transcrição  
reversa da telomerasa (TERT) de qualquer espécie, de tal  
modo que a TERT é transcrita e traduzida na célula. O termo  
também se aplica a descendência das células alteradas  
originalmente que herdou a capacidade de expressar a região  
20 de codificação TERT em um nível elevado. A seqüência de  
codificação TERT é tipicamente tomada ou adaptada a partir  
de um gene de mamífero TERT, exemplificado pelo TERT  
humanos e do rato, conforme indicado a seguir. As células  
podem ser telomerasadas alterando-as geneticamente com um  
25 vetor adequado, de modo que elas expressem o componente

catalítico da telomerasa (TERC) em um nível elevado. Especialmente adequado está o componente catalítico da telomerasa humana (hTERT), fornecida no WO 1998/14592. Para algumas aplicações, outras seqüências TERT podem ser  
5 utilizadas. Outros métodos de imortalização das células também são contemplados, tal como modificar geneticamente as células com DNA codificando o T-antígeno SV40 (US 5,869,243, WO 1997/32972), infectado com vírus de Epstein-Barr, introduzindo oncogenes tais como myc e/ou ras,  
10 introduzindo genes de replicação viral como adenovirus Ela, e pela fusão de tendo fenótipo desejado com uma linhagem celular imortalizada. A transfecção com produtos oncogenes ou oncovirus é geralmente menos adequada quando as células são utilizadas para fins terapêuticos.

15 Em geral, deve ser preferível que as presentes células-tronco ou progenitoras não sejam modificadas pela telomerização ou outras formas de imortalização quando a utilização do referido células ou descendentes, incluindo a descendência diferenciada, estão contempladas na terapia,  
20 por exemplo, sempre que tais células são introduzidas no corpo humano ou animal, esp. humano.

Na presente invenção, obteve a célula-tronco ou progenitora isolada derivada do fígado ou descendentes deste pode ser estável ou transitoriamente transfectadas ou  
25 transformado em um ácido nucléico de interesse anterior a

outro uso, por exemplo, na terapia ou pesquisa, no essencialmente como conhecido na arte. As seqüências de ácidos nucléicos de interesse podem incluir, mas não estão limitados a, por exemplo, aqueles produtos de gene  
5 codificado que aumentar o crescimento, diferenciação e/ou funcionamento dos tipos de células úteis na terapia, por exemplo, os tipos de células derivados de células-tronco ou progenitoras da invenção, e, nomeadamente, hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, ou para emitir um gene  
10 terapêutico para um local de administração ou implantação de tais células.

Por meio de exemplo e não de limitação, as células-tronco ou progenitoras obtidas podem ser modificadas para constitutiva ou indutivamente sobre expressar um  
15 polipeptídeo normalmente expressado por células do fígado, esp. hepatócitos, mas são defeituoso ou ausente em um paciente, este defeito subjacente um estado patológico do paciente. A administração das células modificadas pode, então, restabelecer a produção de proteínas e, assim ajudar  
20 no tratamento do paciente. Por exemplo, as células-tronco ou progenitoras ou as descendentes destas podem conter DNA heterólogo codificando uma proteína metabólica tal como ornitina transcarbamilase, arginosuccinato síntese, argininosuccinato liase, arginasa, síntese de carbamil  
25 fosfato, Síntese de N-acetil-glutamato, síntese de

glutamina, síntese do glicogênio glicose-6-fosfatase, succinato desidrogenase, glucoquinase, piruvato quinase, acetil CoA carboxilase, síntese do ácido graxo, alanina aminotransferase, glutamato desidrogenase, ferritina, 5 receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), enzimas P450, e/ou álcool desidrogenase. Alternativamente, as células podem conter DNA que codifica uma proteína de plasma secretada como a albumina, transferrina, complemento, componente C3,  $\alpha$ 2-macroglobulina, 10 fibrinogênio, Fator XIII, Fator IX,  $\alpha$ 1-antitripsina, ou similar.

O fígado é um centro de produção de muitas proteínas secretoras. E é anatomicamente conectado ao sistema circulatório, de tal forma que permite uma eficiente 15 liberação de várias proteínas pela corrente sanguínea. Por isso, os genes que codificam proteínas que possuem efeitos sistêmicos podem ser inseridos em células do fígado da presente invenção, por oposição aos tipos específicos de células que normalmente produzem eles, especialmente se é 20 difícil de integrar esses genes nestas células. Por exemplo, variedade de genes homônimos ou genes de anticorpos específicos pode ser inserido nas células hepáticas da presente invenção para a secreção de seus produtos de genes na circulação.

25 Métodos de transferência de genes convencionais são

utilizados para introduzir ácidos nucleicos em células. O método preciso utilizado para introduzir um gene não é crítico para a invenção. Por exemplo, métodos físicos para a introdução de DNA em células incluem microinjeção e eletroporação. Métodos químicos, tal como a co-precipitação com fosfato de cálcio e incorporação de DNA em lipossomas também são métodos padrão de introdução de DNA em células de mamíferos. A transfecção viral também é contemplada. O DNA é introduzido usando vetores padrões, tais como os derivados de murinas e retrovírus da gripe (ver, por exemplo, Gluzman et al., Viral Vetores, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 1988).

Métodos de DNA recombinante padrão são bem conhecidos na arte (ver, por exemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1989), e vetores virais para a terapia genética tem sido desenvolvidos e utilizados clinicamente com sucesso (ver, por exemplo, Rosenberg, et al., N. Engl. J. Med, 323:370 1990).

#### 20 Usos de células-tronco ou progenitoras da invenção

A célula-tronco ou progenitora isolada originada do fígado, linhas celulares destas ou populações compreendendo essas podem ser usadas para diferentes propostas, é entendido que o uso e as aplicações a seguir são amplamente contemplada para qualquer célula-tronco ou progenitora do

25

fígado adulto, tal como definido acima, particularmente para células obtidas ou diretamente obtidas utilizando o método definido acima, as células exibindo as características acima definidas, bem como para a linhagem celular LMBP 6452CB, uma modalidade em particular, uma linhagem de célula-tronco isolada derivada do fígado adulto, preferivelmente uma linhagem de célula-tronco derivada do fígado humano adulto (ADHLSC); descendentes destas; ou derivados geneticamente modificados dos mesmos, incluindo, mas não limitados a:

- transplante de células hepáticas, para tratar anomalias metabólicas do fígado, doenças degenerativas do fígado ou insuficiência hepática fulminante, usando as células-tronco ou progenitoras isoladas ou população destas de acordo com a invenção,

- preparação de dispositivos hepáticos bio-artificiais usando células-tronco ou progenitoras isoladas ou população desta de acordo com a invenção,

- preparação de modelos animais de doenças do fígado humano graças ao transplante de células-tronco ou progenitoras isoladas ou população desta de acordo com a invenção em animais,

- preparação de modelos animais *in vitro* e de toxicologia, farmacologia utilizando as células-tronco ou progenitoras isoladas ou população desta de acordo com a

invenção,

- testar novas drogas sobre as células-tronco ou progenitoras isoladas ou população desta de acordo com a invenção, incluindo drogas antivirais para o vírus da  
5 hepatite humana.

Por exemplo, a análise dos fígados de uPA<sup>+/+</sup> -SCID e camundongos SCID transplantados intra-esplenicamente com ADHLSC (linhagem LMBP 6452CB), demonstraram que essas células foram capazes de serem enxertadas e se  
10 diferenciarem dos hepatócitos maduros (figuras 4 e 5). Além disso, a albumina humana foi detectada no soro destes camundongos transplantados 10 semanas pós-transplante apesar dos níveis de alfa-fetoproteína não terem sido detectados.

15 De acordo com a presente invenção as células-tronco ou progenitoras do fígado (especificamente mencionando, embora, obviamente não limitada a linhagem LMBP 6452CB) pode ser usada para o transplante de erro inato do metabolismo, para o transplante em modelos animais de falha  
20 do fígado ou para o transplante de modelos animais de hepatites virais humanas. Portanto, as células podem ser usadas no tratamento de doenças hepáticas associadas, incluindo mas não limitado a insuficiência hepática, hepatite, erros inatos do metabolismo.

25 Em uma modalidade exemplificativa, como mostrado no

exemplo 1, demonstram que os inventores das células-tronco ou progenitoras do fígado humanas da invenção, quando administrada através de injeção intra-esplênica a um mamífero com imunodeficiência, mais preferivelmente um roedor, esp. um camundongo ou rato, conservar a sua capacidade de proliferação e de se enxertar dentro do fígado hospedeiro. Assim sendo, em uma modalidade, uma população celular compreendendo células-tronco ou progenitoras do fígado da invenção, preferivelmente de origem humana (especificamente mencionada, embora obviamente não limitada a linhagem LMBP6452CB), é introduzida, por exemplo, injetada e permitida a ser enxertada em um mamífero geneticamente ou quimicamente feita com imunodeficiência, para obter um modelo animal. Preferencialmente, tal população pode compreender pelo menos,  $2 \times 10^6$  células da invenção. Uma pessoa versada poderá apreciar outras maneiras de administrar a população celular da invenção para induzir o enxerto das dita células-tronco ou progenitoras derivadas do fígado adulto.

Tal como especificado no exemplo 1, as células não enxertadas não sobre proliferam, evidenciando assim as suas vantagens em transplante de células em seres humanos ou outros animais, preferivelmente mamíferos.

