



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

(21) **PI0620636-0 A2**

(22) Data de Depósito: 21/12/2006
(43) Data da Publicação: 16/11/2011
(RPI 2132)



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

(54) Título: MÉTODO PARA USAR PROGENITORES HEPÁTICOS PARA TRATAR DISFUNÇÃO HEPÁTICA

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2005 US 60/752,597

(73) Titular(es): Vesta Therapeutics, INC

(72) Inventor(es): John W. Ludlow, Marck Johnston, Sonya Sherwood

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006048650 de 21/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/075812 de 05/07/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA USAR PROGENITORES HEPÁTICOS PARA TRATAR DISFUNÇÃO HEPÁTICA. A presente invenção refere-se a métodos para usar progenitores hepáticos no tratamento de disfunção hepática. Mais particularmente, métodos para usar células progenitoras hepáticas, inclusive células-tronco, no tratamento de disfunção hepática em ausência de quantidades imunossupressoras de um imunossupressor.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA USAR PROGENITORES HEPÁTICOS PARA TRATAR DISFUNÇÃO HEPÁTICA**".

REFERÊNCIAS CRUZADAS RELACIONADAS A PEDIDOS DE PATENTE

- 5 Este pedido de patente reivindica prioridade do Pedido Provisório US 60/752.597 depositado em 22 de dezembro de 2005, cuja exposição é aqui incorporada a título de referência, em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

- 10 A presente invenção refere-se em geral ao uso de progenitores hepáticos para tratar disfunção hepática. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a métodos para usar células progenitoras hepáticas, incluindo células-tronco hepáticas, no tratamento de disfunção hepática, sem o uso concomitante de imunossuppressores.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

- 15 A eficácia de transplantes totais e parciais de fígado é substancialmente dependente da imunorresposta do hospedeiro (por exemplo, Doença de Enxerto versus Hospedeiro ("GVHD")). Certamente, dentre pacientes geneticamente não idênticos, o corpo do hospedeiro pode rejeitar o tecido do doador em uma questão de horas. Considerando este potencial, tempo e esforço substanciais são gastos para "corresponder" geneticamente
20 doadores com possíveis hospedeiros.

- Contudo, na ausência de gêmeos geneticamente idênticos, o sistema imunológico de mesmo o melhor recipiente "correspondido" irá, no entanto, apresentar uma resposta para rejeitar o tecido do doador. Assim,
25 quase todos os transplantes de órgãos são seguidos pelo uso substancial de imunossuppressores de curto prazo, se não por quanto durar o transplante. Com respeito aos transplantes de fígado, por exemplo, os inibidores de calcineurina, tacrolimus e ciclosporina são largamente usados para prevenir rejeição de aloenxerto.

- 30 Infelizmente, imunossuppressores não são uma panacéia. Em primeiro lugar, os imunossuppressores nem sempre são eficazes e devem ser tomados em um programa regular. Em segundo lugar, o uso crônico desses

fármacos deixa o paciente vulnerável às infecções bacterianas e virais que podem ainda agravar a condição dele. Certamente, inibidores de calcineurina podem levar à nefrotoxicidade, freqüentemente resultando em insuficiência renal após o transplante. Adicionais efeitos colaterais, adversos, de longo prazo, incluem intolerância à glicose e hiperlipidemia. Portanto, o uso de células imunoprivilegiadas reduziria a necessidade, se alguma, de imunossupressão e seus efeitos colaterais adversos correspondentes.

Por conseguinte, existe a necessidade por um método para tratar disfunção hepática com células alogênicas que não produzam uma imunorresposta. Há também a necessidade por um método para transplantar células hepáticas, com pouco a nenhum imunossupressor.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em uma modalidade da presente invenção, é proporcionado um método para repopular o compartimento do fígado de um mamífero, que compreende (a) proporcionar progenitores hepáticos isolados e (b) administrar os ditos progenitores hepáticos isolados no compartimento do fígado do mamífero; em que a administração é realizada com baixos níveis de imunossuppressores. A administração pode ser por implante ou por injeção. Ainda, o baixo nível de imunossupressor varia entre cerca de 0 mg e cerca de 10 mg. Mais preferivelmente, o nível de imunossupressor varia entre cerca de 0 mg e cerca de 5 mg.

Como tal, aqueles versados na técnica apreciarão que a concepção na qual essa descrição é baseada pode ser prontamente utilizada como uma base para desenhar outras estruturas, métodos e sistemas para conduzir os vários propósitos da presente invenção. Portanto, é importante que as reivindicações sejam consideradas como incluindo tais construções equivalentes até onde não se desviam do espírito e escopo da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra a resposta de PBMCs às populações de células hepáticas identificadas.

A figura 2 mostra a resposta de células T purificadas às popula-

ções de células hepáticas identificadas.

A figura 3 mostra os resultados de ensaios de reações de linfócitos mistos realizadas nas populações de células identificadas. 3A: resposta de PBMC. 3B: Respostas de células T Purificadas.

5 A figura 4 mostra a resposta de células T purificadas às células hepáticas positivas para EpCAM.

A figura 5 mostra uma outra resposta de células T purificadas às células hepáticas positivas para EpCAM.

10 A figura 6 mostra ainda uma outra resposta de células T purificadas às células hepáticas positivas para EpCAM.

A figura 7 mostra ainda uma outra resposta de células T purificadas às células hepáticas positivas para EpCAM.

A figura 8 mostra a supressão de uma reação de linfócitos mistos por células positivas para EpCAM.

15 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona métodos para transplante de células progenitoras hepáticas em mamíferos sem necessidade de doses correntemente padrão de imunossuppressores, se alguma de todo. Ou seja, em uma modalidade preferida da invenção, progenitores hepáticos podem ser introduzidos em um hospedeiro alogênico com pouco ou nenhuma administração concomitante de imunossuppressores para prevenir a rejeição destes.

