



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

(21) **PI 0713965-9 A2**

(22) Data de Depósito: 28/06/2007
(43) Data da Publicação: 27/11/2012
(RPI 2186)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/071
C12N 5/073

(54) Título: DIFERENCIAÇÃO DE TRONCO DE MATRIZ DE CORDÃO UMBILICAL EM CÉLULAS DA LINHAGEM HEPATÓCITO

(30) Prioridade Unionista: 28/06/2006 US 60/817.251

(73) Titular(es): The University Of Kansas

(72) Inventor(es): Kathy E. Mitchell, Steven M. Hoynowski

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DAIEL-SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2007015219 de 28/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/002662 de 03/01/2008

(57) Resumo: DIFERENCIAÇÃO DE TRONCO DE MATRIZ DE CORDÃO UMBILICAL EM CÉLULAS DA LINHAGEM HEPATÓCITO. A invenção refere-se a métodos para diferenciação de células de matriz do cordão umbilical em células do tipo hepatócito e composições e métodos para usar tais células do tipo hepatócito.

“DIFERENCIAÇÃO DE TRONCO DE MATRIZ DE CORDÃO UMBILICAL EM CÉLULAS DA LINHAGEM HEPATÓCITO”

Referencia Cruzada a Pedido Relacionado

5 Esta aplicação reivindica o benefício sob 35 U.S.C. § 119(e) de Pedido Provisional de Patente U.S. No. 60/817,251, depositado em 28 de junho de 2006, onde este pedido provisional é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Antecedente da Invenção

Campo da Invenção

10 A invenção se refere ao isolamento e uso de tronco de qualquer animal com um cordão umbilical, incluindo humanos, para diferenciação em células da linhagem hepatócitos. Mais particularmente a invenção se refere aos métodos para diferenciação de células matriz de cordão umbilical em células como hepatócitos. A invenção é também útil para fornecer um fornecimento disponível prontamente de células como hepatócitos para uso em uma variedade de colocações incluindo análise de droga, interação de droga-droga, transplantação e
15 tratamento de doença.

Descrição da Técnica Relacionada

O tratamento de doença do fígado através de transplantação de órgão tem mostra eficácia e progresso. Entretanto, o problema com regimes de transplantação foi centrado em disponibilidade e conveniência de órgão. A falta de doadores de órgão adequados tem
20 aumentado e a necessidade para terapias alternadas existe. A célula com base em terapias tem mostrado algumas promessas no campo de medicina regenerativo, porém falta a eficácia de transplantação. Mais pesquisa necessária a ser realizada nesta área as terapias com base em célula desenvolvida completamente para o tratamento de doença do fígado (Allen JW e Bhatia SN. Tissue Engineering. 2002;8(5):725-737; H. C. Fiegel CL, e outros J Cell Mol Med.
25 2006;10(3):577-587).

A indução e inibição de Citocromo P450s são um mecanismo fundamental para o metabolismo oxidativo de drogas e outro xenobióticos. Os modelos de hepáticos para estudar metabolismo de droga em humanos são de interesse clínico. As culturas primárias de hepatócitos não expressam atividades metabolizadora de droga durante um período de tempo
30 porém perdem esta capacidade em a longo prazo de cultura. Outros obstáculos para empregar culturas hepatócitos primárias incluem: razões éticas, disponibilidade de tecido de doadores, curto período de vida usável de culturas primárias (Donato M, e outros Drug Metab Dispos. 1995;23(5):553-558; Li AP, e outros Chemico-Biological interactions Proceedings do First Symposium do Hepatocyte Users Group de North America. 1997;107(1-2):5-16). Portanto, um
35 modelo adequado para estudar interações de droga e citotoxicidade pode provar a ser vantajoso em análise de drogas novas, ou produtos terapêuticos novos.

O fígado é um sítio principal de metabolismo de muitos compostos endógenos e

xenobióticos desde hepatócitos (que compreende 80% das células de fígado) contêm quantidades amplas de retículo endoplásmico liso, onde muitas enzimas metabolizadora residem. Estas enzimas metabolizadora são principalmente envolvidas em dois tipos principais de processos: catalisador de reações de redox por monooxigenases P450 (fase I) e conjugação com moléculas endógenas (fase II). Muito esforço em descoberta de droga e desenvolvimento tem sido focalizado em definir o perfil metabólico e a farmacocinética de novos compostos. Uma porção principal de desenvolvimento pré-clínico envolve caracterizando a disposição e eliminação de droga afetando enzimas do fígado.

Mais de trinta drogas foram associadas com severo, freqüentemente fatal, toxicidade de droga que foi realizada somente após marketing. Uma limitação de tecnologias atuais para teste inicial de toxicidade de droga é a falta de diversidade genética dos sistemas de teste. Desse modo, permanece uma necessidade na técnica para um fornecimento diverso prontamente disponível e geneticamente de linhagens de células como hepatócitos para teste de toxicidade de droga inicial. A presente invenção fornece isto e outras vantagens.

Breve Sumario da Invenção

Um aspecto da invenção fornece um método para diferenciação de células matriz de cordão umbilical em células como hepatócitos, compreendendo contatar células matriz de cordão umbilical com Média de Pré-indução; contatando células matriz de cordão umbilical com Média de Diferenciação; e contatando células matriz de cordão umbilical com Média de Maturação, durante um tempo suficiente para diferenciar as células matriz de cordão umbilical em células como hepatócitos.

Outro aspecto da invenção fornece um método para avaliar a toxicidade de um composto *in vitro*, compreendendo contatar uma célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido composto; e medindo a viabilidade da referida célula como hepatócitos, onde uma diminuição em viabilidade na presença do referido composto comparado que na ausência do referido composto indicado que o referido composto é tóxico *in vivo*.

Um aspecto adicional da invenção fornece um método para avaliar a atividade de um composto *in vitro*, compreendendo contatar uma célula como hepatócitos ativo metabolicamente diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido composto; e medindo a atividade metabólica da referida célula como hepatócitos, onde uma diminuição ou aumenta em atividade metabólica na presença do referido composto comparado na ausência do referido composto indica que o referido composto tem atividade *in vivo*.

Ainda um aspecto adicional da invenção fornece um método para avaliar a atividade de um composto *in vitro*, compreendendo contatar uma primeira célula como hepatócitos ativo metabolicamente diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido composto para gerar um sobrenadante de célula; e contatando uma segunda

célula como heptócitos ativo metabolicamente diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido sobrenadante; e medindo a atividade metabólica da segunda referida célula como hepatócitos, onde uma diminuição ou aumento em atividade metabólica na presença do referido sobrenadante comparado na ausência do referido sobrenadante indica que o referido composto tem atividade *in vivo*.

Um aspecto adicional da invenção é um método para avaliar a toxicidade de um composto *in vitro*, compreendendo contatar uma primeira célula como heptócitos ativo metabolicamente diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido composto para gerar um sobrenadante de célula; contatar uma segunda célula como heptócitos ativo metabolicamente diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido sobrenadante de célula; e medindo a viabilidade da segunda referida célula como hepatócitos, onde uma diminuição em viabilidade na presença do referido sobrenadante comparado na ausência do referido sobrenadante indica que o referido composto é tóxico *in vivo*.

Outro aspecto da invenção fornece um método para avaliar a atividade de um composto *in vitro*, compreendendo contatar uma célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido composto; e medindo a expressão de um gene P450 citocromo na célula como hepatócitos, onde um aumento ou diminui em expressão do gene P450 citocromo na presença do referido composto comparado na ausência do referido composto indica que o referido composto tem atividade *in vivo*.

Um aspecto adicional da invenção fornece um método para avaliar a atividade de um composto *in vitro*, compreendendo contatar uma primeira célula como heptócitos ativo metabolicamente diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido composto para gerar um sobrenadante de célula; e contatando uma segunda célula como heptócitos ativo metabolicamente diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o referido sobrenadante; e medindo expressão de um gene P450 citocromo na segunda referida célula como hepatócitos, onde um aumento ou diminuído em expressão do gene P450 citocromo na presença do referido sobrenadante comparado na ausência do referido sobrenadante indica que o referido composto tem atividade *in vivo*. Em uma modalidade, a expressão do gene P450 citocromo é medida empregando a reação em cadeia de polimerase. Em uma modalidade adicional a expressão do gene P450 citocromo é medida medindo-se atividade de enzima.

Outro aspecto da invenção fornece um método para determinar interações de droga, compreendendo contatar uma primeira célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com um primeiro composto; contatando uma segunda célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo

com a invenção com um segundo composto; contatando uma terceira célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o primeiro e o segundo composto; medindo a atividade metabólica da primeira, segunda e terceira célula como hepatócitos, onde uma diminuição ou aumento em atividade metabólica na terceira célula como hepatócitos como comparado a primeira ou a segunda célula como hepatócitos ou ambos indicam uma interação de droga.

Um aspecto adicional da invenção fornece um método para determinar interações de droga, compreendendo: contatando uma primeira célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com um primeiro composto; contatando uma segunda célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com um segundo composto; contatando uma terceira célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o primeiro e o segundo combinação; medindo a viabilidade da primeira, segunda e terceira célula como hepatócitos, onde uma diminuição ou aumento em viabilidade na terceira célula como hepatócitos como comparado a primeira ou a segunda célula como hepatócitos ou ambos indicam uma interação de droga.

Ainda um aspecto adicional da invenção fornece um método para determinar interações de droga, compreendendo: contatando uma primeira célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com um primeiro composto; contatando uma segunda célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com um segundo composto; contatando uma terceira célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção com o primeiro e o segundo composto; medindo a expressão de um gene P450 citocromo na primeira, segunda e terceira célula como hepatócitos, onde uma diminuição ou aumenta na expressão de um gene P450 citocromo na terceira célula como hepatócitos como comparado a primeira ou a segunda célula como hepatócitos ou ambos indicam uma interação de droga.

Outro aspecto da invenção fornece um método para melhorar ou restaurando função hepática em um indivíduo em necessidade deste compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade destes uma população de célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção.

Um aspecto adicional da invenção fornece um método para tratar cirrose do fígado em um indivíduo em necessidade destes compreendendo administrar ao indivíduo uma população de célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção.

Ainda outro aspecto da invenção fornece um método para tratar dano hepático compreendendo administrar a um indivíduo que tem prolongado dano hepático uma população

de célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção.

Ainda outro aspecto da invenção fornece um método para tratar hepatite compreendendo administrar a um indivíduo que prolongado dano hepático uma população de célula como hepatócitos diferenciado de células matriz de cordão umbilical de acordo com a invenção.

Outro aspecto da invenção fornece um painel de células como hepatócitos derivado de matriz de cordão umbilical compreendendo pelo menos duas células como hepatócitos derivado de matriz de cordão umbilical onde pelo menos duas células hepatócitos derivado de matriz de cordão umbilical são derivadas dos diferentes indivíduos, e onde as células como hepatócitos derivado de matriz de cordão umbilical são separados um do outro. Desse modo, as células são fornecidas em distinto, locais separados no painel. Em uma modalidade, os indivíduos diferentes são geneticamente diferentes. Em outra modalidade, os indivíduos diferentes são de sexos diferentes. Desse modo um painel pode ser compreendido de células derivadas de cordões umbilicais de indivíduos masculinos e fêmeos. Em uma modalidade, pelo menos duas células como hepatócitos derivados de matriz de cordão umbilical são separados um do outro em uma placa de multi-cavidades. Em uma modalidade adicional, o painel compreende três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, ou mais diferentes células como hepatócitos derivados de matriz de cordão umbilical. A este respeito, os painéis da invenção pode compreender entre 5 e 100 ou mais diferentes células como hepatócitos derivados de matriz de cordão umbilical, todos fornecidos em locais separados, tal como em uma placa de cultura de tecido de multi-cavidades.

Um aspecto adicional da invenção fornece um kit de análise de droga compreendendo um painel da invenção e pelo menos um reagente para medir pelo menos uma atividade de enzima P450 citocromo ou expressão de gene. Em uma modalidade, o kit compreende pelo menos um meio para cultivar as células como hepatócitos derivados de matriz de cordão umbilical.

Outro aspecto da invenção fornece um método para diferenciação de células matriz de cordão umbilical em célula como hepatócitos, compreendendo: células matriz de cordão umbilical semeando em uma placa de cultura de tecido revestido de 0,1% de gelatina; contatando células matriz de cordão umbilical com uma Média de Pré-indução compreendendo 10-30 ng/ml de fator de crescimento da epiderme humano recombinante e 5-15 de ng/ml fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante; contatando células matriz de cordão umbilical com uma Média de Diferenciação compreendendo 10-30 ng/ml de fator de crescimento de hepatócitos humano recombinante, 5-15 ng/ml de rhbFGF e 0,5-1,0 g/L de nicotinamida; e contatando células matriz de cordão umbilical com uma Média de Maturação compreendendo 10-30 ng/ml Oncostatina M Humano, 0,5-1,5 umol/L dexametasona e 30-70

mg/ml ITS+pré-mistura; durante um tempo suficiente para diferenciar as células matriz de cordão umbilical em célula como hepatócitos.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção geralmente se refere aos métodos para diferenciação de células-tronco de matriz de cordão umbilical em células da linhagem de hepatócitos e composições compreendendo e métodos de empregar as células.

Os estudos múltiplos têm demonstrado a utilidade de tecidos extra-embriônicos seja estes componentes podem diferenciar em célula como hepatócitos *in vitro* (Lee OK, e outros, Blood. 2004;103(5):1669-1675; Schwartz RE, e outros, J Clin Invest. 2002;109(10):1291-1302; Hong SH, e outros, Biochemical e Biophysical Research Communications. 2005;330(4):1153-1161; Sato Y, e outros, Blood. 2005;106(2):756-763). Os protocolos de diferenciação hepáticos realizam diferenciação com uma monocamada de células progenitora que são tratadas com vários fatores de crescimento para induzir diferenciação (Ong S-Y, Dai H, Leong KW. Tissue Engineering. 2006;12(12):3477-3485; Lee OK, e outros, Blood. 2004;103(5):1669-1675; Schwartz RE, e outros, J Clin Invest. 2002;109(10):1291-1302; Hong SH, e outros, Biochemical e Biophysical Research Communications. 2005;330(4):1153-1161; Yamada T, e outros, Stem Cells. 2002;20(2):146-154; Koenig S, e outros, Journal de Hepatology. 2006;44(6):1115-1124; Chien C-C, e outros, Stem Cells. 2006;24(7):1759-1768; Forte G, e outros, Stem Cells. 2006;24(1):23-33). Tem sido mostrado que viabilidade prolonga hepatócitos primário em condições de cultura em longo prazo, mantêm funções específicas hepática, e tem semelhanças estruturais ao tecido do fígado nativo quando cultivado em um mais sustentador de sistema tridimensional (3D). Em sistema de cultura bidimensional (2D), hepatócitos perdem sua polaridade, que é importante para tráfego de metabólitos e canalicular de desenvolvimento posterior ou estruturas senoidais (Hamamoto R, e outros, J Biochem (Tóquio). 1998;124(5):972-979; Landry J, e outros, J Cell Biol. 1985;101(3):914-923; Abu-Absi SF, Friend JR, e outros, Experimental Cell Research. 2002;274(1):56-67). Além disso, ECM (matriz extra celular) desempenha um papel fisiológico influenciando-se o micro-ambiente de hepatócitos onde materiais organismo-compatíveis combinados com matrizes extracelulares são capazes de célula promotora de diferenciação (HENG AC, e outros, Journal de Gastroenterology e Hepatology. 2005;20(7):975-987).

Quando considerando que uma grande quantidade de células funcionais seria requerida para descoberta de droga e estudo de toxicidade, um escalável, modelo econômico seria requerido. A presente invenção fornece células da linhagem de hepatócitos diferenciados de células matriz derivadas de cordão umbilical humano que podem ser empregadas em uma variedade de colocações, incluindo indução de citocromo P450s relevante para teste de droga. A presente invenção fornece uma fonte adicional para terapias de droga com base em célula, estudo de toxicidade, e uma fonte possível de células para transplantação em certas patologias.