A presente invenção abrange também a utilização de células-tronco ou progenitoras isoladas ou a população

destas de acordo com a invenção (especificamente mencionando, embora obviamente não limitada a linhagem LMBP 6452CB), para as seguintes propostas:

5 - transplante de células-tronco ou progenitoras do fígado, para tratar fígado baseado em deficiências metabólicas inatas: Exemplos não exaustivos de tais doenças incluem fenilcetonúria e outras aminoacidopatias, hemofilia e outras deficiências do fator de coagulação, hipercolesterolemia familiar, outras desordens do  
10 metabolismo lipídico, perturbações do ciclo da uréia, glicogenoses, galactosemia, fructosemia, tirosinemia, metabolismo dos carboidratos e proteínas deficiências, acidúria orgânicas, doenças mitocôndrias, doenças lisossomais, peroxissomais, anormalidade da síntese  
15 protéica, defeitos dos transportadores das células do fígado, defeito de glicosilação e similares,

- transplante de células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção para tratar doenças hepáticas degenerativas progressivas adquiridas,

20 - utilização de células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção para tratar a insuficiência hepática fulminante e falência hepática aguda ou crônica,

- utilização de células-tronco ou progenitoras do  
25 fígado, de acordo com a invenção em um bio-fígado

artificial e dispositivos de ajuda ao fígado,

- modelos de animais de doenças do fígado humano graças ao transplante de células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção em animais pequenos e  
5 grandes,

- a preparação de modelos animais de infecções humanas por vírus hepatotrópico (HBV, HAV, HCV, HEV, HDV, ...) para estudar a história natural, transmissão, resistência, efeitos do tratamento, uso de drogas  
10 antivirais ou qualquer pesquisa usando células-tronco ou progenitoras do fígado transplantadas, de acordo com a invenção,

- a preparação *in vitro* de modelos animais de toxicologia, farmacologia e farmacogenética usando células-  
15 tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção,

- testar novas drogas sobre as células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção,

- terapia genética, através da inserção de seqüências virais nas células-tronco ou progenitoras do fígado de  
20 acordo com a invenção, que poderá ser expandida, *in vitro*,

- modelos animais para estudo metabolismo celular do fígado humano,

- tolerância de células alogênicas, graças ao uso de células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a  
25 invenção, e/ou

- uso de células-tronco ou progenitoras do fígado, de acordo com a invenção para evitar, prevenir ou tratar o fígado ou a rejeição de transplante de células do fígado.

As presentes células-tronco ou progenitoras ou  
5 descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, pode, em um aspecto da invenção, ser destinadas a aplicações terapêuticas, como por exemplo, para a engenharia de tecidos e terapia celular.

Uma pessoa versada apreciará que o uso detalhado pode  
10 envolver a utilização de células-tronco ou progenitoras, linhagem celular destas, populações celular compreendendo estas, bem como a utilização de descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos geneticamente modificados  
15 ou seus derivados.

Tal como referido anteriormente, as células-tronco ou progenitoras originadas do fígado da invenção, linhagem celular destas, ou populações celulares que compreende as mesmas (especificamente mencionada, embora obviamente não  
20 limitada a linhagem LMBP 6452CB), ou descendentes destas, opcionalmente modificadas geneticamente, podem ser usadas em terapias substituição de células. As células podem ser administradas a um tecido de interesse em um sujeito para completar ou substituir células de funcionamento que tenham  
25 perdido a função. Alternativamente, os métodos de fornecer

células diferenciadas, sobretudo hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, também são contemplados, onde células-tronco ou progenitoras são diferenciadas, na presença de fatores de crescimento, isolados, e administradas em um sujeito.

O estado da doença ou o tipo de deficiência por perda de massa do fígado e/ou função, e que poderia beneficiar-se de células-tronco ou progenitoras da invenção incluem aquelas listadas acima, e ainda inclui, mas não se limitam à síndrome de Alagille, doenças alcoólicas do fígado (cirrose induzida pelo álcool), deficiência de alantitripsina (todos os fenótipos), dislipidemias e outras desordens do metabolismo lipídico, hepatite autoimune, síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, colestase intra-hepática progressiva familiar tipos I, II e III, câncer de fígado, doença de Caroli, Síndrome de Crigler-Najjar, fructosemia, galactosemia, hidratos de carbono deficientes, defeitos de glicosilação, outros distúrbios do metabolismo dos carboidratos, Doença de Refsum e de outras doenças peroxissomais, Doença de Niemann Pick, doença de Wolman e outros distúrbios lisossomais, tirosinemia, Triplo H, aminoácidos e outros distúrbios metabólicos, síndrome de Dubin-Johnson, gordura no fígado (esteato-hepatite não-alcoólica), síndrome de Gilbert, Doença do armazenamento de glicogênio I e III, hemocromatose, hepatite A-G, porfiria,

cirrose biliar primária, colangite esclerosante, tirosinemia, deficiências do fator de coagulação, hemofilia B, fenilcetonúria, doença de Wilson, falha fulminante do fígado, falha hepática pós hepatectomia, doenças da cadeia  
5 respiratória mitocondrial. Além disso, as células também podem ser usadas para tratar a disfunção hepática devido a infecções virais adquiridas.

Desta forma, a linhagem celular destas é fornecida em um aspecto as células-tronco ou progenitoras do fígado  
10 adulto da invenção, ou populações celulares que compreendem as mesmas (especificamente mencionada, embora obviamente não limitada à linhagem LMBP 6452CB), ou descendentes destas, incluindo descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos,  
15 opcionalmente modificadas geneticamente como detalhado acima, para utilização na terapia e/ou uso destas na fabricação de um medicamento para o tratamento de doenças hepáticas. Essas doenças podem incluir doenças que afetam o tecido hepático, doenças que afetam a viabilidade e/ou  
20 função dos hepatócitos são especificamente contempladas, e pode representar, por exemplo, erros inatos, os efeitos de uma condição de doença, o efeito do trauma, efeitos tóxicos, infecções virais, etc. As doenças do fígado listadas no presente relatório são especificamente  
25 contempladas. A administração de células de acordo com a

invenção pode levar a reconstituição ou regeneração do tecido do sujeito. As células são administradas de uma forma que permitem o enxerto ou migrar para o local do tecido destinado a reconstituir ou regenerar a área  
5 funcionalmente deficiente.

Outro aspecto da invenção é um método para a prevenção e/ou tratamento de uma doença hepática, compreendendo a administração das células-tronco ou progenitoras do fígado adulto da invenção, linhagem celular  
10 destas, ou populações celulares que compreende as mesmas (especificamente menciona, embora não exclusivamente, a linhagem LMBP 6452CB), ou descendentes destas, incluindo a descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas  
15 geneticamente para um sujeito, esp. humanos, na necessidade do tratamento. Tal administração é tipicamente em quantidade terapeuticamente efetiva, ou seja, geralmente em quantidade que fornece um local desejado ou efeito sistêmico e desempenho. Em um outro aspecto, a invenção  
20 relata uma composição farmacêutica que compreende as células-tronco ou progenitoras do fígado adulto da invenção, linhagem celular, ou uma população que compreende a mesmas (especificamente menciona, embora não exclusivamente, a linhagem LMBP 6452CB), ou descendentes  
25 destas incluindo a descendência diferenciada, esp.

hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente modificadas geneticamente como acima.

Por meio de exemplo e não de limitação, as células-tronco ou progenitoras isoladas do fígado adulto da invenção, linhagem celular destas, ou populações celulares que compreende as mesmas (especificamente menciona, embora obviamente não limitada a linhagem LMBP 6452CB), ou descendentes das mesmas pode ser vantajosa administradas por injeção (englobando também a administração por cateter) ou implantação, por exemplo, injeção localizada, injeção sistêmica, injeção intra-esplênica (ver também Gupta et al., Seminários, em Doença hepática 12: 321, 1992), uma injeção para uma veia portal, injeção na polpa do fígado, por exemplo, abaixo da cápsula hepática, administração parentérica, ou injeção intra-uterina em um embrião ou feto.

Em uma modalidade preferida, as células-tronco ou progenitoras originadas do fígado da invenção, linhagem celular destas, ou populações celulares que compreende as mesmas (especificamente menciona, embora obviamente não limitada a linhagem LMBP 6452CB), ou descendentes destas, opcionalmente modificadas geneticamente, podem ser utilizadas para a engenharia dos tecidos e da terapia celular através do transplante de células do fígado (TCF). O transplante de células do fígado e transplante (LSCT), e

transplante de células-tronco do fígado (LSCT) se referem à infusão de hepatócitos maduros ou células progenitoras fígado, incluindo as células da invenção, de qualquer forma que conduza o acesso hepático e enxerto de células, 5 preferivelmente através da veia portal, mas também pela injeção hepática direta, ou por injeção intra-esplênica.

Por exemplo, as células podem ser fornecidas como uma suspensão celular em qualquer meio preservação, preferivelmente contendo albumina humana, após o processo 10 de isolamento ou após a descongelação seguida de criopreservação.

Em uma modalidade, a presente invenção contempla usar tecido do fígado do próprio paciente para isolar as células-tronco ou progenitoras da invenção. Tais células 15 seriam autólogas para o paciente e poderia ser facilmente administrado ao doente. Além disso, se o paciente possui um defeito genético subjacente a um determinado estado patológico, tal defeito pode ser evitado por manipulação genética das células obtidas.

20 Em outra modalidade, as células-tronco ou progenitoras da invenção podem ser isoladas de tecido que não é do próprio paciente. Quando a administração de tais células de um paciente é contemplada, poderá ser preferível que o tecido hepático submetidos ao método da presente 25 invenção para obter as células-tronco ou progenitoras seja

selecionado para maximizar, ou que pelo menos seja realizável dentro dos limites, a compatibilidade do tecido entre o paciente e as células administradas, reduzem assim a probabilidade de rejeição das células administradas pelo sistema imunológico do paciente (por exemplo, enxerto versus a rejeição do hospedeiro).

A capacidade do sistema imunitário para se auto diferenciar do não próprio em grande medida determinado por produtos de complexo de histocompatibilidade principal (MHC), cujos genes estão no cromossoma 6 e, pertencem ao gene da super família da imunoglobulina. Os produtos classe I MHC consistem de HLA-A, HLA-B e HLA-C; estes dispõem de uma ampla distribuição e estão presentes na superfície de praticamente todos os núcleos de células e plaquetas. Os produtos classe II MHC consistem de HLA-D, HLA-DR, HLA-DP, e HLA-DQ, pois eles têm uma distribuição mais limitada, incluindo as células B, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, e células T ativadas (mas não repousa).