Correntemente, a maioria, se não todos, dos transplantes de fígado parciais ou totais em um recipiente alogênico requer o uso de um imunossupressor de modo a prevenir imunorrejeição (isto é GVHD) do tecido transplantado. Enquanto a dose e a duração de uso de imunossupressor variam bastante entre os transplantes de acordo com fatores, tais como tecido, "correspondência" genética relativa, a presente descoberta e invenção proporcionam uma redução significativa no uso total dos fármacos. Imunossuppressores comuns incluem, mas sem limitação, prednisona (por exemplo, ORASONE®), azatioprina (por exemplo, IMURAN®), ciclosporina (por exemplo, SANDIMMUNE®, NEORAL®), e micofenolato (por exemplo,

CELLCEPT®).

Correntemente, dose de imunossupressores comuns variam de cerca de 5 mg a cerca de 20 mg. Vide Tabela 1, abaixo. A presente invenção proporciona transplante alogênico de células hepáticas em quantidades sub-
5 imunossupressoras de doses imunossupressoras, e preferivelmente nenhum imunossupressor de modo algum. Em outras palavras, para qualquer recipiente individual, uma quantidade sub-imunossupressora de um imunossupressor é definida como uma quantidade menor que aquela que produziria uma supressão da imunorresposta no indivíduo. Ensaio são disponíveis e
10 são conhecidos por aqueles com conhecimento comum da técnica de medir a dose ótima de um imunossupressor para obter imunossupressão. Esses testes incluem, por exemplo, ensaios de radiorreceptores quantitativos, ensaios de proximidade de cintilação, ensaios MTT e kits e analisadores clínicos comercialmente disponíveis (por exemplo, ensaio de IMx® Sirolimus usando tecnologia de Imunoensaio de Enzima de Micropartícula (MEIA) da
15 Abbott Labs; CEDIA CsA PLUS da Roche Diagnostics. Além disso, ensaios *in vitro* tais como aqueles descritos abaixo podem proporcionar também correlações razoáveis para curvas de doses eficazes *in vivo*. Conforme definição no presente relatório descritivo, uma resposta de dose de menos que
20 cerca de 30% da resposta de dose ótima é considerada subimune, preferivelmente uma resposta dose de menos que cerca de 60%, e mais preferivelmente uma resposta de dose de menos que cerca de 90%. Tipicamente, doses sub-imunossupressoras da presente invenção variam, preferivelmente, de cerca de 0 mg a cerca de 10 mg, mais preferivelmente de cerca
25 de 0 mg a cerca de 5 mg, e, de maior preferência, de cerca de 0 mg a cerca de 3 mg.

Tabela 1. Diretrizes gerais para dose de prednisona de longo prazo e regimes para diminuição gradual de prednisona nos recipientes.

(Vide

<http://med.stanford.edu/shs/txp/livertxp/outpatient.management/management>

5 [.html#t3.](#))

Tempo pós-transplante	Dose (mg)
Imunossupressão baseada em Tacrolimus	
0-2 semanas	20
2-8 semanas	15
8-16 semanas	10
4-6 meses	7,5
6-9 meses	5
>9 meses	Diminuir gradualmente e descontinuar
Tacrolimus em pacientes com hepatite crônica B ou C	
0-2 semanas	20
2-4 semanas	15
4-8 semanas	10
2-3 meses	7,5
3-6 meses	5
>6 meses	Diminuir gradualmente e descontinuar
Imunossupressão baseada em ciclosporina	
0-2 semanas	20
2-26 semanas	15
6-9 meses	10
9-12 meses	7,5
12-18 meses	5,0

A invenção é útil na repopulação de tecido de fígado doente ou disfuncional com, de outro modo, células de tecido de doador saudável. A repopulação de um fígado doente ou com disfunção com tecido de fígado funcional pode repor, pelo menos em alguma parte, a atividade perdida do tecido disfuncional. Desse modo, doenças do fígado podem ser tratadas.

A invenção será agora descrita por meio de exemplos não limitativos.

Isolamento de Células Humanas

É observado que progenitores hepáticos adequados para propagação *in vivo* de acordo com a presente invenção não são limitados àqueles isolados ou identificados por qualquer método particular. A título de exemplo, métodos para o isolamento e identificação dos progenitores hepáticos estão descritos em, por exemplo, Patente US 6.069.005 e Pedidos de Patente US

09/487.318; US 10/135.700; e US 10/387.547, cujas descrições são aqui incorporadas, a título de referência, em sua totalidade.

Células-tronco hepáticas e hepatoblastos têm perfis antigênicos característicos e podem ser isolados por protocolos descritos previamente.

5 Por exemplo, células-tronco hepáticas e hepatoblastos compartilham numerosos antígenos (por exemplo, citoqueratinas 8, 18, e 19, albumina, CD133/1, e molécula de adesão de célula epitelial ("EpCAM") e são negativas para marcadores hemopoiéticos (por exemplo, glicoforina A, CD34, CD38, CD45) e marcadores de células mesenquimais (por exemplo,
10 CD146). Alternativamente, células-tronco hepáticas e hepatoblastos podem ser distinguidos uns dos outros por tamanho (as células-tronco têm de 7-9 μm ; os hepatoblastos têm de 10-12 μm) e por perfis antigênicos (N-CAM está presente nas células-tronco hepáticas, ao passo que a alfa-fetoproteína (AFP) e ICAM1 são expressas pelos hepatoblastos).

15 No presente Exemplo, fígados doados, não adequados para transplante de fígado ortotópico foram obtidos de organizações de obtenção de órgãos designadas federalmente. Consentimento informado foi obtido do parente mais próximo para uso dos fígados para fins de pesquisa. Para isolar as células, fígados adultos e pediátricos foram perfundidos através da
20 veia portal e artéria hepática com tampão contendo EGTA por 15 minutos, seguidos por 125 mg/L de Liberase (Roache) por 30 minutos, a 34°C. As células foram passadas sequencialmente através de filtros de tamanho de poro de 1.000, 500, 250, e 150 micra, e centrifugadas em gradientes de densidade em 500 x g.