Isolamento e Cultura de Células (UCM) de Matriz Cordão Umbilical.

As células-tronco são capazes de auto-regeneração e podem se tornar progenitores prematura de linhagem que são dedicados a diferenciação e expansão em uma linhagem específica.

5 A fertilização seguinte de um ovo por um espermatozoide, uma única célula é criada que tem o potencial para formar um organismo multi-celular diferenciado inteiro incluindo todo tipo de célula diferenciado e tecido encontrado no corpo. Esta célula fertilizada inicial, com potencial total é caracterizada como totipotencial. Tais células totipotencial têm a capacidade para diferenciar em membranas de extra-embriônica e tecidos, tecidos e órgãos embrionários. Após 10 vários ciclos (5 a 7 na maioria das espécies) de divisão de célula, estas células totipotencial inicia a forma especializada uma esfera oca de células, o blastocisto. A massa de célula interna do blastocisto é composta de células-tronco descritas como totipotencial porque eles podem dar origem a muitos tipos de células que constituirão a maioria dos tecidos de um organismo (não incluindo alguns tecidos placentários etc.). As células-tronco multipotencial são mais 15 especializadas dando origem a uma sucessão de células funcionais maduras. As células-tronco multipotencial podem dar origem a hematopoética, mesenquimal ou linhagem de célula neuroectodermal. Desse modo, a hierarquia de células-tronco é: células-tronco totipotencial → células-tronco pluripotencial → células-tronco multipotencial → linhagem de células comprometidas.

20 As células-tronco pluripotencial verdadeiro devem: (i) ser capaz de proliferação indefinida *in vitro* em um estado de não diferenciado; (ii) manter um cariótipo normal através de cultura prolongada; e (iii) manter o potencial para diferenciar os derivados de todas as três camadas de germe embrionárias (endoderma, mesoderma, e ectoderma) até mesmo após de cultura prolongada. Forte evidência destas propriedades exigidas tem sido publicada somente 25 para células-tronco embrionárias de roedor (células ES) e células de germe embrionárias (células EG) incluindo camundongo (Evans & Kaufman, Nature 292: 154-156, 1981; Martin, Proc Natl Acad Sci USA 78: 7634-7638, 1981) hamster (Doetschman e outros, Dev Biol 127: 224-227, 1988), e rato (Iannaccone e outros, Dev Biol 163: 288-292, 1994), e menos conclusivamente para células ES de coelho (Giles e outros, Mol Reprod Dev 36: 130-138, 1993; 30 Graves & Moreadith, Mol Reprod Dev 36: 424-433, 1993). Entretanto, somente linhagem de célula-tronco estabelecida do rato (Iannaccone, e outros, 1994, *supra*) e o camundongo (Bradley, e outros, Nature 309: 255-256, 1984) tem sido relatado para participar em desenvolvimento normal em quimeras.

35 As células pluripotencial humanas têm sido desenvolvidas de duas fontes com métodos desenvolvidos previamente no trabalho com animais modelos. As células-tronco pluripotencial têm sido diretamente isoladas da massa de célula interna de embriões humanos (células ES) na fase de blastocisto obtida de programas de fertilização *in vitro*. As células-tronco

pluripotencial (células EG) têm também sido isoladas de gravidezes terminadas.

A presente invenção fornece células-tronco (UCM) de matriz de cordão umbilical que podem ser empregadas para diferenciar em células da linhagem de hepatócitos. UCM pode ser isolada empregando técnicas conhecida na técnica, tal como descrito na Patente US No. 5,919,702 e Publicação de Pedido de Patente No. 20040136967. As células-tronco (UCM) de matriz de cordão umbilical também são conhecidas como as Células de Wharton Jelly. Tais células podem encontradas em qualquer animal com um cordão umbilical, incluindo amniotas, animais placentários, humanos, e outros. Tais células matriz tipicamente incluem células extravascular, tecido mucoso-conetivo (por exemplo, Wharton jelly) porém tipicamente não inclui células sangüíneas de corda ou células relatadas. Quaisquer destas células podem fornecer uma fonte para células diferenciadas e podem fornecer um ambiente de cevador importante para o estabelecimento ou manutenção de culturas de célula-tronco. As células-tronco UCM derivadas de tecido de cordão umbilical pode ser isoladas, purificadas e ampliadas culturalmente.

As células UCM são isoladas de um espécime de tecido não sanguínea de cordão umbilical contendo células UCM. As células UCM são então adicionadas a um médio que contém fatores que estimula crescimento de célula UCM sem diferenciação e permitem, quando cultivado, para a aderência seletiva das células-tronco UCM para uma superfície de substrato. A mistura de espécime-médio é cultivada e a matéria não aderente é removida da superfície de substrato. O uso de sangue de cordão umbilical também é discutido, por exemplo, em Issaragrisi e outros, (1995) N. Engl. J. Med. 332:367-369.

As células-tronco UCM da invenção são isoladas de fontes de cordão umbilical, preferivelmente da Wharton jelly. Wharton jelly é uma substância gelatinosa encontrada no cordão umbilical que tem sido geralmente considerado como um tecido conjuntivo mucoso solto, e tem sido freqüentemente descrito como consistindo em fibroblastos, fibras de colágeno e uma substância de superfície amorfa composta principalmente de ácido hialurônico (Takechi e outros, 1993, Placenta 14:235-45). Vários estudos foram realizados na composição e organização de Wharton jelly (Gill e Jarjoura, 1993, J. Rep. Med. 38:611-614; Meyer e outros, 1983, Biochim. Biophys. Acta 755:376-387). Um relatório descreve o isolamento e cultura *in vitro* de "fibroblasto-como" células de Wharton jelly (McElreavey e outros, 1991, Biochem. Soc. Trans. 636^a Meeting Dublin 19:29S).

O cordão umbilical geralmente é obtido imediatamente em terminação de qualquer uma gravidez de termo total ou pré-termo. Por exemplo, porém não a título de limitação, o cordão umbilical, ou uma seção destes, pode ser transportado do local de nascimento para o laboratório em um recipiente estéril tal como um frasco, placa de cultura ou béquer, contendo um médio, tal como, por exemplo, Meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). O cordão umbilical é preferivelmente mantido e manipulado sob condições estéreis antes de e durante

coleta do Wharton jelly, e pode adicionalmente ser superfície esterilizada através do tratamento de superfície curta do cordão com, por exemplo, uma solução de etanol 70%, seguida por um enxágüe com água estéril, destilada. O cordão umbilical pode ser armazenado brevemente para até cerca de três horas a cerca de 3-5°C, porém não congelado, antes de extração da Wharton jelly.

Wharton jelly é coletado do cordão umbilical sob condições estéreis por um método apropriado conhecido na técnica. Por exemplo, o cordão é transversalmente cortado com um bisturi, por exemplo, em cerca de uma polegada de seções, e cada seção é transferida a um recipiente estéril contendo volume suficiente de salina tamponada por fosfato (PBS) contendo CaCl_2 (0,1 g/l) e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l) para permitir sangue de superfície para ser removida da seção através da agitação suave. A seção é então removida a uma superfície estéril onde a camada exterior da seção é cortada aberta ao longo do eixo longitudinal do cordão. Os vasos sanguíneos do cordão umbilical (duas veias e uma artéria) são dissecados fora, por exemplo, com fórceps estéreis e tesouras dissecando, e o cordão umbilical é coletado e colocado em um recipiente estéril, tal como um placa de Petri de 100 mm TC tratada. O cordão umbilical pode então ser cortado em seções menores, tal como 2-3 mm³ para cultura. Outro método confia em dispersão enzimática do Wharton jelly com colagenase e isolamento de células através de centrifugação seguido por revestimento.

Wharton jelly é incubado *in vitro* em médio de cultura sob condições apropriadas para permitir a proliferação de qualquer célula UCM presente aqui. Qualquer tipo apropriado de médio de cultura pode ser empregado para isolar as células UCM da invenção, tal como, porém não limitado a, DMEM, McCoys 5A médio (Gibco), médio basal de Águia, médio de CMRL, Glasgow médio essencial mínimo, o médio de F-12 de Ham, médio Dulbecco modificado Iscove, médio de L-15 de Liebovitz, e RPMI 1640, entre outros. O médio de cultura pode ser suplementado com um ou mais componentes incluindo, por exemplo, soro bovino fetal (FBS), soro eqüino (ES), soro humano (HS), e um ou mais antimicóticos e/ou antibióticos para controlar contaminação microbiana, tal como, por exemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina, e nistatina, ou somente ou em combinação, entre outros.

Os métodos para a seleção da cultura mais apropriada média, preparação média, e técnicas de cultura de célula são bem conhecidas na técnica e são descritas em uma variedade de fontes, incluindo Doyle e outros, (eds.), 1995, célula e Cultura de Tecido: Laboratory Procedures, John Wiley & Sons, Chichester; e Ho e Wang (eds.), 1991, Animal Cell Bioreactors, Butterworth-Heinemann, Boston são incorporados aqui por referência.

O fracionamento envolve células UCM cultivado a fonte de células (Wharton jelly) em duas frações, um dos quais são enriquecidas para células-tronco e consequentemente expondo as células-tronco à condições adequadas para proliferação de célula. A célula enriquecida isola desse modo criada compreende células-tronco.

Após cultivar Wharton jelly durante um período suficiente de tempo, por exemplo, cerca de 10-12 dias, UCM derivado de células-tronco presente no tecido proveniente de vegetais ou animais tenderá ter desenvolvido do tecido, ou como um resultado de migração a partir deste ou divisão de célula ou ambos. Este UCM derivado de células-tronco pode então ser removida a um recipiente de cultura separado contendo médio fresco do mesmo ou um tipo diferente como que emprega inicialmente, onde a população de UCM derivado de células-tronco pode ser expandida mitoticamente.

Alternativamente, os tipos de célula diferente presente em Wharton jelly pode ser fracionada em sub-populações do qual UCM derivado de células-tronco pode ser isolado. Isto pode ser realizado empregando técnicas padrões através de célula de separação incluindo, porém não limitado a, tratamento enzimático para dissociar Wharton jelly em suas células de componente, seguido por clonagem e seleção de tipos de célula específica (por exemplo, miofibroblastos, células-tronco, etc.), empregando ou marcadores de morfológicos ou bioquímicos, destruição seletiva de células indesejáveis (seleção negativa), separação com base em capacidade de aglutinação de célula de diferencial na população misturada como, por exemplo, com aglutinina de soja, procedimentos de congelamento-descongelamento, propriedades de aderência diferencial das células na população misturada, filtração, zona de centrifugação e convencional, elutriação centrífugo (centrifugação contra-corrente), unidade de separação de gravidade, distribuição contra-corrente, clacificação de célula ativada eletroforética, e fluorescência (FACS). Para uma revisão de seleção clonal e técnicas de separação de célula, veja Freshney, 1994, Culture de Animal Cells; A Manual de Basic Techniques, 3d Ed., Wiley-Liss, Inc., New York.

Em uma modalidade por cultivar UCM derivado de células-tronco, Wharton jelly é cortada em seções, tal como seção de cerca de 1-5 mm³, e colocado em uma placa apropriada, tal como uma placa de Petri tratado de TC contendo lâmina de vidro no fundo da placa de Petri. As seções de tecido são então revestidas com outra lâmina de vidro e cultivadas em um médio completo, tal como, por exemplo, Dulbecco MEM mais 20% de FBS; ou RPMI 1640 que contendo 10% de FBS, 5% de ES e compostos antimicrobiais, incluindo penicilina G (100 ug/ml), sulfato de estreptomicina (100 ug/ml), anfotericina (250 ug/ml), e gentamicina (10 ug/ml), pH 7,4-7,6. O tecido é preferivelmente incubado a 37-39°C e 5% de CO₂ durante 10-12 dias. Entretanto, como seria reconhecida por alguém qualificado, a temperatura, níveis de O₂ e CO₂ podem ser ajustados. Por exemplo, a temperatura pode variar de 32°-40°C e o nível de CO₂ podem variar em certas modalidades de 2%-7%. O número de dias em cultura pode também ser ajustado de cerca de 5, 6, 7, 8, ou 9 a cerca de 13, 14, 15, 20, 25 ou mais dias. Um exemplo adicional de uma média definidas é DMEM, 40% MCDB201, 1X insulina-transferrina-selênio (SEU), 1X ácido-BSA linoléico, dexametasona 10⁻⁸ M, M ácido ascórbico 2-fosfato 10⁻⁴, penicilina 100 U, estreptomicina 1000 U, 2% de FBS, 10 ng/mL de EGF, 10 ng/mL de PDGF-BB.

O médio é alterado como necessário aspirando-se cuidadosamente o médio da placa, por exemplo, com uma pipetara, e reabastecendo com médio fresco. A Incubação é continua como acima até um número suficiente ou densidade de células acumulada na placa e nas superfícies das lâminas. Por exemplo, a cultura obtém cerca de 70 por cento de confluência porém não para o ponto de confluência completa. As seções de tecido proveniente de animais ou vegetais originais podem ser removidas e as células restantes são tripsinados empregando técnicas padrões. Após tripsinação, as células são coletadas, removidas a médio fresco e incubada como acima. O médio é alterado pelo menos uma vez a 24hr pós-tripsina para remover qualquer célula de flutuante. As células restantes em cultura são consideradas a ser UCM derivado de células-tronco.

Em outra modalidade, as células UCM são isoladas e cultivadas como segue: os cordões umbilicais são obtidos de total termo infantil de acordo com a Aprovação de Indivíduo Humano apropriado. As células (HUCM) de matriz de cordão umbilical humana são desenvolvidas de tecido de cordão umbilical que foi processada da seguinte maneira: o cordão é preparado para processar enxaguando-se em um béquer de 1000 mL contendo aproximadamente 500 mL de etanol 95% ou quantidade suficiente para revestir completamente, durante 30 segundos. O cordão é então ardido até que o etanol é dissipado, então lavado 2X, durante 5 minutos, em estéril resfriado PBS (500 mL). Logo, o cordão é submergido em 500 mL de solução Betadina 1X durante 5 minutos seguido enxaguando-se 2X completamente durante 5 minutos com estéril resfriado PBS (500 mL) para remover o Betadina. A corda é então seccionado em ~5 cm pedaços. Quando o pedaço de cordão foi completamente limpo e dissecado de sangue com PBS, é colocado no tubo de 50 ml ou 100 mm de placa de cultura de tecido contendo solução de 40U/mL hialuronidase/0,4mg/mL collagenase durante 30 minutos em uma incubadora umedecida 37°C com 5% de CO₂. O pedaço digerido de seção de cordão é então colocado em um coador de célula esterilizado e almofariz com uma peneira de malha instalada 40. O aparato é então colocado em uma placa de Petri de 100 mm, e 5-10 mL de Média Definida (DM) é adicionado que contém: 58% de glicose inferior DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), 40% MCDB201 (Sigma, St., Louis, MO), 1X de insulina-transferrina-selênio-A (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,15 g/mL de AlbuMAX eu (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1nM de dexametasona (Sigma, St., Louis, MO), 100 µM de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, St., Louis, MO), 100 U de penicilina, 1000 U de estreptomicina (Mediatech, Inc., Herdon, VA), 2% de soro bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 ng/mL de fator de crescimento da epiderme (EGF) (R & D SYstems, Minneapolis, MN), e 10 ng/mL de plaqueta-derivado de fator de crescimento BB (PDGF-BB) (R & D Systems, Minneapolis, MN). O tecido é triturado e empurrado pelo coador com um almofariz até a maioria do tecido perdeu sua estrutura e o fluido é coletado com uma pipetar. A amostra é centrifugada a 750 RCF (x g) durante 10 minutos. As media é aspirada com cuidado para não perturbar a pélete. A pélete é re-suspenso no volume

apropriado de DM para obter a faixa desejada onde controle de antimicrobial é obtido.

