



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 005**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/407 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00968708 .8**
96 Fecha de presentación : **03.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1325112**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54 Título: **Métodos de aislamiento de células progenitoras hepáticas bipotentes.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

73 Titular/es: **University of North Carolina
308 Bynum Hall, CB 4105
Chapel Hill, North Carolina 27, US**

72 Inventor/es: **Kubota, Hiroshi y
Reid, Lola, M.**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 367 005 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

1. CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a marcadores de superficie celular novedosos que distinguen células hepáticas de células hematopoyéticas. En particular, la invención se refiere a métodos de aislamiento de células progenitoras hepáticas bipotentes con un fenotipo único que incluye células que son negativas para el antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I clásico, positivas para la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), y positivas amortiguadas ("dull positive") para antígeno(s) del MHC de clase I no clásico. Además, la invención se refiere a las células progenitoras hepáticas y células madre hepáticas producidas mediante los métodos de la invención.

2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

La identificación de poblaciones de células progenitoras multipotentes en tejidos de mamífero es importante tanto para intereses clínicos como comerciales y también para comprender los procesos de desarrollo y la homeostasia tisular. Las poblaciones de células progenitoras son dianas ideales para la terapia génica, el trasplante de células y para la ingeniería tisular de órganos bioartificiales (Millar, A.D. 1992 Nature 357, 455; Langer, R. y Vacanti, J.P. 1993 Science 260, 920; Gage, F.H. 1998 Nature 392, 18).

La existencia de células progenitoras o células madre "determinadas", específicas de tejido que tienen alto potencial de crecimiento y/o pluripotencialidad es fácilmente evidente a partir de estudios sobre células madre hematopoyéticas (Spangrude *et al.* 1988 Science 241, 58), células madre neuronales (Davis, A.A., y Temple, S. 1994 Nature 372, 263; Stemple, D.L., y Anderson, D.J. 1992 Cell 71, 973) y células madre epidérmicas (Jones, P.H., y Watt, F.M. 1993 Cell 73, 713), habiéndose identificado cada una mediante clonación mediante el uso de métodos particulares apropiados para ese tejido. Se consideran que estas células progenitoras son las células responsables de la homeostasia tisular hematopoyética, neuronal o epidérmica normal y de respuestas regenerativas tras lesión grave (Hall, P.A., y Watt, F.M. 1989 Development 106, 619).

El hígado de un mamífero adulto tiene una tremenda capacidad para recuperarse tras o bien lesión hepatotóxica extensa o bien hepatectomía parcial (Fishback, F.C. 1929 Arch. Pathol. 7, 955); (Higgins, G.M., y Anderson, R.M. 1931 Arch. Pathol. 12, 186), pese a que el hígado es normalmente un tejido quiescente sin renovación rápida. Se ha interpretado que los datos de estudios recientes en ratón sugieren que las células parenquimatosas de adulto tienen un crecimiento casi ilimitado potencialmente al someterse a ensayo mediante experimentos de trasplante en serie (Overturf *et al.* 1997 Am. J. Pathol. 151, 1273); (Rhim, J.A. *et al.* 1994 Science 263, 1149). Estos experimentos usan poblaciones de células de hígado heterogéneas lo que limita la capacidad para demostrar el crecimiento potencial observado derivado de células parenquimatosas de adulto, a partir de una subpoblación de células parenquimatosas de adulto y/o de células no parenquimatosas (es decir, células progenitoras). Además, los estudios no muestran evidencia de diferenciación epitelial biliar, puesto que los huéspedes usados tenían o bien transgenes de albúmina-urocinasa, o bien, en el otro caso, una deficiencia en enzima catabólica de tirosina; ambos tipos de huéspedes tienen condiciones que se seleccionan para el linaje hepatocítico. Por tanto, el ensayo no pudo someter a prueba poblaciones de células bipotentes.