25 Seleção de Células Magnéticas

A seleção de células magnéticas pode oferecer um meio conveniente para isolar células que expressam um antígeno de superfície específico de uma população de células heterogêneas. Em uma modalidade, um sistema comercialmente disponível (Microcontas "MACS", Miltenyi Biotec) foi
30 usado para realizar a tarefa de selecionar células positivas para EpCAM, um marcador indicativo de células progenitoras hepáticas. Um anticorpo monoclonal para o antígeno de interesse pode ser acoplado a microcontas super-

paramagnéticas, compostas de óxido de ferro e um revestimento de polissacarídeo. As microcontas são de aproximadamente 50 nanômetros de diâmetro e têm um volume de cerca de um milionésimo daquele de uma célula típica de mamífero. Elas são pequenas o bastante para permanecerem em suspensão coloidal, que pode permitir ligação, rápida e eficaz, mediada por anticorpos às moléculas de superfície de célula. Os fabricantes forneceram evidência de que as microcontas não interferem com a citometria de fluxo, que elas são biodegradáveis, e que elas têm efeitos desprezíveis sobre as funções celulares.

O anticorpo usado para seleção pode ser usado em um método direto, conforme descrição acima, ou em um indireto onde as contas são covalentemente ligadas a um anticorpo monoclonal contra um ligante tal como fluoresceína ou biotina e então utilizadas para capturar células com um anticorpo monoclonal ligado à superfície que foi modificado com aquele ligante. Tanto com os métodos de imunoseleção diretos como com os indiretos, as células que foram incubadas com as contas marcadas são passadas através de uma coluna em presença de um campo magnético forte de modo que as células positivas para antígeno são retidas enquanto as células negativas são arrastadas. Depois da remoção do campo magnético, as células marcadas positivamente são coletadas.

Análise de FACs para Marcadores Antigênicos

Para marcadores de superfície de célula (por exemplo, EpCAM), 1×10^6 células foram precipitadas a 500 x g, por 5 minutos, e ressuspensas em 100 μ L de PBS contendo 2% de FBS e 0,01% de NaN_3 , 1 μ g do anticorpo de interesse foi então lavado e incubado por 30 minutos, sobre gelo, no escuro. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS e o precipitado de células final foi ressuspenso em 0,5 mL de paraformaldeído a 1%. 1 μ g de IgG1 de camundongo-FITC e IgG1 de camundongo-PE foram adicionados às células de controle apropriadas.

Reação de linfócitos mistos para imunogenicidade

Um ensaio de reação de linfócitos mistos (MLR) foi usado para avaliar a imunogenicidade *in vitro*. Esse ensaio mede a proliferação das cé-

lulas T respondedoras a uma população de estimuladores alogênicos. Em resumo, células mononucleares sangüíneas periféricas humanas (PBMCs) foram purificadas de sangue integral por centrifugação sobre ficoll/hipaque. Essas células, bem como as células T isoladas da população de PBMC, foram usadas como células respondedoras na MLR. As células T foram enriquecidas por técnicas de seleção negativa por marcação de células B e monócitos com contas magnéticas revestidas com anticorpo e removendo as mesmas com um ímã. As células estimuladoras eram células hepáticas recém-isoladas e células progenitoras hepáticas isoladas.

Cada população de células estimuladoras foi tratada com mitomicina C (10 µg/mL de mitomicina C por 3 horas) ou irradiada para impedir que as células estimuladoras se proliferassem no ensaio. Células T respondedoras de um indivíduo que não o doador (leukopacks foram adquiridas da Poietics, Inc.) foram cultivadas (2×10^5 células/cavidade) com números variados de cada população de estimuladores (faixa de $0,2-2,0 \times 10^5$ células/cavidade) em meio de cultura de tecido suplementado com 5% de soro de AB humana em placas de fundo chato com 96 cavidades. Culturas de controle adicionais consistiam em células respondedoras ou estimuladores cultivadas sozinhas. Culturas quadruplicadas foram estabelecidas para cada tratamento. As culturas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂, por 6 dias. As culturas foram então pulsadas com 1 µCi/cavidade de 3H-timidina, por 16 horas, colhidas sobre filtros de fibra de vidro, e contadas em um contador de cintilação.

A quantidade de radioatividade incorporada (cpm) foi apresentada proporcional à proliferação de células T. Delta cpms foram calculadas com base na respostas das células T a uma população de estimuladores, subtraindo o resíduo apropriado das populações de respondedores e de estimuladores cultivadas sozinha.

Reação de linfócitos mistos por imunossupressão

O ensaio de MLR, essencialmente como descrito acima, foi também realizado usando a população de células estimuladoras alogênicas. A essas reações, fibroblastos esplênicos não supressores (5×10^3 , 10×10^3 , e

20 x 10³ células) foram titulados como controles. Reações paralelas com células progenitoras isoladas recentemente foram tituladas em "experimentos". A incorporação de ³H-timidina em células T foi então medida. Níveis experimentais de incorporação de ³H-timidina igual a ou maior que aqueles dos controles foram interpretados para significar que as células progenitoras hepáticas não são capazes de suprimir uma imunorresposta.

Resultados

Uma mistura não fracionada de células hepáticas ("Umix") e uma população aderente derivada de uma cultura de 3 dias de células UMIX ("Hepatócitos Expandidos") foram estudados. Como mostrado na figura 1, PBMCs não fracionadas responderam significativamente ($p < 0,5$) acima das respostas residuais autólogas às Umix irradiadas e Hepatócitos Expandidos em níveis de 6.000/cavidade, 30.000/cavidade, e 150.000/cavidade (Hepatócitos Expandidos somente). Além disso, a resposta aos Hepatócitos Expandidos foi significativamente maior para todas as doses que a resposta às células Umix ($p < 0,05$). Respostas na dose mais alta de 150.000 de células hepáticas/cavidade foram baixas, mais provavelmente por causa da aglomeração (Células Umix e Hepatócitos Expandidos são células grandes que cobrem completamente as células da dose de 30.000 células/cavidade). A menor dose de células estimuladoras, ambas as populações de células hepáticas foram mais estimuladoras que as PBMCs alogênicas. Em doses mais altas, as PBMCs foram mais estimuladoras.