A preparação de célula diluída é então semeada em placas de 6-cavidades ou outros recipientes como apropriado. As células são colocadas em uma incubadora umedecida 37°C com 5% de CO₂ e não agitada à esquerda durante ~24 horas. O isolamento durante 24–48 horas, células não aderentes são removidas lavando-se três vezes com PBS estéril. DM fresco é alterado cada dois dias. Quando cultura de confluência dentre 50-80% é estendido as células são colhidos empregando 0,05% de tripsina/0,53 mM de solução de EDTA e re-banhado em um frasco de cultura T25 para expansão adicional em DM. As culturas são mantidas a confluência estabelecida (50-80%) para propagação. As culturas são mantidas em uma incubadora umedecida 37°C com 5% de CO₂. As culturas são reabastecidas com DM fresco cada 2-3 dias.

Uma vez as células-tronco foram isoladas, a população é expandida mitoticamente. As células-tronco devem ser transferidas ou "passada" para médio fresco quando eles alcançam uma densidade apropriada, tal como 3×10^4 -cm² a $6,5 \times 10^4$ -cm², ou, porcentagem definida de confluência na superfície de uma placa de cultura. Durante incubação das células-tronco, células podem aderir às paredes do recipiente de cultura onde eles podem continuar à proliferação e formam uma monocamada confluenta. Alternativamente, a cultura líquida pode ser agitada, por exemplo, em um agitador orbital, para impedir as células de aderir às paredes do recipiente. As células podem também ser desenvolvidas em bolsas de cultura de revestimento Teflon.

Em outra modalidade, as células maduras desejadas ou linhagem de célula são produzidas empregando células-tronco que passaram por um número baixo de passagens, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou 15 passagens. Entretanto, em algumas modalidades, as células são mantidas para mais duplicações, tal como 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 ou mais do que 100 duplicações de população. A invenção contempla que uma vez as células-tronco foram estabelecidas em cultura, sua capacidade para servir como progenitores para células maduras ou linhagem de célula podem ser mantidas, por exemplo, para passagem regular para médio fresco como a cultura de célula alcançam uma densidade apropriada ou porcentagem de confluência, ou para tratamento com um fator de desenvolvimento apropriado, ou para modificação do médio de cultura ou protocolo de cultura, ou por alguma combinação do anterior.

De acordo com a invenção, as células UCM podem ser obtidas de Wharton jelly coletada do cordão umbilical do próprio indivíduo. Alternativamente, pode ser vantajoso para obter células UCM de Wharton jelly obtido de um cordão umbilical associado com um feto em desenvolvimento ou criança recentemente-nascida, onde o indivíduo em necessidade de tratamento é um dos parentes do feto ou criança. Alternativamente, por causa da natureza "fetal" de células isoladas de Wharton jelly, rejeição imune das células da invenção e/ou

hepatócitos novo ou célula como hepatócitos produzidas a partir deste pode ser minimizado. Como um resultado, tais células podem ser úteis como "células de doador ubíquo" para a produção de hepatócitos novo ou célula como hepatócitos para uso em qualquer indivíduo em necessidade destes.

5 Diferenciação de Células UCM em Hepatócitos

As células UCM isoladas como descrito aqui são diferenciadas em células da linhagem de hepatócitos empregando os métodos como descrito aqui.

O termo "hepatócitos-como" ou "célula da linhagem de hepatócitos" como empregado aqui se refere as células que expressam pelo menos dois marcadores de hepatócitos. Os marcadores de hepatócitos ilustrativos incluem, porém não são limitados a, expressão de albumina, α FP, fator nuclear de hepatócitos 4 alfa (HNF4 α), fator nuclear de hepatócitos 3 beta (HNF3 - β), citoceratina 18 (CK18), glutamina sintetase (GS), mais actina de músculo lisos desorganizado (SMA), e Fator Von Willebrand (VWF). Os marcadores ilustrativos também incluem genes de hepatócitos induzível tal como receptor de androstano (CAR), pregnane X receptor (PXR), coativador-1 α de receptor γ ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1), fosfoenolpiruvato carboxinase (PEPCK) e receptor- γ ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ), (enzimas de gliconeogênico fundamentais), CYP3A4 (um citocromo P450 (CYP) Fase I de enzima de sistema monooxigenases importante para endo - e metabolismo xenobiótico). Em certas modalidades, estes genes induzíveis têm ou expressão elevada nas células como hepatócitos diferenciado ou podem ser induzidos em tratamento com PB, RIF, 8-Br-cAMP ou forskolina. Os marcadores de hepatócitos relevantes adicionais que podem ser expressos pelas células como hepatócitos da invenção incluir produção de albumina; produto de 7-pentoxiresorufin-O-dealquilação (PROD), que é especificamente catalisado por CYP2B1/2; a enzima requerida para eliminação de bilirrubina hepática, UDP-glicuronosiltransferase (UGT1A1); sulfotransferase de hidroxiesteróide Humano (SULT2A1) que catalisa o sulfonação e detoxicação de substratos endógeno e xenobiótico; transtiretina (TTR), triptofano-2,3-dioxigenases (TDO); alfa-1-antitripsina (alfa-1-AT), Transportador de Ânion Orgânico específico de Fígado (LST-1, também chamado OATP2); e sintase 1 fosfato de carbamoila (CPSase-1). Os marcadores ilustrativos adicionais incluem características morfológicas tal como ser principalmente mononuclear e heterogêneo com núcleo elevado para relação citoplásmica, mais poligonal a forma de cubo, exibindo inclusões de gota de lipídio, capacidade para formar estruturas tipo canicular, e capacidade para desenvolver sinusóides. Ainda outros marcadores ilustrativos incluem características tal como produção de glicogênio, síntese de proteínas de soro, proteínas de plasma, fatores coagulando, funções de detoxificação, produção de uréia, gliconeogênese e metabolismo de lipídio. Desse modo, em certas modalidades, a célula como hepatócitos expressam mais funções de hepatócitos, tal como série de metabólicos funcionando.

Em certas modalidades, as células como hepatócitos da invenção expressam três ou mais marcadores de hepatócitos como descrito aqui. Em outra modalidade, as células como hepatócitos expressam quatro ou mais dos marcadores de hepatócitos como descrito aqui. Em certas modalidades, as células como hepatócitos da invenção expressam cinco ou mais marcadores de hepatócitos como descrito aqui. Em outras modalidades, as células como hepatócitos da invenção expressam seis, sete, oito, nove, dez ou mais marcadores de hepatócitos como descrito aqui. Como será apreciado pelo técnico qualificado, as células como hepatócitos da invenção pode também expressar outros marcadores ou funções conhecidos.

Em uma modalidade, UCM são diferenciados empregando o método seguinte. Após a indução, UCM são cultivados em Média Definidas contendo: Baixa glicose de DMEM, MCDB201, 1X de ITS, 0,15 g/mL de Albumax, 1 nM de Dexametasona, 100 µM ácido-2-fosfato de Ascórbico, 10 ng/mL de EGF, 10 ng/mL de PDGF, 2% de FBS, Pen/Strep. UCM são então cultivados durante 2 dias em Média de Pré-indução contendo: Médio Dulbecco Modificado de Iscove de Soro livre (IMDM), 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de bFGF, Pen/Strep. As células são então cultivadas durante 7 dias em Média de Diferenciação contendo IMDM, 20 ng/ml de HGF, 10 ng/ml de bFGF, 0,61 g/L de nicotinamida, 2% de FBS, Pen/Strep. As células são então cultivadas a 10 semanas em Média de Maturação contendo IMDM, 20 ng/ml de oncostatina M, 1 µmol/L de dexametasona, 50 mg/ml de ITS + pré-mistura, 2% de FBS, Pen/Strep.

Em outra modalidade, o protocolo de diferenciação é uma adição seqüente de fatores de endógeno. Antes da indução, as células são semeadas em 0,1% de revestimento de gelatina T75 frascos de cultura a uma densidade de 2,0-3,0E06 células/frasco e permitir aderir durante a noite. As células são então tratadas durante dois dias em média de pré-indução compreendendo Soro livre de IMDM (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 ng/ml de fator de crescimento da epiderme humano recombinante (rhEGF) (R & D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico de humano recombinante (rhbFGF) (Chemicon, Temecula, CA), e Pen/Strep. A diferenciação é realizado empregando um processo de duas etapas onde células são cultura durante 7 dias em IMDM, 20 ng/ml de fator de crescimento de hepatócitos humano recombinante (rhHGF) (Chemicon, Temecula, CA), 10 ng/ml de rhbFGF, 0,61 g/L de nicotinamida (Sigma, St. Louis, MO), 2% de FBS, Pen/Strep. As células são então cultivadas até 10 semanas em média de maturação contendo: IMDM, 20 ng/ml de Oncostatina M Humano (Biossource, Camarillo, CA), 1 µmol/L de dexametasona, 50 mg/ml ITS+ pré-mistura (Sigma, St. Louis, MO), 2% de FBS, e Pen/Strep. Média é alterada cada três dias e diferenciação hepática é avaliada em uma maneira temporal.

Em modalidades adicionais, as células UCM são diferenciadas pela primeira cultura no médio cultivado padrão empregando as células UCM como descrito aqui, tal como, Média Definidas compreendendo: Baixa glicose de DMEM, MCDB201, 1X de ITS, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 g/mL ou Albumax mais elevado; 0,1,

0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, ou 1 nM de Dexametasona ou concentrações mais elevadas tal como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0 ou 3,5 nM de dexametasona; 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, ou 150 μ M de ácido-2-fosfato de Ascórbico; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 ng/mL de EGF; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 ng/mL de PDGF; 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 ou 5% de FBS; e Pen/Strep. As células UCM são então cultivadas durante 1, 2, 3, 4, ou 5 dias ou mais muito tempo em Média de Pré-indução compreendendo: Médio Dulbecco Modificado de Iscove de Soro livre (IMDM); 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 ng/ml, ou concentrações mais elevadas, de EGF; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 ng/ml de bFGF; e Pen/Strep. As células são então cultivadas durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou mais dias em Média de Diferenciação compreendendo IMDM; 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 ng/ml de HGF; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 ng/ml de bFGF; 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,61, 0,7, 0,8, 0,9 g/L, ou mais, nicotinamida; 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 ou 5% de FBS; e Pen/Strep. As células são então cultivadas a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 1,5 1,6 17, 18, 19, ou 20 semanas ou mais muito tempo em Media de Maturação compreendendo IMDM; 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 ng/ml de oncostatina M; 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 3,0, 4,0 ou 5 μ mol/L, ou mais elevado, dexametasona; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100 mg/ml de ITS+ pré-mistura de (BD Biosciences) ou mais; 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 ou 5% FBS; e Pen/Strep.

Em certas modalidades, as células são diferenciadas na presença de uma variedade de fatores de crescimento, incluindo porém não limitado a, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento da epiderme (EGF), fator de crescimento de transformação (TGF), fator de crescimento de ácido fibroblasto (aFGF), insulina, insulina-como fator de crescimento (IGF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), estromal derivado do fator-1 α (SDF-1 α), fator de célula-tronco (SCF), oncostatina M (OSM), fator estimulador de crescimento de hepatócitos derivado de soro (HGSF), dexametasona, ácido retinóico, butirato de sódio, nicotinamida, norepinefrina, e sulfóxido de dimetila. Em uma modalidade, os fatores de crescimento são fatores de crescimento humanos recombinante.

Em uma modalidade, célula como hepatócitos é diferenciada na presença de uma sustentação para permitir cultura tridimensional das células durante diferenciação. O material de sustentação pode compreende componentes de ocorrência natural ou pode ser compreendido de materiais sintéticos, ou ambos. O material de sustentação pode ser biocompatível. O material de sustentação ilustrativo inclui matrizes extracelulares, e materiais descritos em, por exemplo, Hamamoto R, e outros, J Biochem (Tóquio) 1998;124(5):972-979 ;

HENG BC, e outros, Journal de Gastroenterology e Hepatology. 2005;20(7):975-987. Outros materiais de sustentação que podem ser empregados no contexto da presente invenção incluem porém não são limitados a um ou uma mistura de dois ou mais do seguinte: colágenos (por exemplo, tipos de colágeno I, III, IV, V e VI), gelatina, alginato, fibronectina, laminina, entactina/nidogene, tenascina, trombospondina, SPARC, undulina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (por exemplo, hialuronan, sulfato de heparana, sulfato de condroitina, sulfato de ceratana e sulfato de dermatan), polipropileno, polímero de TER, alginato-poli L-lisina, sulfato de condroitina, quitosana, MATRIGEL® (Becton-Dickinson, Inc USA) ou outros materiais de matriz extracelulares comercialmente disponíveis. Em uma modalidade particular, a matriz extracelular para uso em diferenciação o UCM em célula como hepatócitos é gelatina.

Em uma modalidade, as células UCM são diferenciadas através de co-cultura com uma camada de cevador de hepatócitos, tal como com células hepáticas isoladas, hepatócitos imortalizado tal como esses descritos na Patente US No. 5,869,243 e 6,107,043, ou com outras linhagem de célula de hepatócitos disponível na técnica, por exemplo, Células HB8065. A esse respeito, as células UCM podem ser cultivadas em um médio de crescimento padrão, tal como suplementado de DMEM com 2% de FBS, e cultivado com um choque térmico ou caso contrário camada de cevador de hepatócitos inválida. Tal cultura pode ser realizada em uma membrana porosa em um suplemento de Trans-cavidades.

Em certas modalidades, as células UCM são cultivadas em uma ou mais médias descritas aqui, tal como, Média Definidas, Média de Pré-indução, Média de Diferenciação, e Média de Maturação durante um tempo suficiente para as células UCM para diferenciar em células da linhagem de hepatócitos, como indicado por quaisquer de vários indicadores, incluindo morfológicas alteradas, expressão de genes hepatócitos, expressão de proteínas de hepatócitos, e características funcionais de hepatócitos, como descrito também aqui.

Desse modo, em certas modalidades, as células UCM são cultivadas em uma ou mais médias descritas aqui, tal como, Média Definidas, Média de Pré-indução, Média de Diferenciação, e Média de Maturação durante um tempo suficiente para as células UCM para expressar albumina em níveis acima de células cultivadas em média de controle. Em uma modalidade adicional, as células UCM são cultivadas em uma ou mais médias descritas aqui, tal como Média Definidas, Média de Pré-indução, Média de Diferenciação, e Média de Maturação durante um tempo suficiente para as células UCM para expressar Proteína α -Fetal (α FP) níveis acima de células cultivadas em média de controle. Geralmente, as células de controle UCM não diferenciadas não expressam albumina ou α FP. Em uma modalidade adicional, as células UCM são cultivadas em uma ou mais médias descritas aqui durante um tempo suficiente para a actina de músculo liso se tornar menos organizado que em células não diferenciado. Em uma modalidade adicional, as células UCM são cultivadas em uma ou mais médias descritas aqui durante um tempo suficiente para as células para adotar um hepatócitos-

como morfologia, incluindo porém não limitado a, uma forma poligonal aplainada como comparado à morfologia de forma amoldada das células não diferenciada. Em uma modalidade, as células UCM são cultivadas em uma ou mais médias descritas aqui durante um tempo suficiente para um ou mais do seguinte: as células para expressar albumina, para expressar α FP, adota um hepatócitos-como morfologia e para a actina de músculo liso se tornar menos organizado.

Em uma modalidade, as células UCM são cultivadas em uma ou mais médias descritas aqui durante um tempo suficiente para expressão de pelo menos dois dos marcadores seguintes: albumina, α FP, fator 4 alfa de hepatócitos nuclear (HNF4 α), citoceratina 18 (CK18), glutamina sintetase (GS), mais actina de músculo liso desorganizada (SMA), Fator Von Willebrand (VWF), um gene induzível de hepatócitos tal como receptor de androstano (CARRO), pregnane X receptor (PXR), co-ativador-1 α de receptor γ ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1), fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) e receptor- γ ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ), (enzimas de gluconeogênico fundamentais), CYP3A4 (um citocromo P450 (CYP) Fase I de enzima de sistema monooxigenases importante para endo- e metabolismo xenobiótico) (Estes genes induzível tem ou elevado expressado nas células como hepatócitos diferenciado ou podem ser induzidos no tratamento com PB, RIF, 8-Br-cAMP ou forskolina); características morfológicas tal como ser principalmente mononuclear e heterogêneo com núcleo elevado para relação citoplásmica, mais poligonal a forma de cubo, exibindo inclusões de gota de lipídio, capacidade para formar tipo de estrutura canicular, capacidade para desenvolver sinusóides, produção de glicogênio, síntese de proteínas de soro, proteínas de plasma, fatores de coagulação, funções de detoxificação, produção de uréia, gliconeogênese e metabolismo de lipídio.