O HLA loci geralmente são multialélicos, por exemplo, usando anticorpos específicos, pelo menos 26 alelos HLA-A, 59 alelos HLA-B, 10 alelos HLA-C, 26 alelos HLA-D, 22 alelos HLA-DR, nove alelos HLA-DQ e seis alelos HLA-DP podem ser reconhecidos. Devido ao HLA loci está intimamente ligado, os antígenos HLA podem também estar presentes como

haplótipos conservados.

Um sujeito na necessidade da terapia com células da presente invenção pode ser rastreado pela presença de anticorpos anti-HLA e pelo seu genótipo HLA e/ou fenótipo (por exemplo, em linfócitos; por exemplo, usando métodos sorológicos ou análise genética do DNA). As células-tronco ou progenitoras obtidas de acordo com a presente invenção, ou o tecido do fígado fonte ou doador deste, pode ser normalmente testados pelos seus fenótipos e/ou genótipos HLA e tecidos ou células selecionadas para a administração, que têm ainda haplótipos HLA idênticos ao do paciente, ou que tenham a mais alelos antígeno HLA comum ao paciente e nenhum ou menos antígenos HLA de que o paciente contém anticorpos pré-existentes anti-HLA. A probabilidade de que as células transplantadas sejam aceitas com sucesso aumenta com o número de antígenos HLA idênticos. Uma pessoa versada irá compreender uma variação maior de todas estas considerações.

Outras formas de obter o perfil MHC semelhante ao do paciente também são contempladas, por exemplo, a manipulação genética de células-tronco ou progenitoras obtidas da invenção ou descendentes destas.

Se as células são obtidas de fontes heteróloga (ou seja, não-autólogo), terapia imunossupressora concomitantemente pode ser normalmente administrada, por

exemplo, utilizando agentes imunossupressores, tais como ciclosporina ou tacrolimus (FK506). Alternativamente, as células podem ser encapsuladas por uma membrana que permite o intercâmbio dos fluidos, mas evita o contato  
5 célula/célula. Transplantes de células microencapsuladaa são conhecidos na arte, por exemplo, Balladur et al., 1995, Surgery 117:189-194; e Dixit et al., 1992, Cell Transplantation 1:275-279. Preferencialmente, as células podem ser autólogas, ou mostrar uma estreita  
10 correspondência HLA como explicado.

Em outra modalidade preferida, o fígado adulto ou parte deste é de um animal não-humano, preferivelmente um indivíduo mamífero não-humano. As células-tronco ou progenitoras ou linhagem celular destas ou descendentes das  
15 mesmas derivadas de fígados de animais não-humanos ou indivíduos animais mamíferos não-humanos de acordo com a invenção podem ser vantajosamente usadas, por exemplo, na pesquisa e na terapia de doenças hepáticas em membros do mesmo, relacionadas a outros animais não-humanos ou de  
20 espécies de mamíferos não-humanos, ou mesmo na terapia de paciente que sofrem de doenças hepáticas (por exemplo, xenotransplantação, dispositivos do fígado bio-artificial compreendendo células mamárias não-humanas ou animais não-humanas). Por meio de exemplo e não de limitação,  
25 especialmente células adequadas de mamíferos não-humanos

para uso em terapias humanas podem ser originárias de suínos.

Uma questão relativa ao uso terapêutico das células-tronco ou progenitoras da invenção é a quantidade de células necessárias para alcançar um efeito ótimo. As doses de administração pode ser variáveis, e podem incluir uma administração inicial seguida de outras administrações, e podem ser determinadas por uma pessoa versada conhecedoras da presente revelação. Normalmente, as doses administradas ou doses fornecerão uma quantidade terapêutica eficaz de células, ou seja, obtendo um local desejado ou efeito sistêmico e desempenho.

Em estudos humanos atuais de células autólogas mononucleares da medula óssea, doses empíricas entre 1 e 4  $\times 10^7$  células têm sido usadas com resultados animadores. Entretanto, diversos cenários podem exigir a otimização da quantidade de células administradas. Assim, a quantidade de células a ser administrada irá variar de acordo com o sujeito a ser tratado. Em uma modalidade preferida, entre  $10^2$  a  $10^9$ , ou entre  $10^3$  a  $10^9$ , ou entre  $10^4$  a  $10^9$ , como entre  $10^4$  e  $10^8$ , ou entre  $10^5$  e  $10^7$ , por exemplo, cerca de  $1 \times 10^5$ , cerca de  $5 \times 10^5$ , cerca de  $1 \times 10^6$ , cerca de  $5 \times 10^6$ , cerca de  $1 \times 10^7$ , cerca de  $2 \times 10^7$ , ou cerca de  $3 \times 10^7$ , cerca de  $4 \times 10^7$ , cerca de  $5 \times 10^7$ , cerca de  $6 \times 10^7$ , cerca de  $7 \times 10^7$ , cerca de  $8 \times 10^7$ , cerca de  $9 \times 10^7$ , cerca de 1

X  $10^8$ , podem ser administradas a um ser humano. No entanto, a definição exata de uma dose eficaz terapêutica pode ser baseada em fatores individuais para cada paciente, incluindo o seu tamanho, idade, tamanho do tecido  
5 lesionado, e o tempo decorrido da lesão, e pode ser facilmente verificado por aqueles versados na arte a partir desta divulgação e o conhecimento na tecnologia.

Preferencialmente, a pureza de uma população celular compreendendo as células-tronco ou progenitoras para a  
10 administração da invenção pode ser cerca de 50 a cerca de 55%, cerca de 55 a cerca de 60%, e cerca de 65 a cerca de 70%. Mais preferivelmente a pureza pode ser de cerca de 70 a cerca de 75%, de cerca de 75 a cerca de 80%, cerca de 80% a cerca de 85%, e mais preferivelmente a pureza pode ser de  
15 cerca de 85 a cerca de 90%, cerca de 90 a cerca de 95%, e cerca de 95 a cerca de 100%. A pureza das células-tronco pode ser determinada, por exemplo, de acordo com o perfil marcador da superfície celular dentro de uma população celular. A dosagem pode ser facilmente ajustada por aqueles  
20 versados na arte (por exemplo, menor pureza pode exigir um aumento da dose).

Aqueles versados na arte poderão facilmente determinar a quantidade de células e aditivos opcionais, veículos e/ou transportador em composições a serem  
25 administradas pelos métodos da invenção. Normalmente,

qualquer aditivos (em adição as célula(s)-tronco ou progenitoras ativas e/ou citoquina(s)) podem estar presentes em quantidade de 0,001 para 50% (w/w ou w/v) em solução salina de tampão de fosfato, e ingrediente ativo  
5 pode está tipicamente presentes na ordem de microgramas a miligramas, como cerca de 0,0001 a cerca de 5% (w/w ou w/v), preferivelmente cerca de 0,0001 a cerca de 1%, mais preferivelmente cerca de 0,0001 a cerca de 0,05% ou cerca de 0,001% a cerca de 20%, preferivelmente cerca de 0,01 a  
10 cerca de 10%, e mais preferivelmente ainda cerca de 0,05 a cerca de 5%.

Quando se administra uma composição terapêutica da presente invenção, esta pode ser geralmente formulada de forma injetável em dose única (por exemplo, solução,  
15 suspensão, dispersão, emulsão). As formulações farmacêuticas adequadas para injeção incluem soluções aquosas esterilizadas e dispersões. Como usado aqui, as soluções ou dispersões incluem um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitáveis nos quais as células da  
20 invenção permanecem viáveis. O transportador pode ser um solvente farmacêuticamente aceitável ou meio dispersante contendo, por exemplo, água, soro fisiológico, tampão fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, líquido de polietileno-glicol, e similares) e misturas  
25 adequadas destes.

Além disso, vários aditivos que aumentam a estabilidade, esterilidade, e isotonicidade das composições, incluindo os conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e tampões podem ser  
5 adicionados. A prevenção da ação dos microrganismos pode ser assegurada por diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, chlorobutanol, fenol, ácido sórbico, e similares.

Em muitos casos, será conveniente incluir agentes  
10 isotônicos para garantir a viabilidade das células, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio, e similares. A isotonicidade desejada das composições da presente invenção pode ser obtida utilizando cloreto de sódio, ou outros agentes farmacologicamente aceitáveis como dextrose, ácido  
15 bórico, tartarato de sódio, propilenoglicol ou outras matérias orgânicas ou inorgânicas solúveis. O cloreto de sódio é particularmente preferido para tampões contendo íons de sódio.

Para aumentar potencialmente a sobrevivência de células  
20 progenitoras ao introduzir as células-tronco ou descendentes diferenciadas de interesse destas no sujeito na necessidade destas, pode-se incorporar nas ditas células em um biopolímero ou polímeros sintéticos. Exemplos de biopolímeros aceitáveis incluem, mas não estão limitados a,  
25 fibronectina, fibrina, fibrinogênio, trombina, colágeno, e

proteoglicanos. Isto pode ser construído com ou sem incluído citocinas, fatores de crescimento, fatores de diferenciação ou construções de expressão de ácidos nucleicos, etc. Esses biopolímeros poderiam ser, por exemplo, em suspensão ou um gel tridimensional embebido com células. Estes polímeros podem ser preferencialmente biodegradáveis.

A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser concretizada através do uso de agentes que atrasam a absorção, por exemplo, mono estearato de alumínio e de gelatina. Entretanto, de acordo com a presente invenção qualquer veículo, diluente, ou aditivo utilizado deve ser compatível com as células-tronco ou progenitoras.

Soluções estéreis ejetáveis podem ser preparadas incorporando as células utilizadas na prática da presente invenção na quantidade necessária do solvente apropriado com várias quantidades dos outros ingredientes, como pretendido.

Essas composições podem ainda ser misturadas com um transportador, solvente, excipiente aceitáveis, tal como água purificada, soro fisiológico, glicose, dextrose, ou similares. As composições podem conter substâncias auxiliares, tais como agentes emulsificantes, humidificantes, agentes de pH tamponizantes, aditivos de aumento de viscosidade ou gelificação, conservantes,

agentes aromatizantes, corantes, e similares, dependendo da via de administração e a preparação desejada.