Como mostrado na figura 2, células T purificadas deram um padrão similar de respostas às Umix e Hepatócitos Expandidos. Os Hepatócitos Expandidos estimularam significativamente as células T acima dos níveis residuais em todas as doses, e a resposta à população expandida foi significativamente maior que a resposta às células Umix. Células T purificadas (deficientes em células apresentadoras de antígeno (APCs)) responderam vigorosamente aos Hepatócitos Expandidos sugerindo que estas células poderiam funcionar como APCs. As células T produziram uma resposta menos vigorosa à população de Umix que as células respondedoras PBMC (contendo APCs)) sugerindo que uma fonte exógena de APCs foi requerida para

esta resposta.

Experimentos similares foram primeiramente realizados em células-tronco/progenitoras hepáticas imunosseleccionadas com anticorpo para EpACAM e isoladas por classificação magnética de células ativadas. Análise de FACS da população de células isoladas revelou uma pureza de cerca de 82%. Os resultados dos experimentos com MLR nestas células são mostrados na figura 3. Células respondedoras consistindo em células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMCs, painel A; 3×10^5 células) e células T purificadas (painel B: 2×10^5 células) foram misturadas com células estimuladores compreendidas de PMBCs autólogas (xAuto), PBMCs alogênicas (xAllo), ou células progenitoras hepáticas adultas (xHelp). Quantidades diferentes dessas células estimuladores foram testadas (barra azul = $12,5 \times 10^3$; barra púrpura = 25×10^3 células; barra amarela = 50×10^3 células).

As PMBCs alogênicas elicitaram uma imunorresposta, conforme detectada por absorção de ^3H -timidina da população de células T proliferativas. Em contraste, a magnitude da proliferação de células T para as células progenitoras hepáticas não foi significativamente diferente da resposta para PBMCs de controle autólogas. Esses dados suportam a conclusão que as células-tronco/progenitoras hepáticas adultas não são imunogênicas.

Usando uma preparação diferente de células-tronco/hepáticas progenitoras adultas, foi realizado um experimento para avaliar a imunogenicidade destas células. Experimentos adicionais foram também conduzidos para avaliar a capacidade de imunossupressão dessas células. As figuras 4-7 revelam que as células EpCAM+ não estimularam uma resposta proliferativa de células T de qualquer um dos dois diferentes doadores de PMBC e células T.

Os resultados dos experimentos de imunossupressão são mostrados na figura 8. Os dados revelam que as células tronco/progenitoras hepáticas adultas não suprimem a resposta da MLR. A conclusão desse experimento é que as células EpCAM não têm capacidade imunossupressora.

Tomados juntos, tanto as Umix como os Hepatócitos Expandidos são imunogênicos na medida em que eles estimulam uma quantidade signi-

ficativa de proliferação de células T acima da resposta residual às PMBCs autólogas. Contudo, Hepatócitos Expandidos são significativamente mais imunogênicos que células Umix e eles estimularam diretamente as células T purificadas sugerindo que estas células (ou uma subpopulação destas células) podem funcionar como células apresentadoras de antígeno. Em contraste, as células Umix estimularam fracamente as células T purificadas com relação às PMBCs, sugerindo que as células Umix não podem funcionar como APCs e requerem o auxílio de APC da população de PBMC para estimular uma resposta.

Esses dados sugerem que ambas as populações de células (Umix e Hepatócitos Expandidos) são prováveis de induzir uma resposta de células T quando transplantadas para um recipiente alogênico com um sistema imunológico intacto. Seria esperado que a população de Hepatócitos Expandidos elicitasse uma imunorresposta mais robusta que as células Umix *in vivo*.

Células-tronco/progenitoras hepáticas adultas não parecem ser imunogênicas, como evidenciado por sua deficiência em estimular significativa quantidade de proliferação de células T acima da resposta residual às PMBCs autólogas. Também, células-tronco/progenitoras hepáticas adultas não são imunossupressoras, como evidenciado por sua incapacidade de suprimir quantidades significantes de proliferação de células acima da resposta residual às PMBCs autólogas. Finalmente, os resultados sugerem que células-tronco/progenitoras hepáticas adultas (células positivas para EpCAM) não expressam níveis baixos de moléculas MHC (provavelmente nenhuma classe II) e elas não são mais provavelmente deficientes em expressar moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86). Assim, as células-tronco/progenitoras hepáticas adultas (células positivas para EpCAM) podem ser boas candidatas para transplante de células alogênicas.

Certamente, células-tronco/progenitoras hepáticas humanas derivadas de adultos, conforme definidas pela expressão EpCAM, Alb, e CK19, são úteis como um produto de terapia de células hepáticas imunoprivilegiadas. Ensaio de sobrevivência de xenoenxertos *in vivo* usando células-

tronco/progenitoras hepáticas humanas derivadas de adulto podem ser enxertados em um sítio convencional (isto é não-imunoprivilegiado), por exemplo, embaixo da cápsula do rim usando técnicas estabelecidas. Quando desejável, um número idêntico de hepatócitos maduros derivados de adulto
5 pode ser implantado em animais de controle.

Uma incisão na pele pode ser feita no flanco de camundongos recipientes, a parede muscular incisada e o rim exteriorizado. Uma bolsa subcapsular pode ser criada entre o rim e o córtex do rim, e as células usadas para o enxerto colocadas na bolsa. O rim pode ser repostado na cavidade
10 abdominal e a pele fechada com grampos. A avaliação *in vivo* da sobrevivência do enxerto pode ser feita por inspeção visual usando um microscópio de operação em tempos selecionados pós-implante. Uma avaliação da aparência do enxerto (por exemplo, necrose) e do crescimento interno vascular pode ser feita no curso de tempo (por exemplo, 1 hora, 1 dia, 7, 14, 21, 28
15 dias).