Varios estudios histológicos establecen que las células hepáticas tempranas de fetos a mitad de gestación tienen una bipotencialidad de desarrollo para diferenciarse en epitelio de conducto biliar así como en hepatocitos maduros (Shiojiri, N. 1997 Microscopy Res. Tech. 39,328-35). El desarrollo hepático comienza en el endodermo del intestino anterior ventral inmediatamente después de que el epitelio del endodermo interacciona con el mesodermo cardiogénico (Douarin, N. M. 1975 Medical Biol. 53, 427); (Houssaint, E. 1980 Cell Differ. 9, 269). Este comportamiento hepático se produce en el día embrionario (E) 8 en el ratón. La fase inicial del desarrollo hepático se hace evidente con la inducción de ARNm de alfa-fetoproteína y albúmina sérica en el endodermo y antes de los cambios morfológicos (Gualdi, R. *et al.* 1996 Genes Dev. 10, 1670). En E 9,5 de la gestación del ratón, las células especificadas proliferan entonces y penetran en el mesénquima del septo transversa con una forma de tipo cuerda, formando el primordio hepático. Aunque la masa del hígado aumenta entonces drásticamente, el aumento en masa se debe en buena parte a las células hematopoyéticas, que colonizan el hígado fetal en E10 en el ratón (Houssaint, E. 1981 Cell Differ. 10, 243) e influyen sobre las células hepáticas para mostrar una forma extremadamente distorsionada e irregular (Luzzatto, A.C. 1981 Cell Tissue Res. 215, 133). De manera interesante, los datos recientes de ratones mutantes con direccionamiento genético indican que la afectación de varios genes ha conducido a insuficiencia hepática letal, apoptosis y/o necrosis de células parenquimatosas entre E12 y E15 (Gunes, C. *et al.* 1998 EMBO J. 17, 2846; Hilberg, F. *et al.* 1993 Nature 365, 1791; Motoyama, J. *et al.* 1997 Mech. Dev. 66, 27; Schmidt, C. *et al.* 1995 Nature 373, 699). Especialmente, las alteraciones genéticas que forman parte de la cascada activada por estrés (Ganiatsas, S. *et al.* 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6881; Nishina, H. *et al.* 1999 Development 126, 505) o la cascada anti-apoptótica (Beg, A. *et al.* 1995 Nature 376, 167; Li, Q. *et al.* 1999 Science 284, 321; Tanaka, M. *et al.* 1999. Immunity 10, 421) pueden dar como resultado hepatogénesis gravemente afectada, pero no hematopoyesis, pese a la amplia expresión del gen inactivado. No está claro si las células hepáticas son intrínsecamente sensibles a los estímulos de estrés en el desarrollo o si el microentorno particular en el hígado fetal por sí mismo produce tales efectos destructivos (Doi, T.S. *et al.* 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2994). Por otra parte, la arquitectura básica del hígado adulto depende de la aparición del cilindro inicial del epitelio del conducto biliar que rodea a la vena porta (Shiojiri, N. 1997 Microscopy Res. Tech. 39, 328).

Desde el punto de vista inmunohistológico, el primer signo de la diferenciación de las células epiteliales del conducto biliar intrahepático es la expresión de la citoqueratina (CK) específica biliar. Las proteínas CK, las proteínas del filamento intermedio (FI) citoplasmático de las células epiteliales, se codifican por una familia de múltiples genes y se expresan de una manera específica de tejido y diferenciación (Moll, R. *et al.* 1982 Cell 31, 11). CK19 es uno de los marcadores biliares más notables, puesto que los hepatocitos adultos no expresan CK19 en absoluto, mientras que las células epiteliales biliares adultas sí expresan esta proteína. CK8 y CK18 sólo se expresan desde las células hepáticas tempranas hasta los hepatocitos adultos (Moll, R. *et al.* 1982 Cell 31, 11). En E15.5 en el desarrollo de rata, que corresponde a E14 en el ratón, los precursores biliares se tiñen intensamente por anticuerpos tanto frente a CK18 como frente a CK8, y algunos precursores biliares expresan CK19. A medida que avanza el desarrollo, los conductos biliares que están madurando expresan gradualmente CK7 además de CK19 y pierden la expresión de albúmina (Shiojiri, N. *et al.* 1991 Cancer Res. 51, 2611). Aunque se cree que las células hepáticas ya en E13 en la rata constituyen una población homogénea, todavía queda por comprobar si todas las células hepáticas tempranas pueden diferenciarse en el linaje de células epiteliales biliares, y cómo se determinan sus destinos. No se han realizado estudios de marcaje de linaje definitivos, tales como los que usan vectores retrovirales, para células hepáticas, y no se han identificado las condiciones de cultivo de clones necesarias para la demostración de cualquier célula progenitora hepática bipotente.