Em uma modalidade particular, as células UCM são diferenciadas em célula como hepatócitos cultivando-se em IMDM com gelatina, fator de crescimento humano recombinante (por exemplo, rhEGF, rhbFGF, rhHGF, Oncostatina M Humano), e Substituição de Soro KNOCKOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Em uma modalidade adicional, as células são cultivadas durante um tempo suficiente para propriedades funcionais como hepatócitos adquirido, tal como produção de glicogênio, síntese de proteínas de soro, proteínas de plasma, fatores de coagulação, funções de detoxificação, produção de uréia, gliconeogênese e metabolismo de lipídio. A esse respeito, a diferenciação é avaliada medindo-se propriedades funcionais tal como produção de glicogênio, empregando técnicas conhecidas na técnica. O glicogênio é uma amostra de polissacarídeo de intracitoplásmico encontrado em abundância nas células hepáticas. Para demonstrar armazenamento de glicogênio, as células diferenciadas podem ser manchadas com Periodic Acid-Schiff (PAS). O glicogênio pode estar voltado por diástase em condições de cultura de célula. Para demonstrar células diferenciadas manchando glicogênio positivo podem ser pré-

tradadas com solução de Diástase.

A captação celular de tintura de aniônico, Indocianina Verde (ICG), pode ser examinado em células diferenciadas para determinar função hepática. Isto pode ser realizado empregando técnicas conhecidas na técnica. Em uma modalidade, ICG é dissolvido a uma concentração inicial de 5 mg/mL em solvente. A solução é então diluída a 1 mg/mL em média de maturação e adicionado a placa de cultura e incubada às 37°C em uma incubadora umedecida a 5% de CO₂ durante 10-15 minutos. As células são lavadas completamente com PBS estéril e então visualizadas sob um microscópio óptico. Após examinar, o PBS foi então removido e média de maturação é adicionado e as células incubadas às 37°C em uma incubadora umedecida a 5% de CO₂ durante ~4-6 horas para confirmar eliminação de ICG.

As células hepáticas expressam receptores de LDL para regulamento de homeóstase de colesterol em mamíferos. Desse modo, a captação de LDL pode ser empregada como um indicador de diferenciação. Para determinar células diferenciadas exibiram captação celular de LDL, as células são tratadas com Dil-Ac-LDL. Em uma modalidade, Dil-Ac-LDL é diluída em média de maturação a 10 µg/mL, adicionado a células, e incubada durante 4 horas às 37°C em uma incubadora umedecida. Após incubação, média é removida contendo o Dil-Ac-LDL e as células foram lavadas 2X com média de maturação de sonda-livres. As células podem ser visualizadas empregando excitação de rodamina padrão:

Como deve ser reconhecido pelo alguém versado ao ler a descrição presente, qualquer de uma variedade de técnicas conhecida na técnica pode ser empregado para determinar expressão de albumina, α FP, organização de actina de músculo liso e morfologia de célula, incluindo porém não limitado a ensaios de expressão de gene tal como PCR, RT-PCR, PCR quantitativo, análises de expressão de proteína incluindo imunoisoquímica, ensaios de imunofluorescência, e outros. Tais técnicas são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, em Protocolos Atuais em Biologia Molecular, ou Protocolos Atuais em Biologia de Célula, John Wiley e Sons, NY, NY.

A diferenciação das células da invenção pode ser detectada por uma variedade de técnicas, tal como, porém não limitado a, métodos de citométrico de fluxo, imunoisoquímica, técnicas de imunofluorescência, em hibridação *in situ*, e/ou histológica ou técnicas biológicas celulares.

A invenção inclui um método de gerar um banco de células como hepatócitos que foram diferenciados de células-tronco UCM, obtendo-se células matriz de cordão umbilical, fracionamento a matriz em uma fração enriquecida com uma célula-tronco e cultivando as células-tronco em um médio de cultura contendo um ou mais fatores de crescimento para diferenciar as células em célula como hepatócitos, como descrito aqui. Alternativamente, um banco do cordão umbilical próprio e/ou células não fracionadas podem ser mantidas para obter células matriz a uma data posterior.

A invenção também contempla o estabelecimento e manutenção de culturas de célula como hepatócitos diferenciados de UCM.

Uma vez as células da invenção foram estabelecidas em cultura, como descrito acima, eles podem ser mantidos ou armazenados em "bancos de célula" compreendendo qualquer contínuo de culturas *in vitro* de transferência regular de células requeridas, ou, em certas modalidades, as células que podem ser criopreservada. As células como hepatócitos diferenciados de células-tronco UCM derivado de cordão umbilical obtidos de populações geneticamente diversas e armazenaram nos bancos a ser empregados em um momento futuro.

Criopreservação de células da invenção pode ser realizado de acordo com métodos conhecidos, tal como esses descritos em Doyle e outros, 1995, cultura de célula e Tecido. Por exemplo, porém não por via de limitação, células podem ser suspendidas em um "médio de geadas" tal como, por exemplo, médio de cultura também compreendendo 15-20% de FBS e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), com ou sem 5-10% de glicerol, em uma densidade, por exemplo, de cerca de $4-10 \times 10^6$ células/ml. As células são dispensadas em vidro ou ampolas de plástico (Nunc) que são então selado e transferido para a câmara de congelamento de um congelador programável. A taxa ótima de congelar pode ser determinada empiricamente. Por exemplo, um programa de congelamento que dá uma alteração em temperatura de cerca de -1°C/min pelo calor de fusão pode ser empregado. Uma vez as ampolas têm alcançado cerca de -180°C ., eles são transferidos a uma área de armazenamento de nitrogênio líquida. As células de criopreservada podem ser armazenadas durante um período de anos, entretanto eles devem ser controlado pelo menos cada 5 anos para manutenção de viabilidade.

As células de criopreservada da invenção constituem um banco de células, porções de qual pode ser "retirado" descongelando-se e então empregado para produzir novas células como hepatócitos, etc. como necessário, ou para ser empregado em quaisquer dos métodos de uso como descrito aqui. O descongelando deve geralmente ser realizado rapidamente, por exemplo, transferindo-se uma ampola de nitrogênio líquido durante 37°C . banho de água. O teor de congelamento da ampola deve ser imediatamente transferido sob condições estéreis a um recipiente de cultura contendo um médio apropriado tal como RPMI 1640, DMEM condicionado com 20% de FBS. As células na média de cultura são preferivelmente ajustadas a uma densidade inicial de cerca de 3×10^5 a 6×10^5 células/ml as células podem condicionar o médio assim que possível, desse modo prevenindo uma última fase prolongada. Uma vez em cultura, as células podem ser examinadas diária, por exemplo, com um microscópio invertido para detectar proliferação de célula, e sub-cultura assim que eles alcancem uma densidade apropriada.

As células da invenção podem ser retiradas do banco como necessário, e empregado para análise de droga ou no tratamento de distúrbio hepático como descrito também aqui. As células da invenção podem ser empregadas ou *in vitro*, ou *in vivo*, por exemplo, por

administração direta de células para um fígado danificado onde células novas são necessárias. Como supra descrito, as células como hepatócitos da invenção podem ser empregados para produzir células como hepatócitos novas para uso em um indivíduo onde as células foram originalmente isoladas do cordão umbilical do indivíduo (autóloga). Alternativamente, as células da invenção podem ser empregadas como células de doador onipresentes, isto é, para produzir novas células de fígado para uso em qualquer indivíduo (heterólogo).

As células como hepatócitos diferenciados da invenção pode também ser fornecido como um painel de célula como hepatócitos derivadas de fontes de cordão umbilical diferente múltipla de indivíduos de fundos genéticos diversos e até mesmo de fontes animais diferentes.

Por exemplo, o painel de UMC derivado de célula como hepatócitos pode incluir célula como hepatócitos derivadas de fontes de UMC de indivíduos conhecidos para ter polimorfismos em genes codificando de enzimas metabolizando droga e transportadores de droga. Os painéis da invenção podem ser fornecidos como parte de um kit de análise de droga incluindo reagentes para análise de droga, tais reagentes incluindo, por exemplo, quaisquer das médias de cultura descritas aqui, e reagentes para detecta albumina e expressão de α -FP.

Em uma modalidade, as células como hepatócitos da invenção podem ser geneticamente modificadas. De acordo com esta modalidade, as células como hepatócitos da invenção são expressas a um vetor de transferência de gene compreendendo um ácido nucléico incluindo um transgene, tal que o ácido nucléico é introduzido na célula sob condições apropriadas para o transgene a ser expressa dentro da célula. O transgene geralmente é um cassete de expressão, incluindo uma codificação operavelmente de polinucleotídeo ligado a um promotor adequado. O polinucleotídeo de codificação podem codificar uma proteína, ou pode codificar RNA biologicamente ativo, tal como antisense de RNA, siRNA ou uma ribozima. Desse modo, o polinucleotídeo de codificação pode codificar um gene conferindo, por exemplo, resistência para uma toxina ou um agente infeccioso, tal como Hepatite A, B, ou C, um hormônio (tal como hormônios de crescimento de peptídeo, fator de liberação de hormônio, hormônios sexuais, hormônios adrenocorticotrófico, citocinas tal como interferons, interleucinas, e interleucinas), uma porção de sinalização intracelular ligando a superfície de célula tal como moléculas de adesão de célula e receptores de hormônio, e fatores promovendo uma linhagem determinada de diferenciação, ou qualquer outro transgene com sequência conhecida.

Outros transgenes ilustrativos para uso aqui codificam moléculas efetoras de crescimento. As moléculas efetoras de crescimento, como empregado aqui, refere-se a moléculas que liga aos receptores de superfície de célula e regulam o crescimento, réplica ou diferenciação de células alvo ou tecido, em particular células hepáticas. As moléculas efetoras de crescimento ilustrativas são fatores de crescimento e moléculas de matriz extracelulares. Os exemplos de fatores de crescimento incluem fator de crescimento da epiderme (EGF), fator de crescimento devido das plaquetas (PDGF), fatores de crescimento de transformação ($TGF\alpha$,

TGF β), fator de crescimento de hepatócitos, fator de ligação de heparina, fator de crescimento como insulina I ou II, fator de crescimento de fibroblasto, eritropoetina, fator de crescimento de nervo, e outros fatores conhecidos por alguém versado na técnica. Os fatores de crescimento adicionais são descritos em "Fatores de Crescimento de Peptídeo e seus Receptores I" M. B. Sporn e A. B. Roberts, eds. (Springer-Verlag, Nova Iorque, 1990).

O cassete de expressão contendo o transgene deve ser incorporado no vetor genético adequado para liberação o transgene à célula. Dependendo da aplicação de fim desejado, qualquer tal vetor pode ser empregado para modificar geneticamente as células (por exemplo, plasmídeos, DNA nu, vírus tal como adenovírus, vírus adeno-associado, herpesvírus, lentivírus, papilomavírus, retrovírus, etc.). Qualquer método de construir o cassete de expressão desejado dentro de tais vetores pode ser empregado, muitos dos quais são bem conhecido na técnica, tal como através de clonagem direta, recombinação homóloga, etc. O vetor desejado determinará em grande parte o método empregado para introduz o vetor nas células, que são geralmente conhecido na técnica. As técnicas adequadas incluem fusão de protoplasto, precipitação de cálcio-fosfato, goma de gene, eletroporação, e infecção com vetores viral.

Desse modo, a invenção abrange vetores de expressão e métodos para a introdução de endógeno de DNA nas células com expressão concomitante do endógeno de DNA nas células tal como esses descritos, por exemplo, em Sambrook e outros (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque), e em Ausubel e outros (1997, Current Protocols em Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nova Iorque).

"Codificando" se refere à propriedade inerente de sequências específicas de nucleotídeos em um polinucleotídeo, tal como um gene, um cDNA, ou um mRNA, para servir como modelos para síntese de outros polímeros e macromoléculas em processos biológicos tendo ou uma sequência definida de nucleotídeos (isto é, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas resultando aqui. Desse modo, um ácido nucléico codifica uma proteína se transcrição e tradução de mRNA correspondente àquele ácido nucléico produz a proteína em uma célula ou outro sistema biológico. Ambos a filamento de codificação, a sequência de nucleotídeo de qual é idêntico à sequência de mRNA e é normalmente fornecido em sequência listadas, e o filamento não codificado, empregado como o modelo para transcrição de um gene ou cDNA, pode ser referido como codificar a proteína ou outro produto daquele gene ou cDNA.

A menos que especifico de outra, uma "sequência nucleotídeo codificada uma sequência de aminoácido" inclui todas as sequências que são versões degeneradas de um ao outro e que codifica a mesma sequência de aminoácido. As sequência de nucleotídeo que codificam proteínas e RNA podem incluir íntrons.

Um "ácido nucléico isolado" se refere e a um segmento de ácido nucléico ou fragmento que tem sido separado de sequência que flanqueia em um estado de ocorrência natural, por

exemplo, um fragmento de DNA que foi removido das sequências que são normalmente adjacentes ao fragmento, por exemplo, as sequências adjacentes ao fragmento em um genoma na qual ocorrência natural. O termo também aplica aos ácidos nucleicos que foram purificados substancialmente de outros componentes que acompanha naturalmente o ácido nucleico, por exemplo, RNA ou DNA ou proteínas que acompanha naturalmente na célula. O termo consequentemente incluir, por exemplo, um DNA recombinante que está incorporado em um vetor, em um autonomamente replicando plasmídeo ou vírus, ou no DNA genômico de um procarioto ou eucarioto, ou que existe como uma molécula separada (por exemplo, como um cDNA ou um genômico ou fragmento de cDNA produzido por PCR ou digestão de enzima de restrição) independente de outras sequências. Também inclui um DNA recombinante que é parte de uma sequência de polipeptídeo adicional de gene híbrido codificado.

No contexto da presente invenção, as abreviações seguintes para as bases de ácido nucleico de ocorrência comum são empregadas. "Um" se refere a adenosina, "C" se refere a citosina, "G" se refere a guanosina, "T" se refere a timidina, e "U" se refere a uridina.

Um "vetor" é uma composição de material que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser empregado para libera o ácido nucleico isolado ao interior de uma célula. Os vetores numerosos são conhecidos na técnica incluindo, porém não limitado a, polinucleotídeos linear, polinucleotídeos associado com iônico ou compostos de anfifílico, plasmídeos, e vírus. Desse modo, o termo "vetor" inclui uma replica de plasmídeo autonomamente ou um vírus. O termo deve também ser interpretado para incluem compostos não plasmídeo e não viral que facilita transferência de ácido nucleico em células, tal como, por exemplo, compostos de polilisina, lipossomas, e outros. Os exemplos de vetores virais incluem, porém não são limitados a, vetores de adenoviral, vetores de vírus adeno associados, vetores retroviral, e outros.

"Vetor de expressão" se refere a um vetor compreendendo um polinucleotídeo recombinante compreendendo sequências de controle de expressão operavelmente ligado a uma sequência de nucleotídeo a ser expressa. Um vetor de expressão compreende elementos cis-ativo suficiente para expressa; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou em um sistema de expressão *in vitro*. Os vetores de expressão incluem todos aqueles versados conhecidos na técnica, tal como cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, nu ou contido em lipossomas) e vírus que incorpora o polinucleotídeo recombinante.

Métodos de Uso

As células como hepatócitos diferenciados de células UCM da invenção são úteis em uma variedade de colocações, incluindo análise de droga, análise para interações de droga, transplantação, regeneração de tecido/órgão e tratamento de dano do fígado ou outros distúrbios hepáticos.