Textos padrões, tais como "Remington's pharmaceutical caiense", 17ª edição, 1985, são incorporados neste documento por referência, e poderão ser consultados para 5 preparações adequadas, sem experimentações indesejáveis.

A viscosidade das composições, se desejado, poderá ser mantido no nível selecionado utilizando um agente de espessamento farmacologicamente aceitável. A metilcelulose é preferida porque é economicamente e prontamente disponível 10 e é fácil de trabalhar. Outros agentes de espessamento adequado incluem, por exemplo, goma xantana, carboximetil celulose, celulose hidroxipropil, carbômero, e similares. A concentração preferida do espessante dependerá do agente 15 selecionado. O ponto é usar uma quantidade, que irá obter a viscosidade selecionada. As composições viscosas são normalmente preparadas a partir de soluções através da adição de tais agentes de espessamento.

Outras utilizações das células-tronco ou progenitoras da invenção 20

Outras utilizações das células-tronco ou progenitoras da invenção, linhagem celular destas, ou populações celulares que compreende as mesmas (especificamente menciona, embora não exclusivamente, a linhagem LMBP 25 6452CB), ou descendentes destas, incluindo a descendência

diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, opcionalmente geneticamente modificada, são contempladas a seguir.

Assim, as células-tronco ou progenitoras  
5 diferenciadas ou seus derivados, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, podem ser usadas para detectar respostas celulares (por exemplo, toxicidade) para os agentes bioativos (biológica ou farmacológica), compreendendo contatar uma cultura de células, ou derivados  
10 diferenciados das mesmas, com um ou mais agentes biológicos ou farmacológicos, identificando uma ou mais resposta celular a um ou mais agentes biológicos ou farmacológico, e comparando as respostas celulares das culturas celulares com as respostas de controle das culturas celulares. Essas  
15 respostas podem ser determinadas através do acompanhamento das atividades das moléculas, tais como, mas não limitado a, fosfatase alcalina, citocromo P450, enzimas da via da uréia, entre outros.

Além disso, citocinas, quimiocinas, composições  
20 farmacêuticas e de fatores de crescimento, por exemplo, podem ser rastreados utilizando as células-tronco ou progenitoras da invenção ou seus derivados diferenciados, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, de forma mais clara para elucidar seus efeitos sobre a  
25 diferenciação e função dessas células.

A invenção também prevê um órgão preparado pela engenharia dos tecidos, ou porções, ou partes específicas do mesmo, dispositivo de construção de tecido compreendendo um tecido de interesses e, opcionalmente, citocinas, 5 fatores de crescimento, ou fatores de crescimento, onde as células da invenção são usadas para gerar tecidos, esp. tecido hepático, esp. tecido compreendendo hepatócitos. Órgão preparado pela engenharia dos tecidos, pode ser utilizado com um suporte polimérico biocompatível para 10 apoiar o crescimento das células em uma configuração tridimensional, que pode ser biodegradável. Órgãos gerados da engenharia de tecidos, a partir de células-tronco da presente invenção podem ser implantados em sujeitos que precisam de um novo órgão, porções, ou partes específicas 15 do mesmo. A presente invenção também prevê a utilização de células-tronco ou células diferenciadas, assim como parte de um bioreactor, e. g., um dispositivo auxiliar fígado.

Órgãos, porções, ou partes das células-tronco obtidas a partir da invenção podem ser implantados em um 20 hospedeiro. O transplante pode ser autólogo, de tal forma que o doador das células-tronco a partir do qual o órgão ou unidades do órgão são derivadas do destinatário da engenharia de tecidos. O transplante pode ser heterólogo, de tal forma que o doador das células-tronco a partir do 25 qual o órgão ou unidades órgãos não são derivadas do

destinatário da engenharia de tecidos. Uma vez transferida para um hospedeiro, o órgão produzido pela engenharia de tecidos pode recapitular a função e arquitetura do tecido hospedeiro nativo. O órgão produzido pela engenharia de tecidos irá beneficiar indivíduos, em uma ampla variedade de aplicações, incluindo o tratamento de câncer e outras doenças reveladas aqui, defeitos congênitos, ou danos devido à ressecção cirúrgica.

Como uma ferramenta para o processo de desenvolvimento e testes de droga, as células do fígado e suas descendentes poderão ser utilizadas para avaliar mudanças nos padrões da expressão genética causada por drogas que são consideradas para o desenvolvimento. As mudanças no padrão de expressão genética de drogas potenciais poderiam ser comparadas com aquelas causadas por fármacos que afetam o fígado. Isso permitiria que uma empresa farmacêutica separe os compostos de seu efeito no fígado antes do processo de desenvolvimento, economizando tempo e dinheiro. A linhagem completa das células do fígado, a partir de células progenitoras para células maduras, também poderia ser utilizada para testar a toxicidade das drogas no fígado e para estudar a forma como a droga é metabolizada. Atualmente, os laboratórios farmacêuticos têm dificuldade em obter um fornecimento constante de células do fígado para os ensaios de

toxicidade. Os métodos e de células da presente invenção respondem a essa necessidade.

Adicionalmente, as células-tronco ou progenitoras do fígado adulto ou descendentes destas, incluindo a  
5 descendência diferenciada, esp. hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos são úteis como componentes biológicos dos dispositivos de desintoxicação, tais como perfusão hepática ou dispositivos de ajuda do fígado.

Um dispositivo ajuda do fígado convencional inclui  
10 uma fibras de membrana semipermeáveis ocas e como uma concha externa plástica e rígida que são semeadas com células-tronco ou hepatócitos diferenciados ou a partir de células-tronco derivadas. As fibras podem ser tratadas com colágeno, lectina, laminina, ou fibronectina, para a  
15 anexação das células ou liberação das não tratadas. Os fluidos corporais são perfundidos através do dispositivo de desintoxicação, de acordo com procedimentos bem conhecidos e, em seguida, retornados para o paciente. Um exemplo de um LAD adequado para as células da presente invenção é  
20 descrito no pedido de patente internacional número de serie PCT US00/15524.

As células-tronco ou progenitoras do fígado adulto da invenção ou descendentes destas podem ser diferenciadas in vitro e ainda usadas no lugar de hepatócitos maduros  
25 administração "ADMET", distribuição, metabolismo,

eliminação e toxicologia) ou testes de citotoxicidade.

Os hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos obtidas através da diferenciação das células-tronco ou progenitoras do fígado adulto da invenção ou descendentes das mesmas pode fornecer um modelo in vitro para estudos de desenvolvimento do fígado, metabolismo da célula do fígado, biologia celular do fígado, e para triagem diferenciada, moléculas tóxicas ou proliferativa. Adicionalmente contempla a manipulação genética de tais células, elas podem ser usadas para estudar genes envolvidos no desenvolvimento fígado, metabolismo ou biologia das células hepáticas.

A invenção agora será ilustrada por meio de exemplos, que não limita o âmbito da invenção de nenhum modo.

#### Exemplo 1

##### *Processo de isolamento de células do fígado*

As células do fígado humano foram obtidas a partir de um fígado inteiro ou segmentos de um fígado provenientes de doador cadavérico saudável ou sem batimentos cardíacos. As células foram isoladas após o tempo de retirada (por exemplo, entre 6 e 12 horas após a retirada) enquanto os fígados foram conservados em um meio com gelo em uma Universidade de Wisconsin até a perfusão. Os hepatócitos isolados foram usando uma técnica clássica de perfusão em duas etapas (Seglen, 1976) (Stephenne, 2005). O tecido do

fígado sequencialmente perfundidos nos vasos sanguíneos aparentes com uma solução EGTA (Solução salina equilibrada de Earl sem  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , 0,5 mM EGTA, 5 mM Hepes, 2 mg/l gentamicina, e 100.000 IU/I penicilina G) e uma solução  
5 enzimática digestiva de 9 a 12 minutos cada a 37°C. A solução digestiva (EBSS com  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , 5 mM Hepes, 2 mg/l gentamicina, e 100.000 UI/I penicilina G) incluído 0,9 mg/ml de colagenase e 0,03 mg/ml dos inibidores de tripsina de soja. A cápsula de fígado foi incisionada e os hepatócitos  
10 foram libertados por suave agitação.

A digestão foi interrompida em meio gelado (meio M199, 5 mM Hepes, 2 mg/l gentamicina e 100.000 UI/I penicilina G), contendo 0,03 mg/ml de inibidores de tripsina de soja e 100 ml/l de plasma humano. As células  
15 foram filtradas e lavados através de 4 peneiras de metal com poros de tamanhos de 4,5, 1, 0,5 e 0,25 mm respectivamente. As células foram lavadas 3 vezes por centrifugação a 1200 rpm durante 3 minutos, em um meio de lavagem M199 frio.

#### 20 ***Cultura celular primária***

As suspensões de células únicas foram resuspensas em Williams' E medium (Invitrogen) complementado com 10% de soro fetal de vitelo (FCS) (Perbio, Hyclone), 25 ng/ml EGF (Peprotech), 10 µg/ml de insulina, 1 µM dexametasona e 1%  
25 penicilina/estreptomicina (P/S) (Invitrogen). As células

foram chapeadas em rabo de rato colágeno I (BD Biosciences) - frascos revestidos ou placas (por exemplo, placas de 6 poços) (Greiner Bio-one) e cultivadas a 37°C em uma atmosfera completamente umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

5 Após 24 horas, o meio foi alterado para eliminar as células não-aderentes e depois renovado a cada três dias. Durante duas semanas, a cultura foi observada diariamente por microscópio e o meio da cultura foi analisado a cada três dias. O meio da cultura foi depois comutado para DMEM com

10 elevadas concentrações de glicose (Invitrogen) complementado com 10% FCS (Perbio, Hyclone) e 1% P/S (Invitrogen), para acelerar a eliminação dos hepatócitos adultos. Um tipo de célula com morfologia semelhante às mesenquimatosas, então surgiram espontaneamente,

15 proliferando e preenchendo o espaço vazio na chapa bem como confirmado por microscopia de contraste de fase. Essas células apareceram entre os dias 15 e 20 de cultura e apresentou uma forma achatada, citoplasma amplo e núcleos ovóides com um ou dois nucléolos (figura 1). Quando

20 alcançou 70% de confluência, as células foram suspensas com 0,25% de tripsina e 1 mM EDTA e novamente plaqueadas na concentração desejada. A análise da suspensão celular utilizando fluxo de citometria mostrou que a população se tornou homogênea após passagem 2. Para cada passagem, a

25 suspensão celular também foi analisada utilizando RT-PCR, e

imunofluorescência.