Para los análisis del crecimiento clonal, un obstáculo principal es la expansión explosiva de las células hematopoyéticas, que afecta a la capacidad de observar la expansión *ex vivo* de células hepáticas. Por tanto, debe usarse un proceso de enriquecimiento para la población hepática. Aunque se han investigado en detalle marcadores de superficie para poder fraccionar las células hematopoyéticas en hígado fetal (Dzierzak, E. *et al.* 1998 Immunol. Today 19, 228-36), los de las células progenitoras hepáticas todavía están poco definidos, puesto que los estudios están todavía en las primeras fases (Sigal, S. *et al.* 1994 Hepatology 19, 999). Además, las condiciones de proliferación *ex vivo* usadas normalmente para las células de hígado adultas dan como resultado su desdiferenciación con pérdida de funciones específicas de tejido tal como la expresión de albúmina (Block, G. D. *et al.* 1996 J. Cell Biol. 132, 1133). Una capacidad algo mejorada para sintetizar ARNm específico de tejido y capacidad para regular genes específicos de tejido completamente tras la transcripción sólo se produce en células de hígado mantenidas en ausencia de suero y con una mezcla definida de hormonas, factores de crecimiento y/o con ciertos componentes de la matriz extracelular (Jefferson, D. M. *et al.* 1984. Mol. Cell. Biol. 4, 1929; Enat R, *et al.* 1984, 81, 1411). Sin embargo, las células hepáticas fetales en proliferación mantienen la expresión de tales proteínas séricas *in vivo*.

Además de las células progenitoras hepáticas, el hígado fetal en muchas especies contiene células progenitoras hematopoyéticas. Las células progenitoras hematopoyéticas y las células hematopoyéticas expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en sus superficies. La nomenclatura del MHC no se ha normalizado completamente. Por tanto, el antígeno del MHC de clase I clásico también puede designarse del MHC de clase Ia o MHC de clase IA. De manera similar, el antígeno del MHC de clase I no clásico también puede designarse del MHC de clase Ib o MHC de clase IB.

Entre el trabajo con antígenos del MHC, la patente estadounidense N.º 5.679.340 concedida a Chappel reivindica la modificación de antígenos de la superficie celular incluyendo el MHC mediante la unión de anticuerpos a dos epítopos antigénicos. Por el contrario, Chappel no enseña que puedan usarse el MHC y otros antígenos para el aislamiento de células progenitoras.

Otros han intentado hacer crecer hepatocitos *in vitro*. La patente estadounidense N.º 5.510.254 concedida a Naughton *et al.* reivindica que el cultivo de hepatocitos depende de una estructura tridimensional de material biocompatible pero no vivo. Por tanto, existe una necesidad no satisfecha de condiciones de cultivo sin ninguna estructura artificial y que proporcionen la condición para que las células progenitoras hepáticas se expandan y crezcan en cultivo. Además, existe una necesidad no satisfecha de métodos de clonación de células progenitoras hepáticas con capacidad de diferenciación biopotencial, en los que las células serían adecuadas para su uso como componente de un hígado bioartificial, para someter a prueba hepatotoxinas y para el desarrollo de fármacos, entre otros usos.

La patente estadounidense N.º 5.559.022 concedida a Naughton *et al.*, reivindica células de reserva de hígado que se unen a eosina Y, un colorante que se usó para caracterizar las "células de reserva". La patente estadounidense N.º 5.559.022 no usa marcadores bien establecidos para la identificación de las células de reserva de hígado, ni proporciona métodos para la expansión clonal de células de reserva, ni proporciona marcadores mediante los cuales aislar células de reserva de hígado viables. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de métodos para aislar y cultivar células que tengan muchas características esenciales para las células progenitoras hepáticas, incluyendo la expresión de marcadores específicos y la posibilidad de diferenciarse o bien en hepatocitos o bien en células biliares. Igualmente son necesarios métodos para el crecimiento clonal de las células progenitoras hepáticas. El crecimiento clonal es esencial como distinción e identificación clara y rigurosa de células progenitoras hepáticas pluripotentes.

Los presentes inventores han reconocido lo inadecuado de hacer crecer células de hígado maduro, tales como hepatocitos, en lugar de las células progenitoras hepáticas mucho más útiles. Han definido cuidadosamente los parámetros de aislamiento para las células progenitoras hepáticas y los requisitos para el crecimiento clonal. Las células progenitoras y los métodos para seleccionar y poner en cultivo las células progenitoras tienen muchos usos, incluyendo utilidad en medicina para el tratamiento de pacientes con insuficiencia hepática, y utilidad para la evaluación de agentes de toxicidad, y utilidad para la evaluación de fármacos.

3. SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de aislamiento de células progenitoras bipotentes hepáticas en el que las células no expresan el antígeno del MHC de clase I clásico (antígeno del MHC de clase Ia) y sí expresan el antígeno ICAM-1. Además, la célula progenitora bipotente hepática puede expresar opcionalmente antígeno(s) del MHC de clase I no clásico (antígeno del MHC de clase Ib) que contienen el epítipo monomórfico del MHC de clase I. Pueden usarse células progenitoras de varios tejidos, incluyendo pero sin limitarse a, hígado. Por tanto, la invención se refiere a un método de aislamiento de células progenitoras hepáticas que son negativas para el MHC de clase I clásico y, opcionalmente, positivas para ICAM-1. Asimismo, la presente invención se refiere a un método de aislamiento de células progenitoras, en el que las células expresan el fenotipo de positivas para ICAM-1 pero negativas para el MHC de clase I clásico, eliminando las células que expresan el fenotipo positivas para el MHC de clase I clásico. La expresión amortiguada del MHC de clase I no clásico puede usarse para el aislamiento adicional de las células progenitoras. Preferiblemente, la invención se refiere a un método de aislamiento y clonación de células progenitoras pluripotentes hepáticas. Las células progenitoras pluripotentes hepáticas pueden ser de especies de vertebrados incluyendo peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, y más preferiblemente de mamíferos. Incluso más preferiblemente, las células progenitoras pluripotentes hepáticas tienen como origen primates, cerdos, ratas, conejos, perros o ratones. Lo más preferiblemente, las células progenitoras pluripotentes son de origen humano. El método mucho más preferible produce células progenitoras hepáticas que son células progenitoras hepáticas bipotentes. Por tanto, las células progenitoras hepáticas bipotentes pueden diferenciarse, o su progenie puede diferenciarse, o bien en hepatocitos, o bien en células biliares.

Puede obtenerse una población de células enriquecida en células progenitoras mediante un método de obtener en primer lugar una suspensión de células de vertebrado. Luego, posteriormente en cualquier orden, o de manera sustancialmente simultánea, las células que expresan al menos un antígeno del MHC de clase Ia y las que expresan el antígeno ICAM-1, se eliminan de la suspensión de células para proporcionar una mezcla de células enriquecida en células progenitoras. Del mismo modo, puede obtenerse una mezcla de células madre embrionarias de vertebrado que está enriquecida en células progenitoras hepáticas proporcionando una célula madre embrionaria de vertebrado, expandiendo la célula madre embrionaria para producir una progenie de células madre embrionarias y aislando la progenie de células madre embrionarias que expresan el antígeno ICAM-1 y no expresan el antígeno del MHC de clase Ia.

En la invención están incluidos todos los métodos de separación mediante medios de cultivo celular, inmunológico y físico conocidos en la técnica. Los métodos de separación incluyen específicamente las inmunoseparaciones. Las inmunoseparaciones pueden ser citometría de flujo tras interacción con un anticuerpo marcado. Los métodos de inmunoseparación también incluyen métodos de afinidad con anticuerpos unidos a perlas magnéticas, perlas biodegradables, perlas no biodegradables, a superficies de selección incluyendo placas, y combinaciones de estos métodos.

Además, las células madre bipotentes y progenitoras hepáticas, y su progenie, pueden expresar opcionalmente otros fenotipos, incluyendo, pero sin limitarse a alfa-fetoproteína, albúmina, una dispersión lateral superior a la de las células hematopoyéticas de hígado fetal, o un patrón de crecimiento como células que se apilan.

Las células madre hepáticas son células que podrían expresar o no alfa-fetoproteína o albúmina pero que dan lugar a células que expresan alfa-fetoproteína y albúmina o marcadores biliares tales como CK19.

La invención también se refiere a un método para la identificación de células progenitoras, preferiblemente células progenitoras hepáticas, exponiendo las células de hígado a un medio de detección de un fenotipo de MHC de clase I en combinación con expresión de ICAM-1, e identificando aquellas células dentro de la población que no expresan antígeno del MHC de clase I clásico. Asimismo, pueden detectarse otros marcadores de fenotipos hepáticos o de célula progenitora tales como alfa-fetoproteína.

La invención se refiere adicionalmente a células progenitoras y madre hepáticas, y a su progenie, caracterizadas por un fenotipo de negativas para el MHC de clase I clásico y positivas para ICAM-1, células que pueden expresar opcionalmente otros fenotipos, incluyendo, pero sin limitarse a positivas amortiguadas para el MHC de clase I no clásico, una dispersión lateral superior a la de las células progenitoras hematopoyéticas, o un patrón de crecimiento como células que se apilan. La progenie puede expresar alfa-fetoproteína, albúmina, o CK 19. La progenie de las células progenitoras y madre hepáticas así aislada puede conservar el fenotipo parenteral y opcionalmente puede desarrollar y expresar fenotipos adicionales. En particular, las células de progenie pueden expresar opcionalmente el fenotipo de hepatocito y el fenotipo de célula biliar. Entre otras características, el fenotipo de hepatocito se caracteriza por la expresión de albúmina. Entre otras características, el fenotipo de célula biliar se caracteriza por la expresión de CK 19.