Em uma modalidade, a invenção fornece métodos para testar a atividade de um composto (por exemplo, uma droga ou candidato de droga). A atividade de um composto pode

ser avaliada medindo-se o efeito da droga na viabilidade, atividade metabólica, o efeito em expressão de gene de enzima P450 ou atividade de proteína das células como hepatócitos da invenção ou o efeito da droga em transportadores de transporte de droga. Como seria entendido pelo artesão versado, as células como hepatócitos da invenção podem ser empregadas em qualquer ensaio de análise de droga conhecida, tal como ensaios em enzimas de P450 específicas ou painéis de enzimas de P450, ensaios de análise de droga atuais que usam células de hepatócitos, e outros. A presente invenção fornece a vantagem que as células como hepatócitos da invenção são facilmente produzidas e podem ser derivadas de indivíduos com fundos genéticos diversos.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece métodos para testar a atividade (tal como a toxicidade) de um composto contatando-se as células como hepatócitos da invenção com um composto e medindo a viabilidade das células como hepatócitos. Uma diminuição em viabilidade na presença de um composto de teste comparado na ausência do composto de teste indica que o composto é tóxico *in vivo*. A viabilidade de células pode ser determinada empregando técnicas bem conhecidas ao artesão versado, tal como manchar seguida por citometria de fluxo ou simplesmente visualizando-se as células com um microscópio empregando um hemocitômetro.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para testar a atividade de um composto contatando-se as células como hepatócitos da invenção com um composto e medindo a atividade metabólica das células como hepatócitos. Uma diminuição ou aumento em atividade metabólica na presença de um composto de teste comparado na ausência do composto de teste indica uma atividade de droga *in vivo*.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para testar a atividade de um composto contatando-se uma primeira célula como hepatócitos da invenção com o composto para produzir um sobrenadante de célula e então contatando uma segunda célula como hepatócitos com o sobrenadante de célula e viabilidade medindo e/ou a atividade metabólica da segunda célula como hepatócitos. Uma diminuição em viabilidade e/ou uma diminuição ou aumento em atividade metabólica da segunda célula como hepatócitos na presença do sobrenadante comparado na ausência do sobrenadante de célula indica que o composto pode ter atividade *in vivo*. Por exemplo, uma diminuição em viabilidade da segunda célula como hepatócitos na presença do sobrenadante comparado na ausência do sobrenadante de célula indica o composto é tóxico *in vivo*.

Uma modalidade da presente invenção fornece métodos para testar a atividade de um composto contatando-se as células como hepatócitos da invenção com um composto e medindo a indução ou inibição de uma ou mais expressão de gene de enzima P450 citocromo ou atividade de proteína. Um aumento ou diminui em um ou mais expressão de gene P450 citocromo e/ou atividade de enzima na presença de um composto de teste comparado na

ausência do composto de teste fornecendo informação de atividade importante cerca do composto *in vivo* particularmente com respeito a interações de droga de potencial com drogas conhecidas.

Em uma modalidade adicional, a presente invenção fornece métodos para testar a atividade de um composto contatando-se uma primeira célula como hepatócitos da invenção com o composto para produzir um sobrenadante de célula e então contatando uma segunda célula como hepatócitos com o sobrenadante de célula e medindo a indução de uma ou mais expressão de gene de enzima de P450 ou atividade de proteína pela segunda célula como hepatócitos. Um aumento ou diminui em expressão de gene e/ou enzima atividade da segunda célula como hepatócitos na presença do sobrenadante comparado na ausência do sobrenadante de célula indica a atividade particular do composto *in vivo*. Esta informação de atividade é importante, por exemplo, com respeito a drogas conhecidas e pode também ser empregado para interação de droga de teste para drogas do futuro.

Uma modalidade adicional da invenção fornece métodos para avaliar interações de droga. As interações de droga podem ser avaliadas contatando-se as células da invenção com dois compostos e determinar o efeito nas células de um composto é impressado pela presença do segundo composto. Por exemplo, o método pode compreender contatando uma primeira população da célula como hepatócitos com um primeiro composto, contatando uma segunda população da célula como hepatócitos com um segundo composto e contatando uma terceira população de células como hepatócitos com ambas o primeiro e os segundo compostos e medindo um efeito particular em cada das populações (por exemplo, viabilidade de célula, atividade metabólica, um gene P450 citocromo/ expressão de proteína ou atividade) onde uma diminuição ou aumenta estatisticamente significante em um efeito na terceira população contatada com ambos os compostos como comparado a qualquer uma das primeiras ou segundas populações deve indicar uma interação de droga. Uma interação de droga pode compreender uma inibição de droga outra droga ou uma droga aumentando a atividade de outra droga.

Como notado acima, perfis de citocromo P450 em drogas conhecidas são disponíveis na técnica. Como tal, interações de droga podem ser determinadas para um composto candidato avaliando-se seu efeito em enzimas P450 citocromo empregando as células como hepatócitos empregando os métodos como descrito aqui e comparando os resultados aos perfis conhecidos de drogas conhecidas, fornecendo informação valiosa com respeito a interações de um composto candidato com drogas conhecidas (por exemplo, geralmente empregado sob as drogas contadas tal como ibuprofeno, acetaminofeno, aspirina, e outros).

Como deve ser reconhecido por alguém versado, expressão de gene pode ser medido empregando qualquer de uma variedade de técnicas conhecido na técnica tal como porém não limitado a, reação de cadeia polimerase quantitativa (QC-PCR ou QC-RT PCR). Outros métodos

para detecção de expressão de mRNA são bem conhecidos e estabelecidos na técnica e podem incluir, porém não são limitados a, amplificação média de transcrição (TMA), amplificação de reação de cadeia polimerase (PCR), amplificação de reação de cadeia polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), amplificação de reação de cadeia ligase (LCR), amplificação de remoção de filamento (SDA), e amplificação com base na sequência de ácido nucleico (NASBA).

Atividade de enzima pode ser medida empregando ensaios conhecidos na técnica, tal como porém não limitado a, ensaio de análise de preparações de microsoma de hepatócitos (veja por exemplo, R. Walsky, e R. Scott Obach *Drug Metabolism e Disposition* 32:647-660, 2004). Outros ensaios são comercialmente disponíveis tal como, Kits de inibição P450 alta produtividade, BD Biosciences (San Jose, CA); ou outros kits disponíveis por Invitrogen (Carlsbad, Califórnia), Promega (Madison, Wisconsin), Sigma Aldrich (St. Louis, MO), e outras companhias. As microsomas hepáticas humanas fornecem um modo conveniente para estudar metabolismo de CYP450. Os microsomas são uma fração sub-celular de tecido obtido por centrifugação de alta velocidade diferencial. Todas as enzimas de CYP450 são coletadas na fração de microsomal. As enzimas de CYP450 mantêm sua atividade por muitos anos em microsomas ou fígado inteiro armazenado em baixa temperatura (por exemplo, -70°C). Os requerimentos de co-fator para a reação medida de CYP450 são bem caracterizados, consistindo principalmente de sistema de sustentação de redox tal como NADPH. As microsomas hepáticas podem ser obtidos empregando técnicas conhecidas na técnica (veja, por exemplo, Coughtrie e outros, *Clin Chem* 1991 37/5 739-742; J. Lam e L. Benet *Drug Metabolism e Disposition* 32:1311-1316, 2004; Salphati L e Benet LZ (1999) Metabolismo de digoxina e digitoxosídeos de digoxigenina em microsomas de fígado de rato: envolvimento de citocromo P4503A. *Xenobiótica* 29: 171-185) O cDNAs para o CYP450s comum tem sido clonado, e as proteínas enzimáticas humana recombinante tem sido expressa em uma variedade de células. Após a série metabólica aparente foi determinada empregando microsomas, uso destas enzimas recombinante fornece um modo excelente para confirmar resultados.

As enzimas metabólicas adequadas que podem ser medidas em um ensaio de análise de droga empregando as células como hepatócitos da invenção incluindo porém não são limitados a enzimas P450 citocromo. As enzimas 450 CYP adequadas incluem CITOCROMO P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2A1, 2A2, 2A3, 2A4, 2A5, 2A6, CYP2B1, 2B2, 2B3, 2B4, 2B5, 2B6, CYP2C1, 2C2, 2C3, 2C4, 2C5, 2C6, 2C7, 2C8, 2C9, 2C10, 2C11, 2C12, CYP2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D6, CYP2E1, CYP3A1, 3A2, 3A3, 3A4, 3A5, 3A7, CYP4A1, 4A2, 4A3, 4A4, CYP4A11, CYP P450 (TXAS), CYP P450 11A (P450_{scc}), CYP P450 17(P450_{17a}), CYP P450 19 (P450_{arom}), CYP P450 51 (P450_{14a}), CYP P450 105A1, CYP P450 105B1. Geralmente um ensaio de análise de droga empregando as células como hepatócitos da presente invenção

incluem medição para indução de enzimas P450 citocromo. A esse respeito, indução pode ser medida ao nível de expressão de gene ou pode ser medida pela atividade de proteína das enzimas específicas (veja, por exemplo, Patente US Nos. 6,830,897; 7,041,501). Os testes comercialmente disponíveis podem ser aplicáveis para uso com as células como hepatócitos da invenção. Estes incluem, porém não são limitados a, TranscriptionPath (GenPathway, Inc., San Diego, CA); HTS P450 Inhibition Kits, BD Biosciences, San Jose, CA); e outros.

Outras enzimas metabólicas importantes que podem ser medidas em um ensaio de análise de droga empregando as células como hepatócitos desta invenção incluindo enzimas responsáveis para acetilação, metilação, glicuronidação, sulfatação, e de-esterificação(esterases). As enzimas metabólicas adequadas cujo atividade (incluindo atividade de enzima ou expressão de gene) pode ser medido incluir glutathione-tioéteres, Leucotrieno C₄,butirilcolinesterase, N-Acetiltransferase, UDP-glicuronosiltransferase (UDPGT) isoenzimas, TL PST, TS PST, enzima de droga conjugação glicosidação, glutathione-S-transferases (GSTs) (RX:glutathione-R-transferase), GST1, GST2, GST3, GST4, GST5, GST6, desidrogenase de álcool (ADH), ADH I, ADH II, ADH III, desidrogenase de aldeído (ALDH), citosólica (ALDH1), mitocondrial (ALDH2), oxidase de monoamina, MAO,: Ec 1.4.3.4, MAOA, MAOB, flavina contendo oxidase de monoamina, dismutase de superóxido de enzima (SOD), Catalase, amidases, N1, -monoglutationil spermidina, N1,N8-bis(glutationil) spermidina, Tioesters, GS-SG, GS-S-cisteína, GS-S-cisteinilglicina, GS-S-O₃H, GS-S-CoA, GS-S-proteínas, anidrase S-carbônico III, S-actina, Mercaptídeos, GS-Cu(I), GS-Cu(II)-SG, GS-SeH, GS-Se-SG, GS-Zn-R, GS-Cr-R, esterase de Colina, carboxipeptidase de lisossômica, Calpains, desidrogenase de Retinol, redutase de Retinila, aciltransferase de retinol de acil-CoA, hidrolases de folato, fosfato de proteína (pp) 4 st, PP-1, PP-2A, PP-2Bpp-2C, deamidase, carboxiesterase, Endopeptidases, Enterocinase, endopeptidase Neutro E.C.3.4.24.11, endopeptidase Neutro, carboxipeptidases, carboxipeptidase de dipeptidil, também chamado de peptidil-dipeptidase A ou enzima convertendo angiotensina (ACE) E.C.3.4.15.1, carboxipeptidase M, transpeptidase de g-Glutamila E.C.2.3.2.2, Carboxipeptidase P, conjugase de Folato E.C.3.4.12.10, Dipeptidases, dipeptidase de Glutathione, Membrana peptidases de Gly-Leu, dipeptidase de Asp-leu Zinco-estável, Enterocítico intracelular peptidases, tripeptidase Amino E.C.3.4.11.4, dipeptidase Amino E.C.3.4.13.2, Prodiptidase, endoproteinase Arg-seletivo; a família de hidrolases de borda de escova, Endopeptidase-24.11, Endopeptidase-2(meprin), peptidase de Dipeptidil IV, dipeptidase de Membrana GPI, Glicosidases, Sacarase-isomaltase, Lactase-glicosila-ceraminidase, Glicoamilase-maltase, Trehalasa, enzimas de Carboidrase, alfa-Amilase (pancreático), Disacaridases (geral), hidrolase de Lactase-phlorizin, carboidrases Mamífero, Glucoamilase, Sacarase-Isomaltase, ceramidase de Lactase-glicosila, fontes Enzimáticas de ROM, oxidase de Xantina, oxidase de NADPH, oxidases de Amina, oxidase de Aldeído, desidrogenase de Diidroorotato, Peroxidases, Tripsinaogen 1, Tripsinaogen 2, Tripsinaogen 3, Cimotripsinaogen,

proElastase 1, proElastase 2, Protcase E, Calicreínnogen, proCarboxipeptidase A1, proCarboxipeptidase A2, proCarboxipeptidase B1, proCarboxipeptidase B2, Glicosidase, Amilase, lipases, lipase de Triglicarídeo, Colipase, Carboxil de éster hidrolase, Fosfolipase A2, Nucleases, Dnase eu, redutase de Ribonucleotídeo (RNRs), Proteína de Rótulo IEP, A1

5 Amilase 1, A2, Amilase 2, Lipase, CEL lipase de Carboxil-éster, PL Profosfolipase A, T1 Tripsinaogen 1, T2 Tripsinaogen 2, T3 Tripsinaogen 3, T4 Tripsinaogen 4, C1 Cimotoripsinaogen 1, C2 Cimotoripsinaogen 2, PE1 Proelastase 1, PE2 Proelastase 2, PCA Procarboxipeptidase A1, PCA1 Procarboxipeptidase A2, PCB1 Procarboxipeptidase B1, PCB2 Procarboxipeptidase B2, R Ribonuclease, LS Lithostatin, Características de isoenzimas UDPGT purificada de fígado de

10 rato, 4-nitrofenol UDPGT, 17b-Hidroxisteríode UDDPGT, 3-a-Hidroxiesteróide UDPGT, Morfina UDPGT, Billirubin UDPGT, monoglicuronídeo de Billirubin, Fenol UDPGT, 5-Hidroxitriptamina UDPGT, monodigitóxido de Digitoxigenin UDPGT, 4-Hydroxibifenil UDPGT, Oestrone UDPGT, Peptidases, Aminopectidase N, Aminopectidase A, Aminopectidase P, peptidase de Dipeptidil IV, b-Casomorphin, enzima convertendo Angiotensina, Carboxipeptidase P Angiotensina II,

15 Endopeptidase-24.11, Endopeptidase-24.18 Angiotensina I, Substância P (deamidado), Exopeptidase, 1. Término NH₂ Aminopectidase N (EC 3.4.11.2), Aminopectidase A (EC 3.4.11.7), Aminopectidase P (EC 3.4.11.9), Aminopectidase W (EC 3.4.11.-), Dipeptidil peptidase IV (EC 3.4.14.5), g-Glutamila transpeptidase (EC 2.3.2.2), 2. COOH término de enzima convertendo Angiotensina (EC 3.4.15.1), Carboxipeptidase P (EC 3.4.17. -),

20 Carboxipeptidase M (EC 3.4.17.12), 3. Dipeptidase dipeptidase de Microsomal (EC 3.4.13.19), peptidase de Gly-Leu, Zinco peptidase estável, Endopeptidase Endopeptidase-24.11 (EC 3.4.24.11), Endopeptidase-2 (EC 3.4.24.18, hidrolase de PABA-peptide, Meprin, Endopeptidase-3, Endopeptidase (EC 3.4.21.9), GST A1-1, Alfa, GST A2-2 Alfa, GST M1a-1a Mu, GST M1b-1b Mu, GST, M2-2 Mu, GST M3-3 Mu, GST M4-4 Mu, GST M5-5 Mu, GST P1-1 Pi, GST T1-1 Teta,

25 GST T2-2 Teta, Microsomal Leucotrieno C4 sintase, isozimas de UGT, UGT1.1, UGT1.6, UGT1.7, UGT2.4, UGT2.7, UGT2.11, Elastase, Aminopectidase (aminopectidase de dipeptidil (IV), Cimotoripsina, Tripsina, Carboxipeptidase A, Metiltransferases, O-metiltransferases, N-metiltransferases, S-metiltransferases, Catecol-O-metiltransferases, MN-metiltransferase, S-sulfotransferases, Mg²⁺-ATFase, fator de Crescimento de receptores de fosfatase Alcalino,

30 ATFases, Na, K⁺-ATFase, Ca²⁺-ATFase, aminopectidase de Leucine, K⁺canal.

Atividade metabólica medido é realizada empregando técnicas conhecidas na técnica, tal como, por exemplo, contatando-se as células com um composto de teste e sobrenadante coletado. Os metabólitos do presente composto no sobrenadante são medidos empregando técnicas conhecidas, tal como por um tipo apropriado de cromatografia líquida de alto

35 desempenho (HPLC). Timidina incorporada através de células como hepatócitos cultivada pode ser medida para avaliar proliferação de célula *in vitro*. Veja também, Handbook de Drug Metabolism Ed. Thomas Woolf, informa Healthcare; 29 de março de 1999.