### ***Caracterização das células***

Para evitar a possível contaminação por outros tipos de células, imunocitoquímica foi realizada para estudar o fenótipo das células. Devido à sua origem hepática, os marcadores de expressão específicos, como a albumina, foram analisados em células fixadas em paraformaldeído. Tal como indicado na figura 2, albumina, que é exclusivamente expressa em hepatócitos, foi detectada tanto usando anticorpos monoclonais (clone Sigma A-1 11) como policlonais (Chemicon). Paralelamente, a expressão de marcadores de células mesenquimatosas também foi avaliada demonstrando que essas células são imuno-positivas para vimentina e alfa-actina de músculo liso (figura 2). Até agora as características fenotípicas têm sido estudadas ao longo de 7 passagens com grande estabilidade.

### ***Diferenciação de células***

As células foram semeadas em uma densidade de  $0,5 - 1 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup> em 6 placas de poço revestidas com colágeno tipo I rabo de rato, em DMEM suplementado com FCS e P/S. O meio de cultura foi trocado 24 horas depois para Iscove modified Dulbecco's médium (IMDM) (Invitrogen). Por indução, as células foram incubadas durante 2 semanas com meio de indução contendo IMDM complementado com 20 ng/ml HGF (Biosource), 10 ng/ml bFGF (Peprotech) e 0,61 g/l

nicotinamida (Sigma). Posteriormente, as células foram incubadas com meio de maturação contendo IMDM complementado com 20 ng/ml oncostatina M (Sigma), 1  $\mu$ M dexametasona (Sigma), 50 mg/ml ITS (insulina, transferrina, selênio) (Invitrogen). Para as etapas de indução e maturação, o meio foi mudado e analisado a cada 3 dias. Após a exposição a estes coquetéis, as células começaram a perder as suas arestas vivas, foram progressivamente encolhidas e perderam a sua morfologia inicial para adotar a uma forma poligonal (Figura 3).

#### Citometria de fluxo:

As células foram coletadas após centrifugação a 1200 rpm durante 5 min e re-suspensas em uma concentração de 500 a 1000/ $\mu$ l em PBS. As células foram então incubadas durante 30 minutos a uma temperatura de 4°C com anticorpos. Os isótopos de controle correspondentes foram utilizados para a avaliação de ligação inespecíficas dos anticorpos monoclonais. As células foram então lavadas e ressuspensas em Isoton<sup>®</sup> (Beckham Coulter) para uma leitura com citômetro de fluxo Beckham Coulter.

#### RT-PCR

O RNA total foi extraído a partir de células cultivadas em placas de 6 poços utilizando o reagente de isolamento TriPure (Roche) e cDNA que foram gerados usando o kit transcrição reversa, de acordo com as instruções do

fabricante. As ampliações PCR foram realizadas utilizando polimerase elongase em um volume final de 25 µl e primers apropriados. As amostras foram posteriormente eletroforesada com 1% gel de agarose e ácidos nucléicos foram visualizadas com coloração brometo de etídio.

#### Imunofluorescência

Para imunocoloração, células cultivadas em colágeno I rabo de rato - lamínulas de vidro arredondada de 12 mm foram ajustadas com paraformaldeído 4% (v/v) durante 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente permeabilizada com 1% de Triton X100 (v/v) em TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) durante 15 min. A imunocoloração não-específica foi impedida por 1h em incubação uma solução TBS contendo 3% de matéria seca de leite não-gorda a 37°C. As células foram incubadas em seguida, sucessivamente na mesma solução durante 1h à temperatura ambiente com anticorpos primários, lavadas 5 vezes com TBS e por 1h com anticorpos secundários (1/ 500). Os núcleos foram corados durante 30 min com o corante DAPI nuclear (1/5000). Após 3 lavagens, as preparações foram montadas em meios Fluoprep (BioMerieux, Bruxelas, Bélgica) e analisadas usando um microscópio invertido Olympus 1X70 acoplado a uma câmara CCD (T.I.L.L photonic, Martinsried, Alemanha). A excitação da luz (552, 488 e 372 nm por Br-3, FITC e DAPI, respectivamente) foi obtida a partir de uma

Xenon acoplada a uma lâmpada monocromática (T.I.L.L photonic, Martinsried, Alemanha). As imagens digitais foram adquiridas usando filtros apropriados e combinados usando o programa de computador TILLvision.

5 Moléculas detectadas nas células-tronco ou progenitoras da invenção

Usando as abordagens acima, os seguintes perfis de expressão de uma série de marcadores de células tem sido criados em um experimento para as células criadas neste exemplo (ADHLSC):

CD90 positivo. CD90, ou Thy-1, é uma proteína da superfície celular, consideradas indicativas da linhagem mesenquimal.

15 CD44 positivo. CD44 é uma célula de aderência molecular e é utilizada para identificar, pelo menos, alguns tipos de células-tronco mesenquimais (MSC).

Vimentina positiva. Vimentina é um filamento intermediário do tipo III normalmente detectada em células mesenquimatosas e fibroblastos.

20 Albumina positiva. Albumina é uma proteína plasmática produzida e segregada pelo fígado. Dentro de hepatócitos, albumina é geralmente encontrada como uma proteína citoplásmica.

25 CD29 positivo. CD29, também é conhecido como integrina beta-1, é uma glicoproteína transmembrana, também presente

no tecido hepático, formada com integrina alfa um receptor complexos envolvidos na interação com a matriz extracelular.

CD73 positivo. CD73 é uma ecto 5'-nucleotidase considerado um marcador mesenquimal.

CD49b positivo. CD49b é também chamada integrina alfa-2 ou receptor colágeno e está implicado na interação com matriz extracelular.

HLA-ABC positivo. HLA-ABC (antígenos A, B e C dos leucócitos humanos) são os complexos de histocompatibilidade principal dos antígenos classe I que formam heterodímeros.

Alfa-fetoproteína - baixos níveis de expressão. Alfa-fetoproteína é uma proteína expressada durante o desenvolvimento da endoderme primitiva e de toda a maturação, reflete a linhagem endodérmica.

Altos níveis de alfa-fetoproteína expressão geralmente revela tumorigênica shunt.

Alfa-1-antitripsina positiva. Alfa-1 antitripsina é uma proteína plasmática sintetizada pelo fígado.

Glicose 6-fosfato (G6P) positiva. G6P é uma enzima hepática que hidrolisa a glicose 6-fosfato para glicose e fosfato inorgânico, permitindo a glicose do fígado entre no sangue.

Citocromo P450 1B1 (CYP1B1) positivo. CYP1B1 é uma

dioxina citocromo indutível responsável pelo metabolismo da fase I de uma ampla gama de substratos estruturalmente diversos.

Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) positivo. CYP3A4 é uma  
5 enzima crucial envolvida no metabolismo de xenobióticos.

Fator 4 Nuclear de hepatócito (HNF-4) positivo. HNF4 é um receptor nuclear, é um fator de transcrição envolvido na regulação do metabolismo energético.

Triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) positivo. TDO é a  
10 primeira enzima envolvida na oxidação de triptofano no fígado.

Tirosina aminotransferase (TAT) positiva. TAT é uma enzima mitocondrial hepática específica envolvida no metabolismo do aminoácido e gliconeogênese.

Síntese da glutamina (GS) positiva. GS é uma enzima  
15 chave para a assimilação de amônio.

Gama glutamil transpeptidase (GGT) positiva. GGT é uma enzima envolvida no metabolismo da glutatona.

Citoqueratina 8 (CK8) positiva. CK8 é um filamento  
20 intermediário específico das células epiteliais.

Proteína 2 resistente a multidrogas (MRP2) positiva. MRP2 é um órgão ânion transportador responsável pela exportação de ânions orgânicos intracelular de hepatócitos para a árvore biliar.

25 Glutamato transportador 2 (EAAT2) positivo.

A presença das varias moléculas acima que podem participar da função hepática e metabolismo é indicativa da estreita ligação da linhagem celular ADHLSC para os fenótipos fígado.

5 CD117 negativo. CD117, também chamado de c-kit, é um receptor na superfície das células do tipo de células da medula óssea que identifica HSC MSC e, portanto, caracteriza bastante as células-tronco indiferenciadas.

10 CD34 negativo. CD34 é uma proteína da superfície celular em células da medula óssea, indicativas de HSC e progenitoras endoteliais.

15 CD45 negativo. CD45, também chamado de leucócitos antígeno, é uma tirosina fosfatase expressa das células da linhagem hematopoiéticas, incluindo as células-tronco hematopoiéticas.

CD105 negativo. CD105, também chamado SH2 ou endoglina, é uma molécula de aderência. Também é considerado um marcador de células-tronco mesenquimais.

20 CD133 negativo. CD133 é um marcador de células-tronco hematopoiéticas.

HLA-DR negativo. Estes antígenos de classe II do complexo de histocompatibilidade principal são membrana heterodímeras expressos restritivamente nos antígeno presentes nas células.

25 Oct-4 negativos. Oct-4 é um fator de transcrição

expressa apenas por células-tronco pluripotentes e essencial para a manutenção do estado indiferenciado.

Citoqueratina 19 (CK19) negativa. CK19 é amplamente utilizada como um marcador para células biliares, ou seja, colangiócitos.

Citocromo P 2B6 (CYP2B6) negativo. CYP2B6 está envolvido no metabolismo de endobióticos e xenobióticos.