Além disso, estudos histoquímicos para CD45 em um curso de tempo similar das secções congeladas de enxertos colocadas sob a cápsula de rim podem ser adicionalmente realizados. O antígeno CD45 é uma tirosina fosfatase, também conhecida como o antígeno comum de leucócito
20 (LCA). CD45 está presente em todas as células humanas de origem hematopoiética, exceto células eritróides, plaquetas e suas células precursoras. A molécula CD45 é requerida para ativação de células T e células B e é expressa em pelo menos 5 isoformas, dependendo do estado de ativação da célula. Uma falta de acúmulo de células CD45+ no sítio de enxerto indica
25 geralmente falta de uma imunorresposta pelo hospedeiro, suportando a noção que as células enxertadas são não imunogênicas. Esse achado pode ser esperado formar o transplante de células-tronco/progenitoras hepáticas humanas adultas. Inversamente, os camundongos de controle, nos quais hepatócitos maduros derivados de adulto são enxertados, são para terem
30 indicações de uma imunorresposta vigorosa, como indicada por células enxertadas necróticas, falta de crescimento interno vascular, e acúmulo de células CD45+.

Desse modo, o uso de células-tronco hepáticas substancialmente não imunogênicas para tratar disfunção hepática pode aliviar em maior parte, ou em sua totalidade, a necessidade por imunossuppressores comuns. Células-tronco hepáticas podem ser assim empregadas para repopular fígados doentes e/ou com disfunção em pacientes mamíferos e assim recuperar, em parte, a função hepática perdida.

No laboratório, essa capacidade pode ser determinada usando-se, por exemplo, camundongos fêmeas Balb/c (8 a 12 semanas de idade) e injetá-las com 1 mL/kg de teratogênio, tal como CCl_4 , duas vezes na semana por um total de 8 vezes, para induzir lesão no fígado. A química sanguínea de alanina transaminase pode ser conduzida nos camundongos na conclusão do período de tratamento para documentar a lesão no fígado. A elevação dos níveis de enzimas em relação aos camundongos de controle não tratados deve ser avaliada antes da inclusão dos animais no estudo. O transplante de células-tronco hepáticas humanas adultas nos camundongos recipientes pode ser efetuado por meio da injeção intra-esplênica.

Doses variáveis de células podem ser transplantadas com uma dose máxima preferível de 10^6 células/camundongo em cortes de 10 animais sob cada condição. Os animais podem ser monitorados em um curso de tempo para evidência da função hepática aperfeiçoada pelos seguintes critérios: alanina transaminase, albumina, proteína total, colesterol, e triglicerídeos. Quaisquer animais que mostrem sinais de sofrimento durante o estudo devem ser eutanizados, já que os estudos não devem ser conduzidos com morte como um ponto final.

Assim, grupos de cinco animais sob cada condição de transplante podem ser eutanizados 4 e 16 semanas pós-transplante. Os seguintes órgãos podem ser colhidos: fígado, rim, cérebro, coração, pulmões, baço. Espécimes de soro podem ser também obtidos para química do sangue de rotina e CBC. Similarmente, os órgãos podem ser processados quanto à análise imunoistoquímica, H&E, e RNA. Por conseguintes, os espécimes são coloridos com anticorpos para detectar os marcadores das células transplantadas (anticorpos de anti-beta galactosidase).

Alternativamente, análise FISH para detecção do cromossomo Y pode ser conduzida para identificar as células machos transplantadas. Secções em série são monitoradas quanto à expressão de proteínas hepáticas (no fígado) bem como coloração com DAPI para determinar a ploidia das células (para avaliar a possibilidade de fusão celular). Secções em série de baço, rim, cérebro, pulmão, coração evidenciariam células transplantadas fora do fígado.

Uma abordagem alternativa pode envolver o transplantes de células-tronco hepáticas humanas adultas em camundongo deficiente em ApoE. Em resumo, camundongos homozigóticos para mutação Apoetm 1 Unc mostram um aumento acentuado dos níveis de colesterol plasmático total que não são afetados por idade ou sexo. Estrias gordurosas na aorta proximal são encontradas aos 3 meses de idade. As lesões aumentam com a idade e progridem para lesões com menos células lipídicas, porém mais alongadas, típicas de um estado mais avançado de lesão pré-aterosclerótica. Níveis de triglicerídios moderadamente aumentados têm sido reportados em camundongos com esta mutação em um meio genético misto de C57BL x 129. Camundongos deficientes em APOE envelhecidos (> 17 meses) têm mostrado que desenvolvem lesões xantomatosas no cérebro consistindo na maior parte em fissuras do colesterol cristalino, glóbulos de lipídeo, e células espumosas. Xantomas menores foram vistos no plexo coróide e fórnice ventral. Estudos recentes indicam que camundongos deficientes em APOE têm respostas ao estresse alteradas, aprendizado espacial e memória comprometidos, e potenciação de longo prazo alterada e lesão sináptica.

Esses camundongos podem ser usados como hospedeiros para transplantar células-tronco hepáticas adultas humanas por meio de uma injeção intra-esplênica em camundongos homozigóticos, de 4 a 6 semanas de idades, B6.129p2-Apoetm 1 Unc. Os grupos recipientes podem incluir 5 animais em cada grupo: Grupo 1: controle – injeção de solução salina; sem células; Grupo 2 – 1×10^6 células-tronco humanas; Grupo 3 – 2×10^6 células-tronco humanas; Grupo 4 – 5×10^5 células-tronco humanas, Grupo 5 – 1×10^6 hepatócitos maduros humanos. Uma taxa de mortalidade de ~15% pode

ser esperada em experimentos de transplante com base em controles de históricos.