A média de culturas de célula, isto é, sobrenadantes de cultura é geralmente coletado e armazenado às -30°C. até analisado. Após remoção do sobrenadantes de cultura, as placas de cultura podem ser enxaguadas 3 vezes com salina tamponada por fosfato (PBS) e reservado para determinação de proteína através de métodos conhecidos, por exemplo, Hayner e outros 1982, Tissue Culture Methods 7:77-80.

A presente invenção também fornece métodos para o tratamento de dano do fígado. A esse respeito, as células como hepatócitos diferenciado da invenção podem ser empregados para o tratamento de qualquer doença causando ou contribuindo ao dano de fígado, incluindo porém não limitado a, abscesso hepático amebiano, hepatite autoimune, atresia biliar, cirrose, coccidioidomicose; disseminada, agente de delta (Hepatite D), colestasia induzido droga, hemocromatose, Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, carcinoma de hepatocelular, câncer de fígado, doença do fígado devido a álcool, cirrose biliar primária, abscesso hepático piogênico, a síndrome de Reye, colangite esclerosante e a doença de Wilson.

A presente invenção fornece métodos para o tratamento de dano do fígado administrando-se a um indivíduo em necessidade destes, uma quantidade efetiva das células como hepatócitos diferenciados da invenção. Através de quantidade efetiva é significada uma quantidade suficiente para fornecer um efeito benéfico ao receber individual o tratamento, tal como uma quantidade para melhorar sintomas de doença/dano do fígado e/ou para melhorar função do fígado. Em certas modalidades, uma quantidade efetiva é uma quantidade suficiente para recrescimento de funcionamento de fígado. Os sintomas de doença do fígado incluem, porém não são limitados a, icterícia (amarelando de olhos e pele), coceira severa, urina escura, confusão mental ou coma, vomitando de sangue, contundindo fácil e tendência para sangrar, banco de cor de argila ou cinza, e formação anormal de fluido no abdômen.

Um "tratamento terapêutico" é um tratamento administrado a um indivíduo que exhibe sinais de patologia para o propósito de diminuir ou eliminar esses sinais.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece métodos para melhorar ou restabelecer função do fígado administrando-se uma quantidade efetiva das células como hepatócitos diferenciados da invenção. A esse respeito, célula como hepatócitos são diferenciados empregando métodos como descrito aqui, de matriz de cordão umbilical humana de um paciente individual para autóloga (em situações onde células apropriadas podem ter sido colhidas células e armazenadas na hora de nascimento) ou transplantação de alogênico para um recipiente de tecido compatível de acordo com os métodos descritos aqui. As células são cultivadas como descrito aqui, colhidas, e pode ser introduzida no baço, circulação, e/ou peritônio de um paciente em sofrimento de doenças do fígado degenerativas de qualquer origem, secundário a infecção viral, ingestão de toxina, ou erros metabólicos inatos, etc. Sempre que possível, guiado radiologicamente, métodos invasivos minimamente são empregados para implantar as células. As células geneticamente planejadas com enzimas

codificadas de genes para melhorar função hepática são também contempladas aqui.

Em uma modalidade particular, as células como hepatócitos da presente invenção são administradas a um sofrimento individual um transplante de fígado.

As células como hepatócitos da presente invenção podem ser administradas qualquer um somente, ou como uma composição farmacêutica em combinação com diluentes e/ou com outros componentes tais fatores de crescimento de hepatócitos ou outros hormônios ou populações de célula. Brevemente, composições da presente invenção podem compreender uma população de célula como hepatócitos como descrito aqui, em combinação com um ou mais portadores farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitáveis, diluentes ou excipientes. Tais composições podem compreender tampões tais como salina tamponada neutra, salina tamponada por fosfato e outros; carboidrato tal como glicose, manose, sacarose ou dextranas, manitol; proteínas; polipeptídeos ou aminoácidos tal como glicina; antioxidantes; agentes de quelação tal como EDTA ou glutathione; adjuvantes (por exemplo, hidróxido de alumínio); e preservativos. As composições da presente invenção podem formular para intravenoso ou administração parenteral ou para administração diretamente no fígado.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas de certa maneira apropriadas para a doença a ser tratada (ou prevenir). A quantidade e frequência de administração será determinada por tal fatores como a condição do paciente, e o tipo e severidade da doença do paciente, embora dosagens apropriadas possam ser determinadas através de tentativas clínicas.

Quando “uma quantidade efetiva”, ou “quantidade terapêutica” é indicada, a quantidade precisa das composições da presente invenção a ser administrada pode ser determinada por um médico com consideração de diferenças individuais em idade, peso, doença, extensão de infecção ou dano de fígado, e condição do paciente (indivíduo). Em certas modalidades, uma composição farmacêutica compreendendo as células descritas aqui pode ser administrada a uma dosagem de 10^3 a 10^7 peso corporal de células/kg e em certas modalidades, 10^5 a 10^6 peso corporal células/kg, incluindo todos os valores de número inteiro dentro dessas faixas. As composições de célula como hepatócitos pode também ser tempo múltiplo administrado a estas dosagens. A ótima dosagem e regime de tratamento para um paciente particular sejam determinados por aquele versado na técnica de medicina monitorando-se o paciente para sinais de doença e ajustando o tratamento adequadamente.

A administração das composições sujeita pode ser realizada em qualquer maneira conveniente, incluindo por injeção, transfusão, implantação ou transplantação. As composições descritas aqui podem ser administradas para um paciente subcutaneamente, intradermicamente, intratumoralmente, intranodalmente, intramedular, intramuscularmente, através de intravenoso (i.v.) injeção, ou intraperitonealmente. Em uma modalidade, as composições de célula como hepatócitos da presente invenção são administradas a um

paciente por intradermal ou injeção subcutânea. Em outra modalidade, as composições de célula como hepatócitos da presente invenção são administradas por i.v. injeção. As composições de células como hepatócitos pode ser injetado diretamente no fígado.

Em outra modalidade, a composição farmacêutica pode ser liberada em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade, uma bomba pode ser empregada (veja Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald e outros, 1980; *Surgery* 88:507; Saudek e outros, 1989, *N., Engl. J. Med.* 321:574). Em outra modalidade, materiais poliméricos podem ser empregados (veja *Medical Applications de Controlled Release*, 1974, Langer e Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla.; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design e Performance*, 1984, Smolen e Ball (eds.), Wiley, Nova Iorque; Langer e Peppas, 1983; *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; veja também Levy e outros, 1985, *Science* 228:190; During e outros, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard e outros, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Em outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado em proximidade do alvo terapêutico, desse modo requerendo somente uma fração da dose sistêmica (veja, por exemplo, *Medical Applications de Controlled Release*, 1984, Langer e Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., vol. 2, pp. 115-138).

As composições de célula da presente invenção podem também ser administradas empregando qualquer número de matrizes. As matrizes foram utilizadas durante vários anos dentro do contexto de planejamento de tecido (veja, por exemplo, *Principles de Tissue Engineering* (Lanza, Langer, e Chick (eds.)), 1997. A presente invenção utiliza tais matrizes dentro do contexto moderno de agir como um fígado artificial para apoiar, mantém, ou função do fígado modulado. Consequentemente, a presente invenção pode utilizar essas composições matriz e formulações que tem demonstrado utilidade em planejamento de tecido. Consequentemente, o tipo de matriz que pode ser empregada nas composições, dispositivos e métodos da invenção é virtualmente ilimitado e pode incluir ambas matrizes biológicas e sintéticas. Em um exemplo particular, as composições e dispositivos apresentados pela Patente U.S. Nos: 5,980,889; 5,913,998; 5,902,745; 5,843,069; 5,787,900; ou 5,626,561 são utilizados. As matrizes compreende características geralmente associado com ser biocompatível quando administrado a um hospedeiro mamífero. As matrizes podem ser formadas de ambos os materiais naturais ou sintéticos. As matrizes podem ser não biodegradáveis nos exemplos onde é desejável para estruturas permanentes deixada ou estruturas removíveis no corpo de um animal, tal como um implante; ou biodegradável. As matrizes podem levar a forma de esponjas, implantes, tubos, almofadas de telfa, fibras, fibras ocas, componentes liofilizado, géis, pós, composições porosas, ou nanopartículas. Além disso, as matrizes podem ser designadas para permitir as células semeadas liberação contínua ou produzir citocina ou outro agente ativo. Em certas modalidades, a matriz da presente invenção é flexível e elástica, e pode ser descrito como uma sustentação semi-sólido que é permeável a substâncias tal como sais inorgânicos,

fluidos aquosos e agentes gasosos dissolvidos incluindo oxigênio.

Uma matriz é empregada aqui como um exemplo de uma substância de biocompatível. Entretanto, a invenção atual não é limitada a matrizes e desse modo, sempre que o termo matriz ou matrizes apresentam estes termos devem ser lidas para incluir dispositivo e outras substâncias que permitem a retenção celular ou passagem celular, são biocompatíveis, e são capazes de permitir passagem de macromoléculas ou diretamente através da substância tal que a própria substância é uma membrana semi-permeável ou empregada junto com uma substância semi-permeável particular.

Em certas modalidades da presente invenção, as composições de célula como hepatócitos são administradas a um indivíduo junto com (por exemplo, antes de, simultaneamente ou seguindo) qualquer número de modalidades de tratamento relevante, incluindo porém não limitado a tratamento com agentes tal como agentes antiviral, quimioterapia, radiação, agentes imunossupressores, tal como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, e micofenolato.

Em uma modalidade adicional, as composições de célula da presente invenção são administradas a um paciente junto com (por exemplo, antes de, simultaneamente ou seguindo) um transplante de fígado.

A dosagem dos tratamentos acima a ser administrado a um paciente variará com a natureza precisa da condição sendo tratada e o recipiente do tratamento. A escala de dosagens para administração humana pode ser realizada de acordo com as práticas aceitada na técnica.

Exemplos

Exemplo 1

Diferenciação hepática de Células-tronco de matriz de cordão umbilical Humanas

Este exemplo descreve a diferenciação de células-tronco de matriz de cordão umbilical humano em célula como hepatócitos.

As células matriz de cordão umbilical foram isoladas de cordões umbilicais como segue: os cordões umbilicais foram obtidos do termo infantil de acordo com a Universidade de Kansas Human Subjects Approval. A matriz de cordão umbilical humano (HUCM) células foram desenvolvidos do tecido de cordão umbilical que foi processado da maneira seguinte: o cordão foi preparado para processar enxaguando-se em uma 1000 mL de béquer contendo aproximadamente 500 mL de 95% de etanol ou quantidade suficiente para revestir completamente o cordão, durante 30 segundos. O cordão foi então ardida até o etanol dissipado, então lavado 2X, durante 5 minutos, em PBS estéril resfriado (500 mL). A seguir, o cordão foi submergido em 500 mL de solução Betadina 1X durante 5 minutos seguidos enxaguando-se completamente 2X durante 5 minutos com PBS estéril resfriado (500 mL) para remover o Betadina. O cordão foi então cortado em pedaços de ~5 cm. Quando o pedaço de cordão foi completamente dissecado e limpo de sangue com PBS, foi colocado no tubo de 50

ml ou 100 mm de placa de cultura de tecido contendo 40U/mL de hialuronidase/0,4mg/mL solução de colagenase durante 30 minutos em uma incubadora umedecida 37°C com 5% de CO₂. O pedaço digerido de seção de cordão foi então colocado em um coador de célula esterilizado e mão de almofariz com uma peneira de malha instalada 40. O aparato foi então
 5 colocado em um estéril de 100 mm da Placa de Petri, e 5-10 mL de Média Definidas (DM) foi adicionado que contém: 58% de baixa glicose DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), 40% MCDB201 (Sigma, St. Louis, MO), 1X de insulina-transferrina-selênio-A (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,15 g/mL AlbuMAX I (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 NM de dexametasona (Sigma, St., Louis, MO), 100 µM de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, St., Louis, MO), 100 U de penicilina,
 10 1000 U de estreptomicina (Mediatech, Inc., Herdon, VA), 2% de soro bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 ng/mL de fator de crescimento da epiderme (EGF) (R & D Systems, Minneapolis, MN), e 10 ng/mL de plaqueta-derivado de fator de crescimento BB (PDGF-BB) (R & D Systems, Minneapolis, MN).

O tecido é triturado e estendido através de um coador com uma mão de almofariz até
 15 a maioria do tecido tendo perdido sua estrutura e o fluido foi coletado com um 10 mL de pipetar. A amostra foi então centrifugada a 750 RCF (x g) durante 10 minutos. A média foi aspirada a média sendo cuidadoso não para perturbar pélete. A pélete foi re-suspenso no volume apropriado de DM para obter a faixa desejada onde controle de antimicrobial foi obtido. A preparação de célula diluída foi então semeada em placas de 6-cavidades ou outro recipiente
 20 de cultura de tecido como apropriado. As células foram colocadas em uma incubadora umedecida de 37°C com 5% de CO₂ e esquerda imperturbado durante ~24 horas. 24–48 horas após isolamento, células non-aderentes eram afastadas lavando três vezes com PBS estéril. Fresco DM foi mudado cada dois dias. Quando cultiva confluência de entre 50-80% foi alcançado as células que usaram 0,05% mM de tripsina/0,53 nM de solução de EDTA e re-
 25 banhado em um frasco de cultura T25 para expansão adicional em DM. As culturas foram mantidas a confluência estabelecida (50-80%) para propagação. As culturas foram mantidas em uma incubadora umedecida de 37°C com 5% de CO₂ e foram reabastecida com DM fresco cada 2-3 dias.

Os HUMCs isolados foram mostrados para ser multipotencialial e diferenciado em
 30 osteócitos, condrócitos, adipócitos e células como neuronal. Isto foi mostrado através de fotomicrografia. Estas células sem igual também foram também mostradas para expressar cKit de marcadores de celua-tronco, actina de músculo liso, neurônio específico de enolase (NSE), e neurofilamento M (NFM). Veja também Publicação de Pedido de Patente US No. 20040136967.

35 O protocolo de diferenciação foi uma adição sequencial de fatores de endógeno. Antes da indução, as células foram semeadas em 0,1% de gelatina revestida T75 frascos cultivas a uma densidade de 2,0-3,0E06 células/frasco e permitiram para aderir durante a noite. As células

foram então tratadas durante dois dias em média de pré-indução consistindo de: Soro de IMDM livre (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 ng/ml de fator de crescimento da epiderme humano recombinante (rhEGF) (R & D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante (rhbFGF) (Chemicon, Temecula, CA), e Pen/Etapa.

- 5 Diferenciação foi realizado empregando um processo de duas etapas onde células foram cultivadas durante 7 dias em média de diferenciação contendo: Meio de Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM), 20 ng/ml fator de crescimento de hepatócitos humano recombinante (rhHGF) (Chemicon, Temecula, CA), 10 de ng/ml rhbFGF, 0,61 g/L de nicotinamida (Sigma, St., Louis, MO), 2% de FBS, Pen/Etapa. As células foram então cultivadas em média de maturação até 10
- 10 semanas contendo: IMDM, 20 ng/ml de Oncostatina M Humano (Biossource, Camarillo, CA), 1 umol/L de dexametasona, 50 mg/ml de ITS+ pré-mistura (Sigma, St., Louis, MO), 2% de FBS, e Pen/Etapa. Média foi alterada cada três dias e diferenciação hepática foi avaliada em uma maneira temporal.