CD54: Adesão intercelular molécula - 1 (ICAM-1), uma membrana glicoproteína

Sem pretender limitar de forma alguma, os presentes inventores, com base no seu conhecimento de células marcadoras, seguiram com uma possível interpretação dos dados acima: Esta combinação de marcadores define uma linhagem celular original, que exprime os marcadores de linhagem mesenquimais (CD90, CD73, vimentina, CD44), bem como marcadores de características do caminho de diferenciação hepática (CD29 e albumina, alfa-1-antitripsina, HNF4, transportador MRP2). A presença de albumina detectada tanto por imunofluorescência como por RT-PCR respondem veementemente contra uma possível contaminação com células estreladas. O ADHLSC não parece ser células-tronco mesenquimais e pluripotentes indiferenciadas (CD45 negativo, CD34 negativo, CD117 negativos, Oct-4 negativo), nem células estreladas do fígado (albumina positiva). A linhagem ADHLSC parece

empenhada na linhagem hepática (CD29 positivo, expressando albumina e alfa-1 antitripsina), mas não expressa tipicamente biliar (CK19 e 7 negativas). Assim, as células e linhagens celulares da invenção podem, de uma maneira não  
5 limitada, serem denominadas de células-tronco mesenquimais com características de um hepatócito progenitor.

Transplante em camundongos uPA-SCID, histologia e imunohistoquímica

Um milhão de ADHLSC (> 90% viabilidade), foi injetado  
10 no baço de 6 - a 14 dias de vida dos camundongos uPA<sup>+/+</sup>-SCID. Antes do transplante, os camundongos mostraram indetectáveis à albumina. Imunoistoquímica nas amostras de fígado de camundongos foram realizada em quatro pedaços de fígado com espessura de  $\mu\text{m}$  corados com hematoxilina e  
15 eosina (HE) para a avaliação histopatológica global. Para a imunocoloração, lâminas do fígado foram incubadas durante a noite com anticorpos primários em temperatura ambiente. A detecção foi realizada após incubar as lâminas marcadas com peroxidase polimérica e substrato cromogênico (Envision-DAB  
20 system, Dako, Carpinteria, CA).

A coloração foi realizada utilizando hematoxilina.

O modelo camundongo transgênico utilizado para o efeito de combinar uma patologia hepática (uPA) com imunodeficiência (SCID). Após transplante intra-esplênico  
25 de da suspensão ADHLSC, os camundongos uPA<sup>+/+</sup>-SCID foram

deixados para a recuperação por 10 semanas. A análise dos fígados dos camundongos uPA/SCID transplantados com ADHLSC, demonstraram que essas células foram capazes de enxertar (figura 4), e se diferenciarem em hepatócitos maduros (figura 5). Além disso, a albumina humana foi detectada no soro destes camundongos transplantados 10 semanas pós-transplante enquanto o nível de alfa-fetoproteína é expresso, um marcador de desenvolvimento tumoral, continuou indetectado.

10 As células transplantadas não proliferam como foi demonstrado pela observação microscópica, indicando a ausência de colônias tumorigênicas e nível normal da expressão de marcadores tumorigênicos de alfa-fetoproteína e Ki67. O nível normal da expressão corresponde  
15 essencialmente ao nível da expressão medido em hepatócitos normais e menores do que o nível de expressão medido na linhagem celular do fígado humano tumorigenicamente modificada, por exemplo, HepG2.

#### Exemplo 2

20 Um exemplo de tratamento com células-tronco ou progenitoras originadas do fígado da invenção, linhagem celular destas, ou populações celulares que compreende as mesmas (especificamente menciona, embora obviamente não limitada a linhagem LMBP 6452CB), ou suas descendentes,  
25 opcionalmente modificadas geneticamente, pode ser como a

seguir.

As células são infundidas em uma série de injeções, preferivelmente não superior a 25 a 50 x 10<sup>6</sup> células/kg, preferivelmente com intervalos de 4 horas, ou 8 horas, ou  
5 mais do que 8 horas por até uma semana, ou mais do que uma semana. A quantidade total de células de 250 x 10<sup>6</sup> células/kg, ou 500 x 10<sup>6</sup> células/kg estão em perfusão durante alguns dias, preferivelmente uma ou duas semanas. Uma série de infusões pode ser repetida sempre que  
10 necessário, a cada mês, de seis em seis meses, ou a cada um anos ou mais.

O acesso à veia portal por punção direta sob guias radiológicas e de ultra-som, através de uma punção da agulha, ou através de um cateter percutâneo, ou através de  
15 um dispositivo port-a-cath R, ou através de um dispositivo Broviac R cirurgicamente inseridos em qualquer tubo de drenagem para a veia portal, preferivelmente a veia mesentérica inferior, ou uma veia colônica. O cateter pode ser deixado no local por várias horas, preferivelmente  
20 vários dias, preferivelmente algumas semanas ou preferivelmente por vários meses até dois anos ou preferivelmente para repetidas infusões repetindo sempre que necessário.

A imunossupressão é iniciada no dia de infusão,  
25 preferivelmente no dia anterior, preferivelmente com

Tacrolimus (FK506) e esteróides. Através dos níveis sanguíneos de tacrolimus é preferencialmente 8 ng/ml inicialmente, 6 ng/ml após três meses, 4 ng/ml após 6 meses, e então mantido em torno de 4 ng / ml.

5 Esteróides são preferencialmente dados como prednisona ou prednisolona, inicialmente 5 mg/kg no dia 1, 4 mg/kg no dias 2, 3 mg/kg no dia 3, 2 mg/kg no dia 4, 1 mg/kg no dia 5, e, então diminuiu progressivamente para chegar a 0,25 mg/kg em 3 meses, e interromper em seis  
10 meses. A imunossupressão alternativa pode incluir, sozinha ou em combinação, Ciclosporina A, anticorpos do receptor anti IL2, Globulina anti-timócito, ou qualquer linfócitos humanos anticorpos monoclonais ou policlonais antilinfócitos humanos, azatioprina ou micofenolato mofetil  
15 qualquer agente antimetabólito, ciclosporina, rapamune ou qualquer outro inibidor de calcineurina.

## REIVINDICAÇÕES

1. Célula-tronco ou progenitora originadas do fígado adulto humano CARACTERIZADA pelo fato de que:

5 (a) esta expressa pelo menos um marcador mesenquimal escolhido dos marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina e  $\alpha$ -actina de músculo liso (ASMA),

(b) esta expressa o marcador hepatócito de albumina (ALB), e

10 (c) esta ser negativa para citoqueratina (CK-19).

2. Célula-tronco ou progenitora humana isolada, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que:

15 (a) esta expressa os marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina e ASMA,

(b) esta expressa ALB, e

(c) esta ser negativa para citoqueratina (CK-19).

3. Célula-tronco ou progenitora humana isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, 20 CARACTERIZADA por adicionalmente expressar um ou mais marcadores hepatócitos ou hepáticos escolhidos de CD29, alfa-fetoproteína (AFP), alfa-1-antitripsina, transportadores HNF-4 e MRP2.

4. Célula-tronco ou progenitora humana isolada, de 25 acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADA pelo fato de expressar CD29, AFP, alfa-1-antitripsina e transportador MRP2.

5. Célula-tronco ou progenitora originada de um fígado humano, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, CARACTERIZADA pelo fato de ser CD90, CD29 e CD44 positivo, e ser albumina positiva e alfa-actina positiva de músculo liso e ser negativa para CD45, CD34, CD117, e CK-19.

6. Célula-tronco ou progenitora humana isoladas, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, CARACTERIZADA pelo fato de que a dita célula tem morfologia semelhante à mesenquimal, envolvendo qualquer uma ou todas as formas de crescimento em monocamadas, achatada, citoplasma amplo e núcleos ovóides com um ou dois nucléolos.

7. Célula-tronco ou progenitora humana isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, CARACTERIZADA pelo fato de que a dita célula pode se diferenciar em hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos e, preferivelmente, não se diferenciar das células do tipo mesodermal.

8. Linhagem de células ou população celular CARACTERIZADA por compreender célula-tronco ou progenitora isolada do fígado humano, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, e suas descendentes.

9. Célula-tronco ou progenitora isolada do fígado humano de linhagem celular CARACTERIZADA por ser conforme depositada em 20 de fevereiro de 2006 sob o Tratado de Budapeste com o Consórcio Belga de Coleções Coordenadas de Microrganismos (BCCM), sob o número de acesso LMBP 6452CB, sublinhagem desta incluindo as sublinhagens clonais, e suas

descendências.

10. Método para obtenção de célula-tronco ou progenitora humana isolada ou uma população celular que compreende a dita célula-tronco ou progenitora, o método sendo CARACTERIZADO por: (a) dissociar o fígado adulto ou parte deste para formar uma população celular primárias do dito fígado adulto ou parte deste, (b) plaquear a população celular primária sobre um substrato que permite a aderência das células a este, (c) cultivar células da população primária, que se aderiram ao dito substrato, por pelo menos 7 dias, preferivelmente por pelo menos 10, pelo menos 13 ou pelo menos 15 dias, e (d) passar as células da etapa (c) pelo menos uma vez e preferivelmente, pelo menos duas vezes.

11. Célula-tronco ou progenitoras isoladas do fígado adulto humano, linhagem celular deste e/ou uma população celular que compreende as mesmas, CARACTERIZADA pelo fato de ser obtidas por ou diretamente obtidas usando o método da reivindicação 10.