5 A análise de ponto final conduzida no curso de tempo seguinte ao transplante pode incluir ApoE (analisado no soro por análise Western blot, em pontos de tempo selecionados de 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas). A detecção de ApoE nesses camundongos previamente deficientes, seguinte ao transplante de células-trono hepáticas humanas adultas, suporta a noção que estas células podem ser usadas sem imunossupressão do recipiente para reconstituir a função hepática.

10 Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades específicas da mesma, será entendido que ela é capaz de posteriores modificações e este pedido tem o objetivo de cobrir quaisquer variações, usos, ou alterações da invenção a seguir. Em geral, os princípios da invenção e inclusive tais divergências da presente exposição conforme contidas
15 dentro da prática conhecida ou usual da técnica à qual a invenção pertence e conforme podem ser aplicadas às características essenciais estabelecidas acima e como a seguir nos escopo das reivindicações apensas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para repopular o compartimento do fígado de um mamífero, que compreendê:

- 5
- (a) proporcionar progenitores hepáticos não imunogênicos isolados; e
 - (b) introduzir os ditos progenitores hepáticos isolados em um compartimento do fígado de um mamífero, com a condição que tal introdução seja efetuada em ausência de quantidades imunossupressoras de um imunossupressor.

10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que os progenitores hepáticos isolados são introduzidos por implantação ou injeção.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que uma quantidade subimunossupressora de um imunossupressor é administrada ao mamífero.

15 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que a quantidade subimunossupressora é menor que cerca de 10 mg de um imunossupressor por quilograma do mamífero.

20 5. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que a quantidade subimunossupressora é menor que cerca de 5 mg de um imunossupressor por quilograma do mamífero.

6. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que a quantidade subimunossupressora é menor que cerca de 3 mg de um imunossupressor por quilograma do mamífero.

25 7. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que a quantidade subimunossupressora é menor que cerca de 0,1 mg de um imunossupressor por quilograma do mamífero.

8. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que o imunossupressor é selecionado do grupo que consiste em prednisona, azatioprina, ciclosporina, e micofenolato.

30 9. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o mamífero é um não-humano.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o mamífe-

ro é um ser humano.

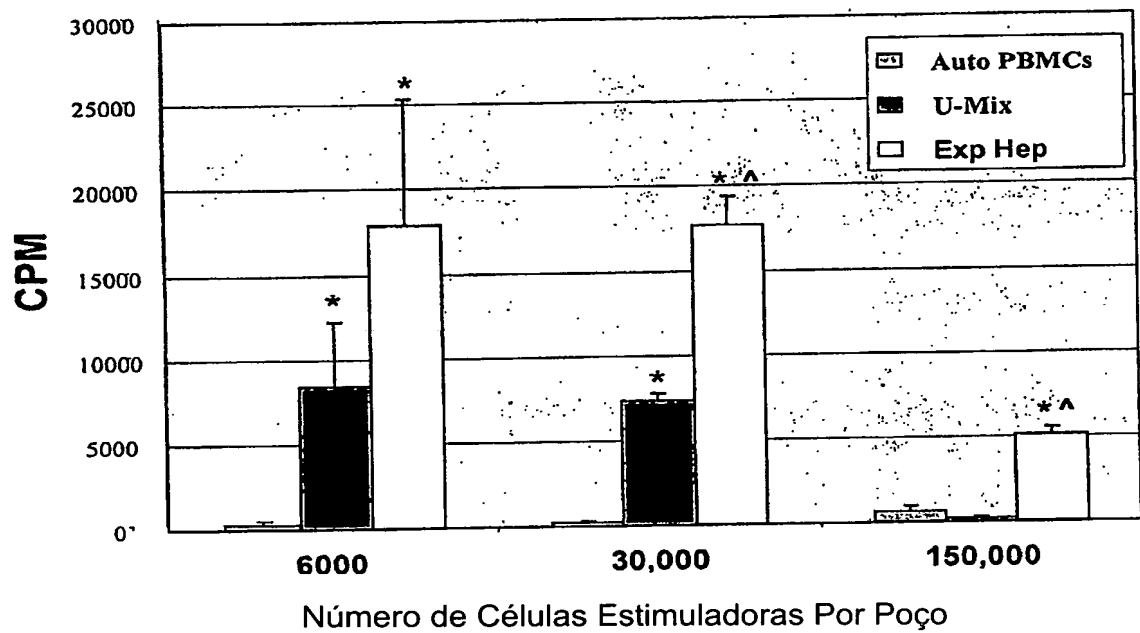
11. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que o humano é um recipiente alogênico.

5 12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que o recipiente alogênico não está nem imunocomprometido, nem imunoprivilegiado.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que os progenitores hepáticos não imunogênicos isolados são ainda caracterizados como não imunossuppressores.

10 14. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que os progenitores hepáticos não imunogênicos são positivos para expressão de EpCAM.