Os métodos seguintes foram empregados para avaliar diferenciação nas células:

- 15 *Imunocitoquímica.* As células diferenciadas foram fixas com 4% de paraformaldeído em PBS durante 10 min e então lavarada em PBS. As células foram permeadas com 0,2% de Tritão X-100 em PBS durante 5 min, lavada e então bloqueada em 0,2% de Tritão X-100, 2% de soro normal em PBS durante 1 h, e então incubada com anticorpos a alfa 1 fetoproteína (AFP), citoceratina 18 (CK18), citoceratina 19 (CK19), glutamina sintetase (GS), fator nuclear
- 20 4 alfa hepatócitos (HNF4 α), Nanog, actina de músculo liso (SMA), Fator Von Willebrand (VWF) (1:100, Abcam, Cambridge, MA). Após lavar três vezes com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário (1:200, Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Eugene, Oregon). As imagens foram obtidas com um microscópio de varredura Zeiss laser 510 sob 63X de lente de óleo-imersão, ou Nikon Eclipse TE 2000U com Cool SNAPcf (Photometrix) máquina fotográfica
- 25 empregando software de imagem MetaMorph.

Isolamento de RNA e Reação de Cadeia de Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR.): RNA foi isolado de células em colunas de giro Rápido RNeasy (Qiagen, Valença, CA) e convertido a cDNA empregando hexâmeros aleatório e Sobrescrito II transcriptase inversa (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR foi realizado empregando um BioRad I-Cycler. Um indicador

30 de lista é fornecido na Tabela 1 abaixo. Os produtos foram resolvidos através de 2% de eletroforética de gel de agarose e visualizados por brometo de etídio manchado. A expressão de numerosos genes específicos de hepatócitos foi analisada, incluindo CK18, citoceratina 18; HNF3 - β , fator nuclear hepatócitos 3 β ; CK19, citoceratina 19; AFP, fetoproteína alfa; Alb, albumina; e CYP2B6, citocromo P450 2 família.

35 Tabela 1

Indicador Empregado Para RT-PCR

Gene	Sequência	Tamanho de produto (bp)	SEQ ID NÃO:
AFP	F 5'-TGC AGC CAA AGT GAA MORDAÇA GGA AGA-3 '	216	1
	5'-GATO DE R MORDAÇA DE AGC CAG CCC AAA GAA GAA-3 '		2
CAR	F 5'-GAC CAG ATC TCC CTT CTC AAG-3 '	305	3
	R 5'-CTC AGG CTC TTG MORDAÇA CTG CAG-3 '		4
CK-19	F 5'-ATG MORDAÇA de GCC CAG AAC CGG AA-3 '	328	5
	R 5'-CCA TGA GCC GCT GGT ATO CC-3 '		6
CYP2B6	F 5'-GAC GCT ACG TTT CAG TCT TTC-3 '	204	7
	R 5'-GCT GAA TAC CAC GCC ATA G-3 '		8
CYP3A4	F 5'-TTC CTA AGG ATO TCT GCT TTG C-3 '	333	9
	R 5'-TGT GGA GGA AAT TAT TGA GAA ATG-3 '		10
GAPDH	F 5'-ACC AGT GGA TGC AGG GAT-3 '	470	11
	R 5'-TCA ACG GCA CAG TGA AGG-3 '		12
HNF3- β	F 5'-TAT TGG CTG CAG CTA AGC GG-3 '	508	13
	R 5'-GAC TCG GAC TCA GGT MORDAÇA GT-3 '		14
HNF4- α	F 5'-CCA AGT ACA TCC CAG CTT TC-3 '	295	15
	R 5'-TTG GCA TCT GGG TCA AAG-3 '		16
PEPCK	F 5'-TCT GCC AAG GTC ATC CAG G-3 '	290	17
	R 5'-GTT TTG GGG ATG GGC ATO G-3 '		18
PGC-1	F 5'-GGC ACG CAG TCC TAT TCA TT-3 '	800	19
	R 5'-ACA MORDAÇA de GGG AAT TTC GGT G-3 '		20
PPAR- γ	F 5'-AGA CCA CTC CCA CTC CTT TG-3 '	129	21
	R 5'-AGG TCA TAC TTG TAA TCT GC-3 '		22
PXR	F 5'-CAA GCG GAA GAA AAG TGA ACG-3 '	442	23
	R 5'-CTG GTC CTC GAT GGG CAA GTC-3 '		24
β -actina	F 5'-TGA ATO GGC TGA CTG CTG TG-3 '	174	25
	5'-GATO DE R CCT TGG CCT CAG GATO AG-3 '		26

Captação celular de Indocianina Verde (ICG): ICG foi dissolvido a uma concentração inicial de 5 mg/mL em solvente. A solução foi então diluída a 1 mg/mL em média de maturação e adicionado a placa de cultura e incubada às 37°C em uma incubadora umedecida a 5% de CO₂ durante 10-15 minutos. As células foram lavadas completamente com PBS estéril e então visualizadas sob um microscópio claro. Após exame, o PBS foi então removido e média de maturação foi adicionado e as células incubadas às 37°C em uma incubadora umedecida a 5%

de CO₂ durante ~4-6 horas para confirmar eliminação de ICG.

Captação celular de Lipoproteína de Baixa-densidade (LDL): Dil-Ac-LDL foi diluído em média de maturação a 10 µg/mL, adicionado as células, e incubado durante 4 horas às 37°C em uma incubadora umedecida. Após incubação, média foi removido contendo o Dil-Ac-LDL e as células foram lavadas 2X com média de maturação de sonda-livres. As células foram visualizadas empregando excitação de rodamina padrão: as células foram comparadas as culturas positivas e negativas para propósitos de comparação.

Periódico Ácido-Schiff (PAS) Manchando e Tratamento de Diástase: as células foram lavadas 2X com PBS e fixo com 4% de paraformaldeído durante 10 minutos, lavada 1X PBS, e permeada com 0,1% de Tritão-X100 dissolvida em PBS durante 5 minutos. As células foram incubadas com 0,2 g/40 mL de diástase às 37°C durante 1 hr para digestão de glicogênio. As células foram então oxidadas em 1% de ácido periódico durante 5 minutos; enxaguado 3X com PBS, então tratado com o reagente de Schiff durante 15 minutos e enxaguado 3X com PBS. As células foram contador-manchadas com H&E durante 1 minuto e lavado completamente com PBS. As amostras foram imaginadas sob um microscópio claro.

Imunomanchamento: as células foram lavadas 2X com PBS gelado (Cellgro, solução salina tamponada por Fosfato de Dulbecco w/o magnésio e cálcio) Placas de cultura de tecido foram sujeitados para tampão de lise gelado (Sigma, CellLytic™-MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent, C-3228) e coquetel de inibidor de protease (Sigma, Protease Inhibidor Cocktail, P-8340). As células foram removidas de frascos de cultura de tecido raspando e transferidas a um tubo de microfogo. As células foram então passadas através de uma agulha de medida 27, e então centrifugadas a 14,000 rpm em microfogo durante 10 minutos às 4°C. O sobrenadante foi analisado para proteína com método de BCA. Ao sobrenadante, 4X de amostra de tampão foi adicionado e incubado às 85°C durante 30 minutos. Os lisados foram separados em 4-20% de gel de SDS-poliacrilamida (Pierce, 4-20% Precise™ Protein Gels, 25244) e transferido a PVDF (Pierce, 88518.) para manchar ocidental: AFP, Albumina, CK18, CK19, SMA (Abcam, Cambridge, MA), peroxidase de raiz-forte conjugado anti-cabra de coelho (Invitrogen, 81-1620), ou anti-coelho de cabra (Invitrogen, 62-6120) foi empregado às 1:20,000 para detecção com o sistema Oeste Notável Super Pico quimioluminescência (Pierce, 34077.)

Fenobarbital, Rifampicina, Forscolina, e Tratamento de 8-Br-cAMP de Células Diferenciadas: as células diferenciadas foram tripsinado e semeada em placas de 6-cavidades em uma densidade semeando de 10,000 a 20,000 células/cm² empregando média de maturação e permiti aderir durante a noite. Os citocromos foram induzidos através de tratamento com; Rifamicina (RIF), 20µm; Penobarbital (PB), 2mM; forskolina, 50uM; 8-Bromo-cAMP, 1mM (Tocris, Ellisville, MO); e veículo de controle durante período de 24-hora. mRNA foi então colhido analisado por RT-PCR.

Citometria de fluxo: as células HUCM às 1x10⁶ células/mL foram fixos com metanol

às 4°C durante 5 min e bloqueado com PBS e 5% de albumina de soro bovino às 4°C durante 1 h. as células foram incubadas com 1µg/mL de anticorpos primários às 4°C durante 1 h. as células foram lavadas três vezes com PBS e então incubada com conjugado de FITC secundário apropriado (1:100, anti-rato de cabra, anti-cabra de burro, anti-coelho de cabra, Sondas Moleculares, Eugene, Oregon) durante 30 min em gelo. As células foram lavadas duas vezes em PBS e analisada empregando um citômetro de fluxo de FACSCalibur (Beckman Coulter, Miami, FL). Dez mil células (nenhuma comutação) foram coletado e analisado no canal FL1. Todas as análises foram com base em células de controle (incubada com qualquer isótipo IgG específico ou conjugado respectivo secundário somente) para estabelecer o sinal de fundo.

Resultados:

Após 4 semanas em média de hepatogênico, as células UCM foram mostradas por imunofluorescente manchado para expressar albumina e α FP como comparado para controlar células UCM cultivadas em média de controle. HUMCs desenvolve em média de controle não tem expressão aumentada de albumina de dois a quatro semanas. As células diferenciadas expressam produção de albumina mais elevada comparada a células não diferenciada a duas semanas, e ainda mais expressa a quatro pós-indução de semanas α FP não estava presente em HUMCs não diferenciada. Após quatro semanas, as células diferenciadas mostram produção de α FP na região de perinuclear. Actina de músculo liso (SMA) foi bem estruturado em HUMCs não diferenciado. A quatro semanas, SMA foi mais desorganizado nas células induzidas hepáticas. HUMCs induzido também desenvolve uma forma mais poligonal, similar a células de hepatocelular, e perde a morfologia de fuso de células-tronco não diferenciada.

HUMCs sofrem alterações morfológicas sob condições de hepatogênico: HUMC tipicamente foi submetido altera morfológica durante o protocolo de diferenciação. Estas alterações foram localizadas para avaliar a eficácia dos fatores de crescimento diferentes que foram aplicados. As células foram tipicamente miofibroblastos bipolar bi-nucleado não formam colônias ou grupos antes de Pré-indução. Quando as células forem cultivadas em média de pré-indução, proliferação de célula parada, porém mantendo sua morfologia geral. A indução e maturação, as células foram principalmente mononucleares e heterogêneas com núcleo elevado para relação citoplásmica. As células diferenciadas foram mais poligonais a foram de cubo e exibem inclusões de gota de lipídio. As células não empilharam porém não formam canicular tipo estruturas que podem ser observadas sem um microscópio. Fase-contraste (DIC) fotomicrografia de células diferenciadas mostram alterações morfológicas de células HUCM. As células como hepatócitos diferenciados sob condições de diferenciação de hepatogênico desenvolvido que apresentado como sinusóides a 4 semanas pós-indução.

Análise funcional de células HUCM diferenciadas (Glycogen, ICG, e LDL-uptake): HUMC derivado de células como hepatócitos adquiriu propriedades funcionais (produção de glicogênio.) Glicogênio é uma amostra polissacarídeo de intracitoplásmico encontrado em

abundância nas células do fígado. Para demonstrar armazenamento de glicogênio, as células diferenciadas foram manchadas com PAS. A mancha positiva para glicogênio foi mostrada em células diferenciadas porém não em células não diferenciada sugerindo a capacidade de armazenamento de glicogênio encontrada em células de parenquimatoso de fígado.

5 (Demonstração de glicogênio PAS manchando foi encontrado em células diferenciadas, porém não mostrada em células não diferenciadas.) Glicogênio pode ser digerido através de diástase em condições de cultura de célula. Para demonstrar glicogênio positivo manchando células diferenciadas foram pré-tratadas com solução de Diástase e nenhuma mancha positiva para glicogênio foi observado.

10 A captação celular de tintura de aniônico, ICG, foi examinada diferenciada e não diferenciada HUMCs para determinar função hepática. As células positivas ICG não foram observadas em células não diferenciadas. ICG manchando foi observado em células diferenciadas já em 1 semana com a maior quantidade de mancha positiva. A concentração de 1 mg/mL de ICG, nenhum efeito adverso foi observado. Como um controle, linhagem de célula
15 Hep G2 foi empregada, e observada a ter manchando ICG positivo. ICG foi clareado de células após re-aplicação de média de maturação.

As células do fígado expressam nos receptores LDL para regulamento de homeóstase de colesterol em mamíferos. Para determinar se as células diferenciadas exibem captação celular de LDL, células foram tratadas com Dil-Ac-LDL. As células diferenciadas exibem mais
20 baixos níveis de manchar quando mostrada cedo na fase de pós-indução que em recente pós-indução onde a incorporação de LDL foi aumentada.

Imunomanchamento e análise de RT-PCR de células de HUCM induzidas revelam expressão temporal padrão (perfil) de genes específicos de hepatócitos e proteínas: níveis de expressão de proteína de CK18 e alfa-fetoproteína permanece cerca de mesmo durante o curso
25 de diferenciação onde albumina aumenta duas a quatro semanas pós-indução. CK19 diminuindo em expressão através de duas semanas pós-indução.

Análise de RT-PCR mostra alfa-fetoproteína detectada ao longo do curso de diferenciação. HNF3 β foi detectado já em uma semana pós-indução. A expressão de CYP2B6 foi detectada tão tarde quanto quatro semanas pós-indução e CK-19 diminuindo após duas
30 semanas pós-indução. Estes resultados indicam a maturação de célula como hepatócitos, onde o aparecimento tão cedo quanto para recentes marcadores é visto, que é consistente com uma célula diferencianda.

Análise de RT-PCR da expressão de marcadores induzíveis quatro semanas pós-indução: as células diferenciadas que foram tratadas com qualquer fenobarbital (PB),
35 rifampicina (RIF), 8-Bromoadenosina-3', Adenosina Monofosfato 5'-cíclico (8-Br-cAMP) ou forskolina mostraram vários genes de hepatócitos induzíveis ou um aumento em níveis de expressão. O receptor de androstano constitutivo (CAR), pregnane X receptor (PXR), co-

ativador 1α de receptor γ ativado por prolíderadores de peroxissoma (PGC-1) co-ordinadamente regulam enzimas em metabolismo de droga e gliconeogênese. Fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) e receptor- γ ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ), são enzimas de gluconeogênico fundamentais. CYP3A4 um citocromo P450 (CYP) Fase I de monooxigenases de enzima de sistema importante para endo - e metabolismo xenobiótico. Hepatócitos fator 4α nuclear (HNF4 α) é um regulador de transcrição de mestre para lipídio e série de metabólicos de glicose. Estes genes ou mostraram expressão elevada nas células como hepatócitos diferenciados ou foram induzidos nestas células em tratamento com PB, RIF, 8-Br-cAMP ou forskolina. As células diferenciadas expressaram estes genes hepatócitos específicos de uma maneira tempo-dependente. Além disso, estes marcadores não foram previamente mostrados a ser expressos em células diferenciadas na linhagem de hepatócitos de outros tipos de células-tronco (veja por exemplo, Lee OK, e outros Blood. 2004;103(5):1669-1675; Yamada T, e outros Stem Cells. 2002;20(2):146-154; Wang e outros, Transpl. 2005 Junho;11(6):635-43; Hong SH, e outros, Biochemical e Biophysical Research Communications. 2005;330(4):1153-1161).