12. Método para obter célula-tronco ou progenitora isolada do fígado adulto humano, linhagem celular deste e/ou uma população celular que compreende as mesmas, conforme definadas na reivindicação 11, o método sendo CARACTERIZADO por compreender: (a) dissociar, preferivelmente em duas etapas do método da collagenase, o fígado adulto ou parte deste a partir de um sujeito, para formar uma população celular primárias do dito fígado adulto ou parte deste; (b) plaquear a população celular primária em um colágeno do tipo

I revestido em substrato Williams Medium E compreendendo soro fetal de vitelo, preferivelmente 10% (v/v), EGF, preferivelmente 25ng/ml, insulina, preferivelmente 10 µg/ml, e dexametasona, preferivelmente 1 µM; (c) permitir a  
5 aderência das células a partir da população celular primárias para o dito substrato por 24 horas e, posteriormente, trocar o meio por um meio novo tendo a composição com em (b); (d) cultivar as células no dito meio (c) durante duas semanas (preferivelmente 15 dias); (e)  
10 trocar o meio por DMEM compreendendo alta glicose e FCS, preferivelmente 10%, e ainda cultivar as células, segundo a qual as ditas células-tronco ou progenitoras emergem e proliferam; (f) permitir que as células se tornem cerca de 70% confluentes e passar as células pelo menos uma vez e,  
15 preferivelmente, pelo menos, duas vezes, onde as células são plaqueadas no substrato como em (b) e cultivadas em um meio como em (e).

13. Composição, CARACTERIZADA por compreender célula-tronco ou progenitora do fígado humano, conforme definidas  
20 em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12, ou linhagem celular ou população celular conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12.

14. Célula-tronco ou progenitora do fígado humano, de acordo com qualquer uma reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12,  
25 ou linhagem celular ou população celular conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12, ou descendentes das mesmas CARACTERIZADAS por incluir a

descendência diferenciada, preferivelmente hepatócitos ou células semelhantes à hepatócitos, para utilização na terapia.

15 15. Uso de células-tronco ou progenitoras do fígado humano, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12, ou linhagem celular ou população celular conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 ou suas descendentes, CARACTERIZADO por incluir a descendência diferenciada, 10 preferivelmente hepatócitos ou células semelhantes a hepatócitos, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença hepática.

15 16. Uso de acordo com a reivindicação 15, CARACTERIZADO pelo fato de que a doença hepática inclui fenilcetonúria e outras aminoacidopatias, hemofilia e outras deficiências do fator de coagulação, hipercolesterolemia familiar, outras desordens do metabolismo lipídico, perturbações do ciclo da uréia, glicogenoses, galactosemia, fructosemia, tirosinemia, deficiências do metabolismo dos 20 carboidratos e proteínas, acidúria orgânica, doenças mitocondriais, doenças lisossomais e peroxissomais, anormalidade da síntese protéica, defeitos dos portadores das células do fígado, defeito de glicosilação, hepatite, cirrose, erros inatos de metabolismo, insuficiência hepática 25 aguda, infecção hepática aguda, toxicidade química aguda, insuficiência hepática crônica, colangite, cirrose biliar, síndrome de Alagille, deficiência de alfa-1-antitripsina,

hepatite autoimune, atresia biliar, câncer de fígado, doença  
cística hepática, gordura no fígado, galactosemia, cálculos  
bilíares, síndrome de Gilbert, hemocromatose, hepatite A,  
hepatite B, hepatite C, e outras infecções virais hepáticas,  
5 porfiria, colangite esclerosante primária, síndrome de Reye,  
sarcoidose, tirosinemia, glicogenose tipo 1, ou doença de  
Wilson.

17. Composição farmacêutica, CARACTERIZADA por  
compreender a célula-tronco ou progenitora do fígado humano,  
10 conforme definidas nas reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12 ou  
linhagem celular ou população celular conforme definidas nas  
reivindicações 8, 9, 11, 12 e um portador farmacêuticamente  
aceitável.

18. Método de realização de testes de toxicidade in  
15 vitro CARACTERIZADO por compreender: expor a um agente de  
teste a célula-tronco ou progenitora do fígado conforme  
definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, 9,  
11, 12 ou linhagem celular ou população celular conforme  
definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 e  
20 observar pelo menos um efeito, se for o caso, do agente de  
teste sobre a população de células do fígado.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18,  
CARACTERIZADO pelo fato de que pelo menos um efeito inclui  
um efeito sobre a viabilidade celular, função celular, ou  
25 ambos.

20. Método de realização de estudos in vitro do  
metabolismo da droga, CARACTERIZADO por compreender: (i)

expor a célula-tronco ou progenitora do fígado humano, conforme definidas em qualquer das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12 ou linhagem celular ou população celular conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 a um agente de teste, e (ii) observar pelo menos uma mudança, se for o caso, envolvendo o agente de teste após um período de teste predeterminado.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, CARACTERIZADO por pelo menos uma mudança incluir uma mudança na estrutura, concentração, ou em ambas do agente de teste.

22. Dispositivo para assistir o fígado, CARACTERIZADO por compreender um recipiente para colher células-tronco ou progenitoras do fígado humano, conforme definidas em qualquer das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12 ou linhagem celular ou população celular conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12.

23. Uso de célula-tronco ou progenitora do fígado humano, conforme definidas em qualquer das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12 ou linhagem celular ou população celular conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 CARACTERIZADO pelo fato de que uma cópia funcional de um gene é introduzida para produção de um medicamento para tratar erros da expressão genética, cujo dito medicamento é introduzido no fígado de um paciente que se encontra na necessidade de uma cópia funcional do gene.

24. Composição para tratar erros da expressão genética, CARACTERIZADA por compreender célula-tronco ou

progenitora do fígado humano transformada, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12, ou linhagem celular transformada ou população celular, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 onde uma cópia funcional de um gene foi introduzida.

25. Composição farmacêutica para tratar erros de expressão genética, CARACTERIZADA por compreender célula-tronco ou progenitora do fígado humano transformada, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12, ou linhagem celular transformada ou população celular, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 onde uma cópia funcional de um gene foi introduzida e um portador aceitável farmacologicamente.

26. Uso de célula-tronco ou progenitora do fígado humano, conforme definidas em qualquer das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12 ou linhagem celular ou população celular conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 CARACTERIZADO pelo fato de que produzir um medicamento para melhorar a regeneração de um fígado doente ou prejudicado.

27. Método para realizar um teste com agentes eficazes para tratar infecções do fígado, CARACTERIZADO por compreender (i) infectar com um agente infeccioso de interesse a célula-tronco ou progenitora do fígado, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 7, 9, 11, 12

ou linhagem celular ou população celular, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 para proporcionar uma população infectada, (ii) expor a população infectada a uma determinada quantidade de agente de teste, e  
5 (iii) observar os efeitos, se for o caso, da exposição sobre a população infectada.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, CARACTERIZADO por o agente infeccioso incluir um microorganismo.

10 29. Método, de acordo com a reivindicação 27, CARACTERIZADO por o agente infeccioso incluir um ou mais vírus, bactérias, fungos, ou combinações dos mesmos.

30. Método, de acordo com a reivindicação 27, CARACTERIZADO por os efeitos observados incluírem os efeitos  
15 sobre a replicação viral de um agente infeccioso viral.

31. Método, de acordo com a reivindicação 27, CARACTERIZADO por o agente infeccioso viral incluir um vírus da hepatite.

32. Método para produzir uma proteína de interesse,  
20 CARACTERIZADO por compreender introduzir na célula-tronco ou progenitora do fígado, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, 9, 11, 12, ou a linhagem celular ou população celular, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 8, 9, 11, 12 um gene funcional que  
25 codifica uma proteína de interesse, incubar a população celular do fígado em condições efetiva para transcrição, translação e, opcionalmente levar a modificação pós-

translacional, e coletar a proteína de interesse.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, CARACTERIZADO pelo fato de que as células do fígado são células do fígado humano.

5 34. Método, de acordo com a reivindicação 33, CARACTERIZADO pelo fato de que a proteína de interesse compreende uma vacina com antígeno.