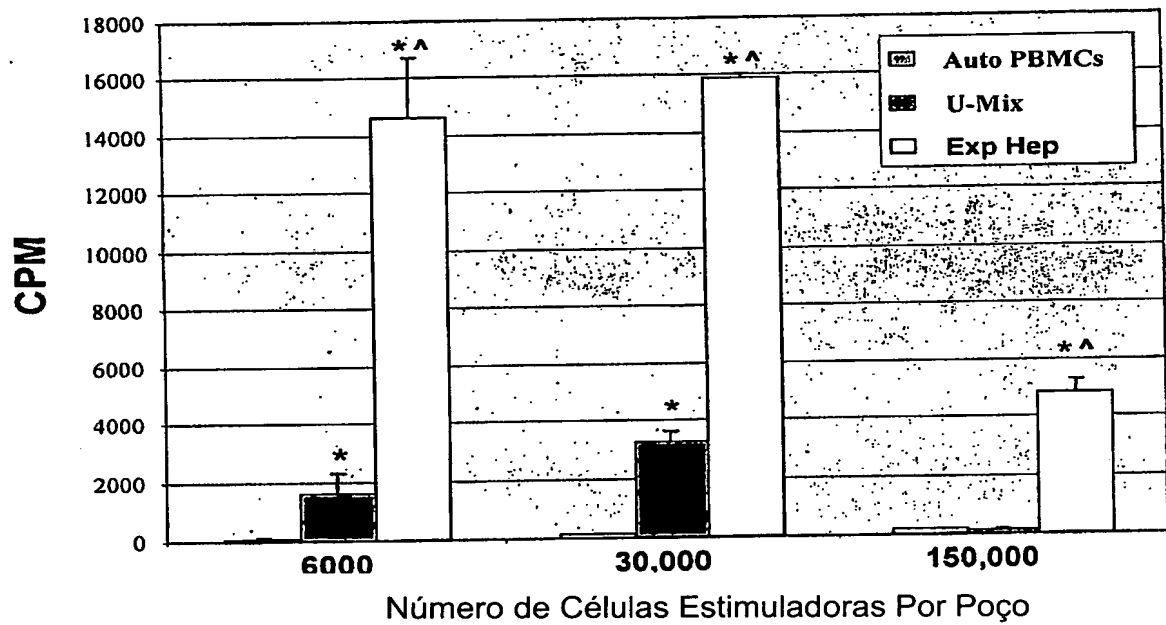
FIG. 1



*Significantemente diferente de Auto pBMC ($p < 0,05$)

^Significantemente diferentes de U-Mix ($p < 0,05$).

FIG. 2



*Significantemente diferente de Auto pBMC ($p < 0,05$)

^Significantemente diferentes de U-Mix ($p < 0,05$).

FIG. 3a

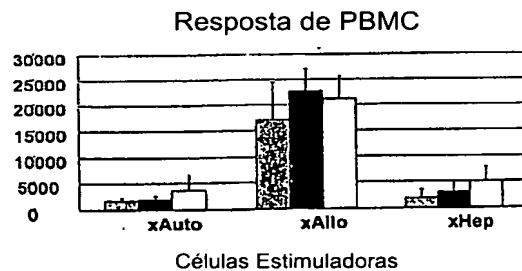


FIG. 3b

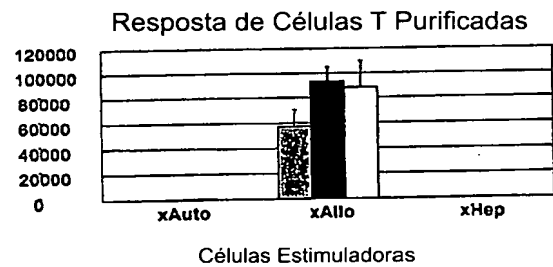
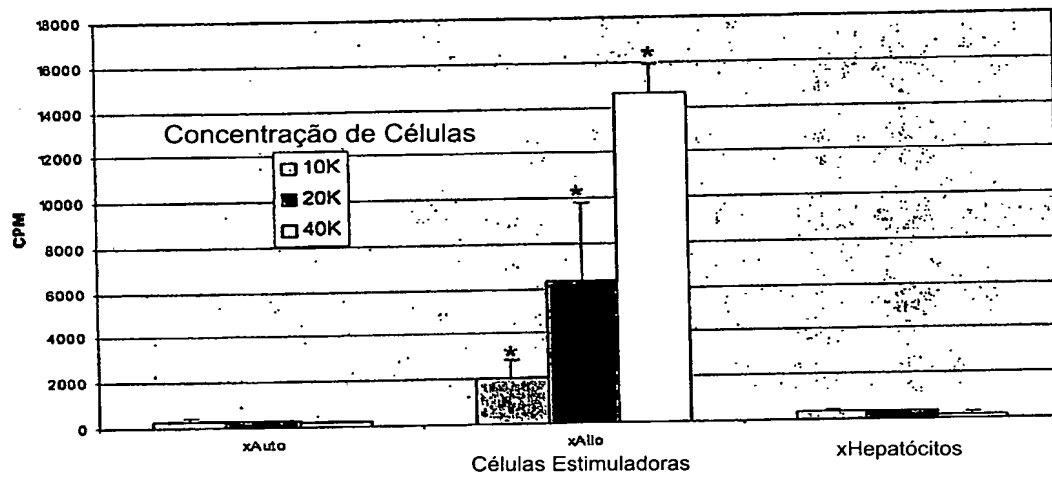
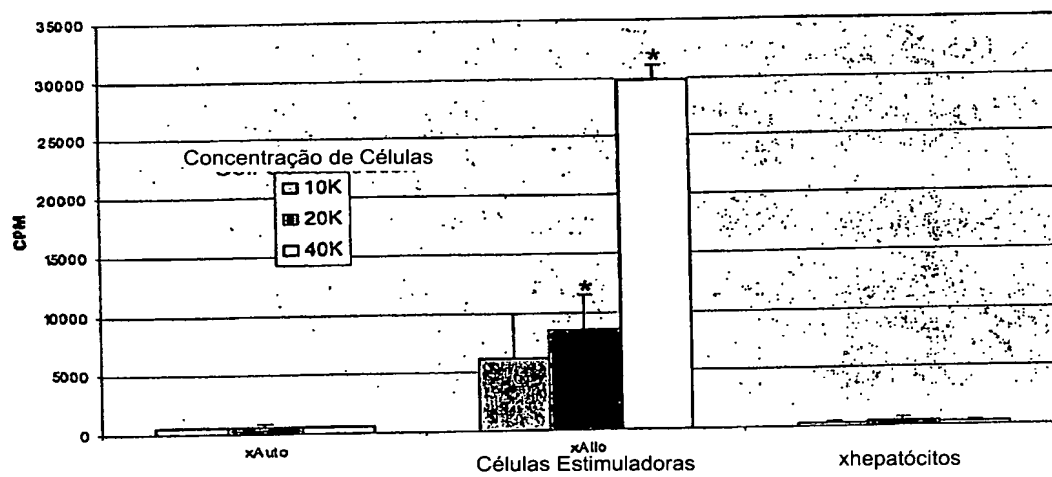