Imunocitoquímica manchando verificam diferenciação hepática: para confirmar expressão de marcadores de hepatogênico nos examine o HUMCs diferenciado por mancha Imunocitoquímica. As células foram desenvolvidas em deslizamentos de câmara de 8-cavidades, fixo e manchado com poli - ou anticorpos de monoclonal contra CK18, citoceratina 18; HNF4 - α , fator 4α nuclear hepatócitos; CK19, citoceratina 19; AFP, fetoproteína alfa; GS, glutamina sintetase; VWF, Fator Von Willebrand; Nanog; SMA, actina de músculo liso, e Alexa Fluor 488 anticorpos secundários. O núcleo de célula foi manchado com TO-PRO -3 e imaginado com um microscópio de Zeiss confocal a 40X power. A análise de Imunofluorescência mostra que células diferenciadas mancham para; CK18, HNF4 α , AFP, GS, vWF, e mancham negativa para CK19 e Nanog. SMA ainda persiste em células diferenciadas porém em um baixo nível que não diferenciado. A visão aumentada do núcleo mostrado localização de HNF4 α . Estes resultados indicaram que os marcadores de hepatogênico aumentaram e correlacionado com proteína e expressão de mRNA.

Citocromos são diferencialmente expressos durante célula HUUCM de diferenciação: 2 mM tratamento de PB às quatro semanas de diferenciação de induzir PXR, HNF4 α , e CYP3A4. Os níveis de expressão de CAR e PGC-1 aumentam e PPAR- γ permanece o mesmo. 25 μ M RIF tratamento induzido PEPCK, PXR, HNF4 α , e CYP3A4.

Desse modo, este exemplo demonstra que células UCM cultivadas como descrito aqui diferenciado em células características de hepatócitos específicas mostradas incluindo morfológicas, fenotípicas e características como hepatócitos funcionais.

Exemplo 2

Diferenciação hepática de células-tronco matriz de cordão umbilical Humanas empregando camada celular de cevador de Hepatócitos

Este exemplo mostra a diferenciação hepática de células HUCM co-cultura seguinte em uma camada de cevador compreende células HB8065 de choque térmico, uma linhagem de célula carcinoma de hepatocelular.

As células UCM foram isoladas de cordão umbilical como previamente descrito (veja, por exemplo, Publicação de Pedido de Patente US. No. 20040136967). As células foram semeadas em uma membrana porosa em um suplemento de Trans-cavidades. O suplemento de Trans-cavidades criado na cultura um compartimento superior, uma membrana microporosa (no suplemento) e um compartimento mais baixo. As células HUCM foram semeadas na membrana porosa em DMEM, 2% de FBS e com a camada cevador hepatócitos HB8065 de choque térmico no compartimento mais baixo. As células HUCM de controle foram cultivadas em DMEM com 2% de FBS somente. A diferenciação foi avaliada por imunofluorescência, RT-PCR e química de proteína.

Co-cultura de HUCM com uma camada de cevador de hepatócitos aumenta a presença de proteínas específicas de hepatócitos (albumina e α FP) e conduz a expressão mais desorganizada de SMA.

Os resultados de PCR mostram que albumina foi fortemente expressa na linhagem de célula carcinoma de hepatocelular empregado como a camada de cevador, e expressa fracamente em células HUCM não diferenciadas bem como no controle de diferenciação. Isto correlata com resultados de imunocitoquímica, onde albumina foi descrita em níveis baixos em células de não diferenciado. Este gene continua a ser expressa ao longo da experiência de diferenciação, e mostra sinais de intensidade aumentada levemente, especialmente em 4 semanas de pós-indução. Beta-actina foi empregada como um controle positivo para PCR, e estava presente em todas as células.

Desse modo, a linhagem de célula HB8065 produz fatores suficientes para induzir diferenciação hepática de células HUCM.

Todas as Patentes U.S. acima, Publicações de Pedido de Patente U.S, Pedidos de Patente U.S, Patentes estrangeiras, Pedidos de Patente estrangeiros e Publicações de não Patente referidos nesta especificação e/ou listado na Folha de Dados de Aplicação, incluindo porém não limitado a Pedido de Patente Provisório U.S. No. 60/817,251, são incorporados aqui por referência, na sua totalidade.

Do anteceder isto será apreciado que, embora modalidades descritas da invenção tem sido descrito aqui para propósitos de ilustração, varias modificações podem ser feitas sem desviar do espírito e escopo da invenção. Consequentemente, a invenção não está limitada exceto como pelas reivindicações anexadas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

< 110 > a Universidade de Kansas

Mitchell, Kathy E.

Hoynowski, Steven M.

< 120 > DIFERENCIAÇÃO DE TRONCO DE MATRIZ DE CORDÃO UMBILICAL EM
CÉLULAS DA LINHAGEM HEPATÓCITO

< 130 > 120157.418PC

< 140 > PCT

<141> 28-06-2007

< 150 > US 60/817.251

<151> 28-06-2006

<160> 26

< 170 > FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 24

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR

<400> 1

gtgaagaggg de tgcagccaaa aaga

24

<210> 2

<211> 24

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR

<400> 2

agcccaaaga de catagcgagc agaa

24

<210> 3

<211> 21

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR

<400> 3

cccttctcaa gaccagatct g

21

<210> 4
 <211> 21
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 4 21
 tggagctgca ctcaggctct g
 <210> 5
 <211> 20
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 5 20
 atggccgagc agaaccggaa
 <210> 6
 <211> 20
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 6 20
 ccatgagccg ctggtactcc
 <210> 7
 <211> 21
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 7 21
 ttcagtcttt gacgctacgt c
 <210> 8
 <211> 19
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 8	19
gctgaatacc acgccatag	
<210> 9	
<211> 22	
< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 9	22
cttctgcttt ttctaagga gc	
<210> 10	
<211> 24	
< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 10	24
attattgaga tgtggaggaa aatg	
<210> 11	
<211> 18	
< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 11	18
accagtggat gcagggat	
<210> 12	
<211> 18	
< 212 > DNA	
213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 12	18
tcaacggcac agtgaagg	
<210> 13	
<211> 20	

< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 13	20
tattggctgc agctaagcgg	
<210> 14	
<211> 20	
< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 14	
gactcggact caggtgaggt	20
<210> 15	
<211> 20	
< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 15	20
ccaagtacat cccagcttct	
<210> 16	
<211> 18	
< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 16	18
ttggcatctg ggtcaaag	
<210> 17	
<211> 19	
< 212 > DNA	
< 213 > Sequência artificial	
<220>	
< 223 > iniciador empregado para RT-PCR	
<400> 17	19

tctgccaagg tcatccagg

<210> 18

<211> 19

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR

<400> 18

19

gttttgggga tgggcactg

<210> 19

<211> 20

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR

<400> 19

20

ggcacgcagt cctattcatt

<210> 20

<211> 19

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR

<400> 20

19

acaggggaga atttcggtg

<210> 21

<211> 20

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>

< 223 > iniciador empregado para RT-PCR

<400> 21

20

agaccactcc cactccttg

<210> 22

<211> 20

< 212 > DNA

< 213 > Sequência artificial

<220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 22 20
 aggtcactact tgtaatctgc
 <210> 23
 <211> 21
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 23 21
 aaaagtgaac caagcggaag g
 <210> 24
 <211> 21
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 24 21
 atgggcaagt ctggtcctcg c
 <210> 25
 <211> 20
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 25 20
 tgaactggct gactgctgtg
 <210> 26
 <211> 20
 < 212 > DNA
 < 213 > Sequência artificial
 <220>
 < 223 > iniciador empregado para RT-PCR
 <400> 26 20
 catccttggc ctcagcatag

REIVINDICAÇÕES

1. Método para diferenciar as células da matriz do cordão umbilical em células do tipo hepatócito, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a. contatar as células da matriz do cordão umbilical com meio de Pré-Indução;

b. contatar as células da matriz do cordão umbilical com meio de Diferenciação; e

c. contatar as células da matriz do cordão umbilical com meio de Maturação;

por um tempo suficiente para diferenciar as células da matriz do cordão umbilical em células do tipo hepatócito.

2. Método para avaliar a toxicidade de um componente *in vitro*, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a. contatar uma célula do tipo hepatócito diferenciada de células da matriz do cordão umbilical, conforme definida na reivindicação 1, com tal componente; e

b. medir a viabilidade da dita célula do tipo hepatócito, em que um decréscimo na viabilidade na presença do componente em comparação com a viabilidade na ausência do componente indica que o componente é tóxico *in vivo*.

3. Método para avaliar a atividade de um componente *in vitro*, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a. contatar uma célula do tipo hepatócito metabolicamente ativa diferenciada de células da matriz do cordão umbilical, conforme definida na reivindicação 1, com tal componente; e

b. medir a atividade metabólica da dita célula do tipo hepatócito, em que um decréscimo ou aumento na atividade metabólica na presença do componente em comparação com a atividade na ausência do componente indica que o componente tem atividade *in vivo*.

4. Método para avaliar a atividade de um componente *in vitro*, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

a. contatar uma primeira célula do tipo hepatócito metabolicamente ativa diferenciada de células da matriz do cordão umbilical, conforme definida na reivindicação 1, com tal componente para gerar uma célula supernatante; e

b. contatar uma segunda célula do tipo hepatócito metabolicamente ativa diferenciada de células da matriz do cordão umbilical, conforme definida na reivindicação 1, com a célula supernatante; e

c. medir a atividade metabólica da segunda célula do tipo hepatócito, em que um decréscimo ou aumento na atividade metabólica na presença de supernatante em comparação com a atividade na ausência de supernatante indica que o componente tem atividade *in vivo*.

5. Método para avaliar a toxicidade de um componente *in vitro*, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

a. contatar uma primeira célula do tipo hepatócito metabolicamente ativa diferenciada de células da matriz do cordão umbilical, conforme definida na reivindicação 1, com tal componente para gerar uma célula supernatante; e

b. contatar uma segunda célula do tipo hepatócito metabolicamente ativa diferenciada de células da matriz do cordão umbilical, conforme definida na reivindicação 1, com a célula supernatante; e

c. medir a viabilidade da segunda célula do tipo hepatócito, em que um decréscimo da viabilidade na presença de supernatante em comparação com a viabilidade na ausência de supernatante indica que o componente é tóxico *in vivo*.

6. Método para avaliar a atividade de um componente *in vitro*, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a. colocar em contato uma célula diferenciada tipo hepatócito com células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com o referido composto; e

b. medir a expressão de um gene de citocromo P450 na célula tipo hepatócito, onde um aumento ou diminuição na expressão do gene de citocromo P450, na presença do referido composto comparado com aquela na ausência do referido composto, indica que o referido composto tem atividade *in vivo*.

7. Método para avaliar a atividade de um composto *in vitro*, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a. colocar em contato uma primeira célula diferenciada do tipo hepatócito metabolicamente ativa de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com o referido composto para gerar uma célula supernatante; e

b. colocar em contato uma segunda célula diferenciada do tipo hepatócito metabolicamente ativa de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com o referido composto para gerar uma célula supernatante; e

c. medir a expressão de um gene de citocromo P450 na referida segunda célula do tipo hepatócito, onde um aumento ou diminuição na expressão do gene de citocromo P450, na presença do referido supernatante comparado com aquela na ausência do referido supernatante, indica que o referido composto tem atividade *in vivo*.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão do gene do citocromo P450 é medida usando a reação em cadeia da polimerase.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão do gene do citocromo P450 é medida pela medição da atividade enzimática.

10. Método para determinação de interações com medicamentos,

CARACTERIZADO pelo fato de que compreende:

colocar em contato uma primeira célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um primeiro composto;

colocar em contato uma segunda célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um segundo composto;

colocar em contato uma terceira célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um primeiro e um segundo composto;

medir a expressão da primeira, segunda e terceira célula do tipo hepatócito, onde um aumento ou diminuição na atividade metabólica da terceira célula do tipo hepatócito, quando comparada à primeira ou segunda célula do tipo hepatócito, ou ambas indicam interação ao medicamento.

11. Método para determinação de interações com medicamentos,

CARACTERIZADO pelo fato de que compreende:

colocar em contato uma primeira célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um primeiro composto;

colocar em contato uma segunda célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um segundo composto;

colocar em contato uma terceira célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um primeiro e um segundo composto;

medir a viabilidade da primeira, segunda e terceira célula do tipo hepatócito, onde um aumento ou diminuição na viabilidade da terceira célula do tipo hepatócito, quando comparada à primeira ou segunda célula do tipo hepatócito, ou ambas indicam interação ao medicamento.

12. Método para determinação de interações com medicamentos,

CARACTERIZADO pelo fato de que compreende:

colocar em contato uma primeira célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um primeiro composto;

colocar em contato uma segunda célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um segundo composto;

colocar em contato uma terceira célula diferenciada do tipo hepatócito de células da matriz do cordão umbilical, de acordo com a reivindicação 1, com um primeiro e um segundo composto;

medir a expressão de um gene do citocromo P450 na primeira, segunda e terceira célula do tipo hepatócito, onde um aumento ou diminuição na expressão do gene do citocromo P450 na terceira célula do tipo hepatócito quando comparada a primeira ou a segun-

da célula do tipo hepatócito ou ambos indica uma interação com medicamento.

13. Método para melhorar ou restaurar a função do fígado em um indivíduo em necessidade desta, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo em necessidade desta uma população de células do tipo hepatócito diferenciada das células da matriz do cordão umbilical, conforme definido na reivindicação 1.

14. Método para tratar cirrose do fígado em um indivíduo em necessidade deste, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma população de células do tipo hepatócito diferenciada das células da matriz do cordão umbilical, conforme definido na reivindicação 1.

15. Método para tratar danos no fígado **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo que tem danos no fígado uma população de células do tipo hepatócito diferenciada das células da matriz do cordão umbilical, conforme definido na reivindicação 1.

16. Método para tratar hepatite, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo que tem danos no fígado uma população de células do tipo hepatócito diferenciada das células da matriz do cordão umbilical, conforme definido na reivindicação 1.

17. Painel de células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende pelo menos duas células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical onde as pelo menos duas células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical são derivadas de diferentes sujeitos, e onde as células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical estão separadas uma da outra.

18. Painel, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os diferentes sujeitos são geneticamente diferentes.

19. Painel, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os sujeitos são de sexos diferentes.

20. Painel, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as pelo menos duas células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical são separadas uma da outra em uma placa com múltiplos poços.

21. Painel, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o painel compreende pelo menos três diferentes células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical.

22. Painel, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende pelo menos quatro diferentes células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical.

23. Painel, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que

o painel compreende entre 5 e 100 diferentes células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical.

24. Kit de varredura de fármaco, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o painel conforme definido na reivindicação 17 e pelo menos um reagente para medir atividade enzimática ou expressão genética de pelo menos um citocromo P450.

25. Kit de varredura de fármaco, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende pelo menos um meio para cultivar as células do tipo hepatócito derivadas da matriz do cordão umbilical.

26. Método para diferenciação de células da matriz do cordão umbilical das células do tipo hepatócito, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a. semear células da matriz do cordão umbilical em uma placa de cultura revestida com tecido gelatinoso;

b. contatar as células da matriz do cordão umbilical com um meio de Pré-Indução compreendendo 10-30 ng/ml de fator de crescimento de epiderme humana recombinante e 5-15 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante;

c. contatar as células da matriz do cordão umbilical com um meio de Diferenciação compreendendo pelo menos 10-30 ng/ml de fator de crescimento de hepatócito humano recombinante, 5-15 ng/ml rhbFGF e 0,5-1 ng/ml de nicotinamida; e

d. contatar as células da matriz do cordão umbilical com um meio de Maturação compreendendo 10-30 ng/ml de Oncostatina M humana, 0,5-1,5 umol/L de dexametasona e 30-70 mg/ml de ITS+premix;

por um tempo suficiente para diferenciar as células da matriz do cordão umbilical das células do tipo hepatócito.

RESUMO

“DIFERENCIAÇÃO DE TRONCO DE MATRIZ DE CORDÃO UMBILICAL EM CÉLULAS DA LINHAGEM HEPATÓCITO”

A invenção refere-se a métodos para diferenciação de células de matriz do cordão umbilical em células do tipo hepatócito e composições e métodos para usar tais células do tipo hepatócito.