FIG. 1

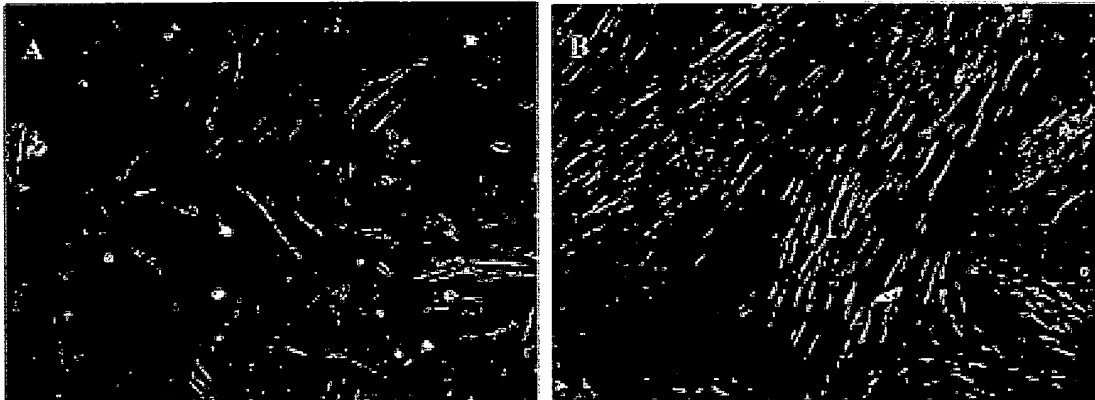


FIG. 2A

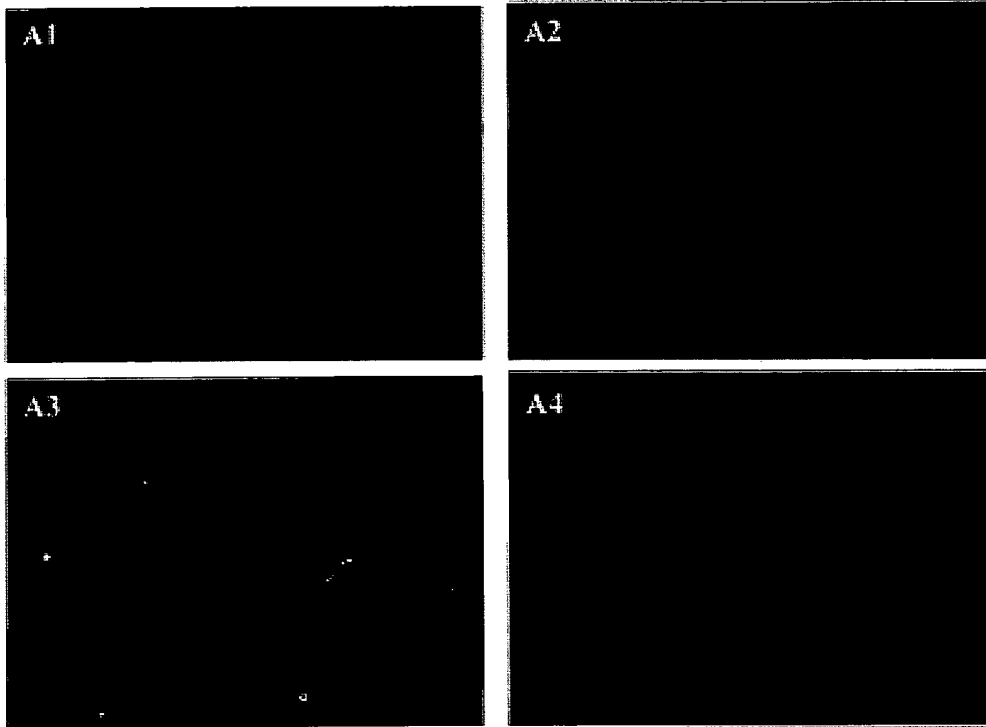


FIG. 2B

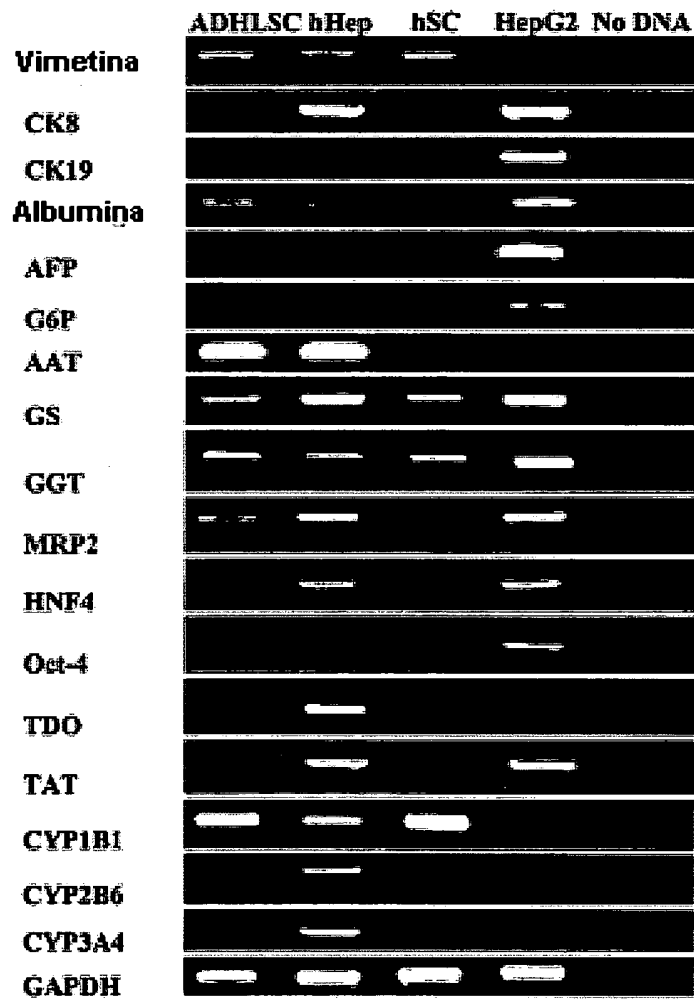


FIG. 3

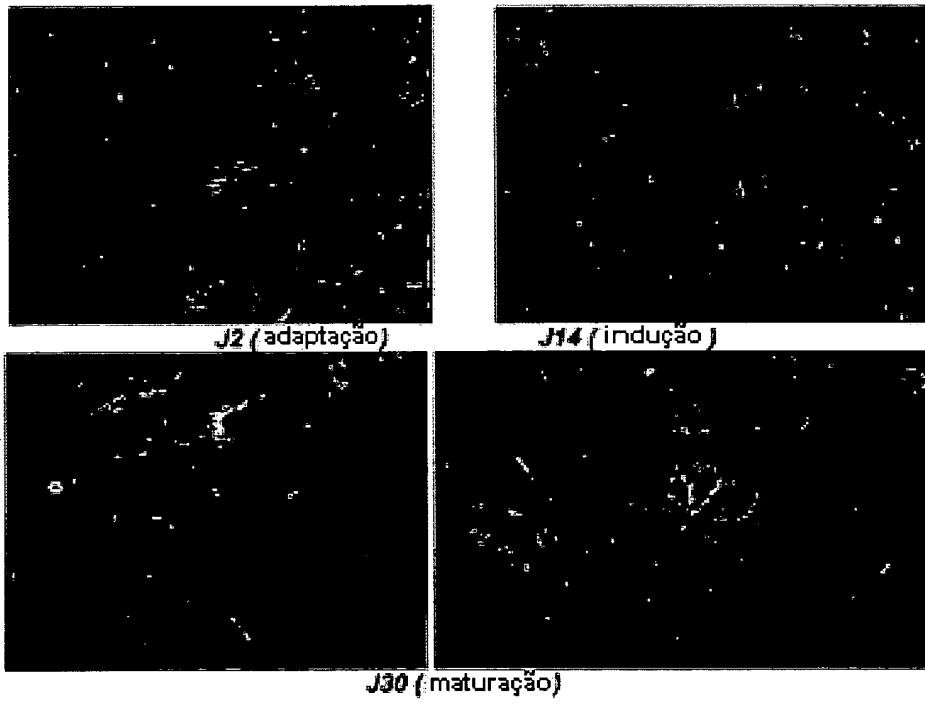


FIG. 4

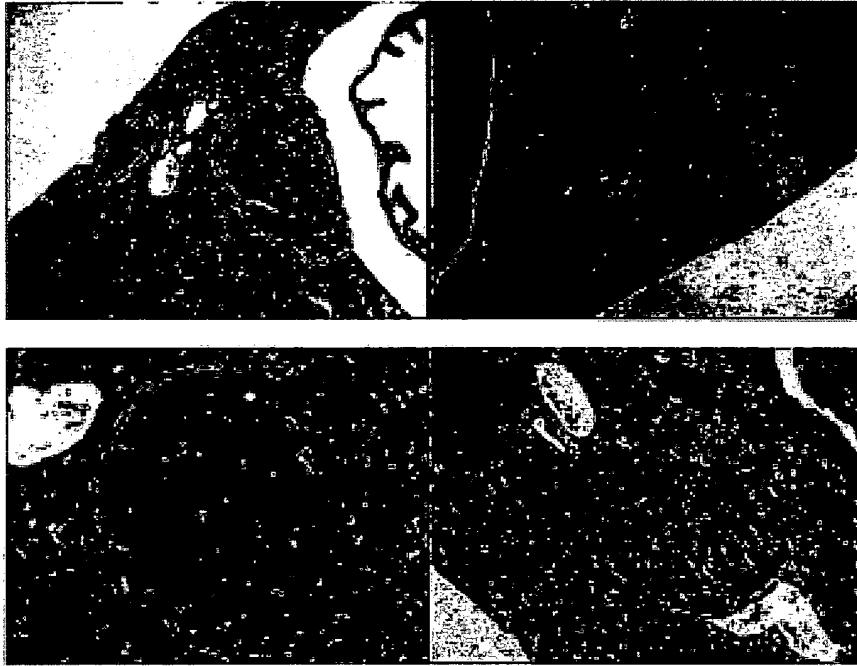
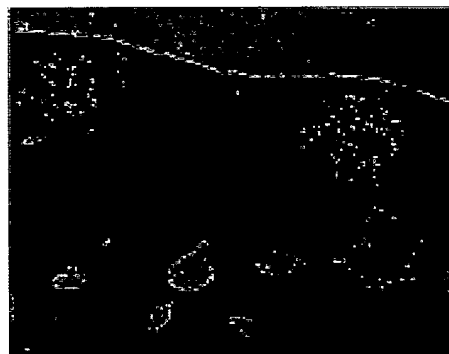
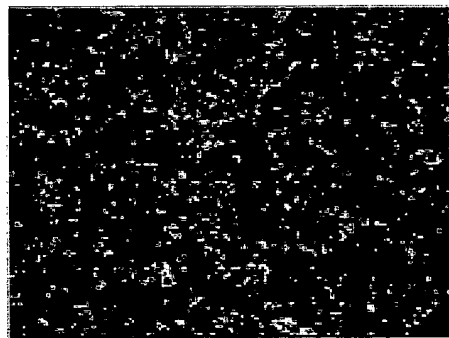
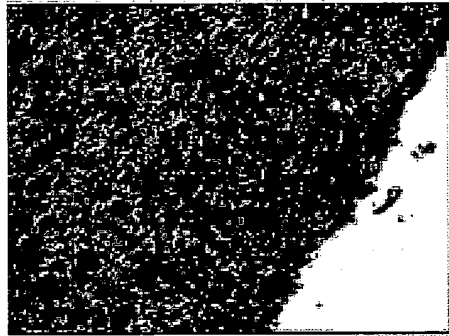


FIG. 6



P.1002.0049-4

## RESUMO

## CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DO FÍGADO

A presente invenção diz respeito às células-tronco progenitoras isoladas do fígado, e população celular destas, onde a dita célula-tronco progenitoras são originárias de um fígado adulto, sobretudo de um ser humano. A presente invenção também se relaciona à utilização das ditas células-tronco progenitoras isoladas em remédios, hepatologia, erros inatos do metabolismo hepático, transplantes, doenças infecciosas, insuficiência hepática. A presente invenção também se relaciona aos métodos de isolamento destas células, sua cultura, a caracterização antes e depois da diferenciação, e seu uso em transplantes, modelos animais de doenças humanas, toxicologias e farmacologias.