FIG. 4



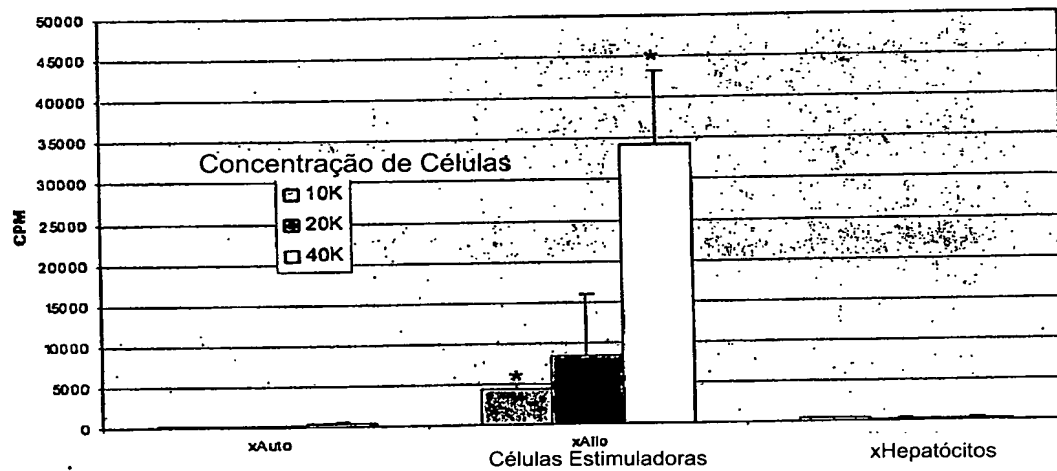
*Significantemente diferente de xAuto respectivo (PM>750, St>3, p<0,05)

FIG. 5



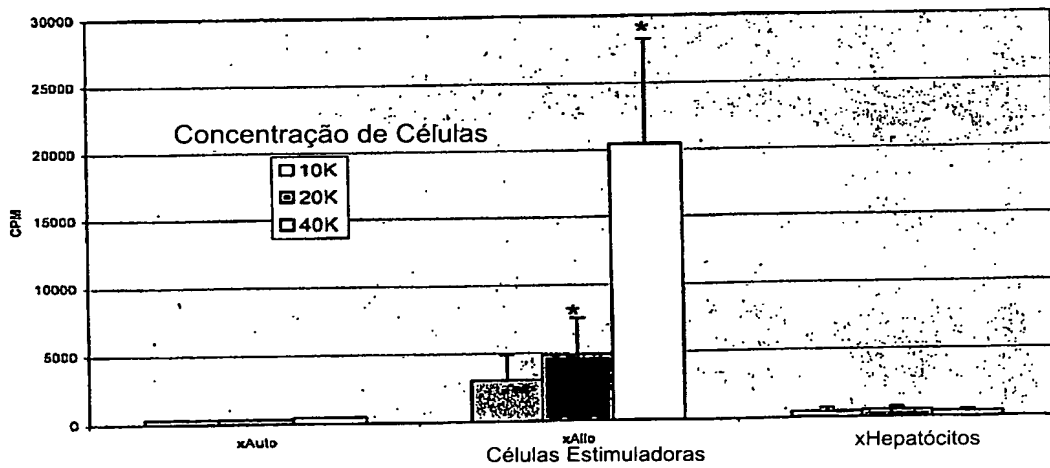
*Significantemente diferente de xAuto respectivo (PM>750, St>3, p<0,05)

FIG. 6



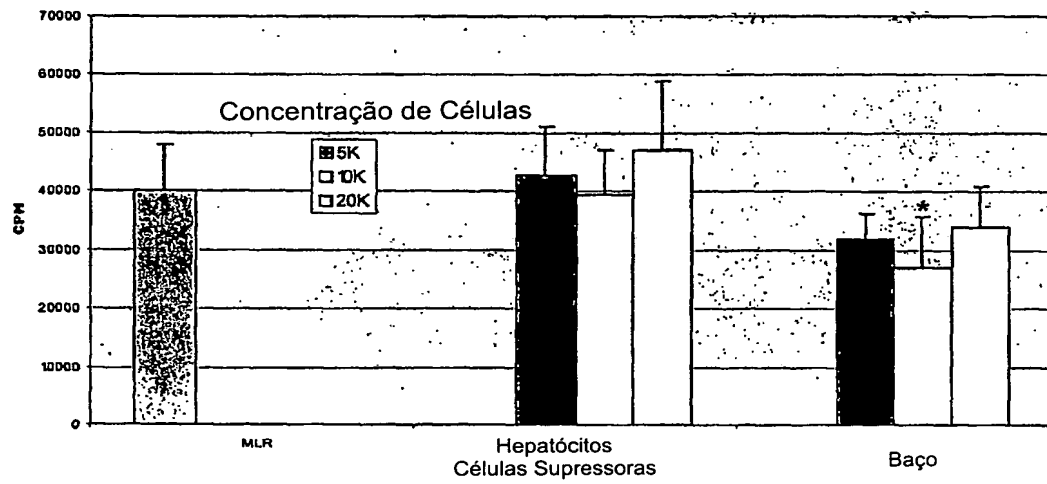
*Significantemente diferente de xAuto respectivo (PM>750, St>3, p<0,05)

FIG. 7



*Significantemente diferente de xAuto respectivo (PM>750, St>3, p<0,05)

FIG. 8



*Significantemente diferentes de MLR ($p < 0,05$)

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA USAR PROGENITORES HEPÁTICOS PARA TRATAR DISFUNÇÃO HEPÁTICA".

- 5 A presente invenção refere-se a métodos para usar progenitores hepáticos no tratamento de disfunção hepática. Mais particularmente, métodos para usar células progenitoras hepáticas, inclusive células-tronco, no tratamento de disfunção hepática em ausência de quantidades imunossupressoras de um imunossupressor.