La composición de las células progenitoras hepáticas, de su progenie, o de una combinación de las células progenitoras y su progenie también puede comprender células que expresan débilmente al menos un antígeno del MHC de clase Ib, muestran una dispersión lateral superior en citometría de flujo a la de las células no parenquimatosas, y expresan un polipéptido que consiste en alfa-fetoproteína, albúmina, CK 19, o combinaciones de los mismos. La

composición puede derivarse de endodermo o médula ósea. En esta composición, el tejido de endodermo puede ser hígado, páncreas, pulmón, intestino, tiroides, gónada, o combinaciones de los mismos.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Las figuras 1A-1C son una caracterización de líneas de células hepáticas a partir de hígado de rata fetal de 15 días.

Las figuras 2A-2F son un ensayo de formación de colonias sobre células alimentadoras.

Las figuras 3A-3X son una expresión de antígenos de la superficie celular de rata en diversas líneas de células hepáticas en células de hígado adultas.

Las figuras 4A1-4D4 representan el análisis fenotípico de hígados de rata fetales en E13.

10 Las figuras 5A-5D son una caracterización de colonias hepáticas en ausencia y presencia de EGF.

Las figuras 6A-6B representan la inducción de la expresión de CK19 en células hepáticas RT1A¹.

La figura 7 es una representación esquemática de la formación de colonias hepáticas en células alimentadoras STO5.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

15 La presente invención es un procedimiento para el aislamiento de células progenitoras y una composición que comprende células progenitoras. En una realización, la invención es un procedimiento para la identificación, el aislamiento y el crecimiento clonal de células madre hepáticas y de las células progenitoras hepáticas. El procedimiento implica exponer poblaciones mixtas de células derivadas de un tejido de endodermo tal como hígado a anticuerpos específicos para ICAM-1, una proteína de adhesión, y antígeno del MHC de clase I clásico, un antígeno que caracteriza a las células hematopoyéticas y a la mayoría de otras células nucleadas pero que está sustancialmente ausente en la superficie celular de las células madre hepáticas y las células progenitoras apropiadas. Las células pueden proceder de cualquier tejido endodérmico, incluyendo pero sin limitarse a hígado, páncreas, pulmón, intestino, tiroides, gónada, o de un hígado o de un organismo completo. Es aceptable cualquier método de aislamiento de células madre hepáticas y otras células progenitoras hepáticas tempranas, incluyendo mediante interacciones basadas en afinidad, por ejemplo, selección por afinidad, por inmunocirugía en combinación con complemento o con citometría de flujo. La separación por citometría de flujo también puede basarse en los niveles intermedios de expresión de antígeno, por ejemplo de antígenos del MHC de clase I no clásico. Aún en una realización más preferida, el procedimiento implica, además, seleccionar las células que muestran dispersión lateral (SSC) relativamente alta, un parámetro dependiente de la granularidad o de la cantidad de gotitas de lípidos citoplasmáticos, una característica de las células hepáticas. La SSC en las células progenitoras hepáticas es superior a la de otras células no parenquimatosas, tales como las células hematopoyéticas o las células estromales en hígado fetal, pero inferior que en las células parenquimatosas maduras tales como las de hígado adulto. Además, pueden usarse otros marcadores expresados en células progenitoras positivas para alfa-fetoproteína (AFP), tales como CD34, CD38, CD14, y/o CD117, en el aislamiento de células progenitoras bipotentes. Asimismo, pueden usarse otros marcadores para la eliminación de células progenitoras no hepáticas, incluyendo, pero sin limitarse a antígeno de glóbulos rojos (tal como glicoforina A en glóbulos rojos en hígado humano), receptores de Fc de inmunoglobulina, antígenos del MHC de clase II, marcadores de tipo ABO, CD2, CD3, CD4, CD7, CDB, CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD15, CD16, CD19, CD20, CD28, CD32, CD36, CD42, CD43, CD45, CD56, CD57, CD61, CD74, CDw75. Además, pueden usarse otras técnicas conocidas en la técnica como componentes de procedimientos usados para aislar células progenitoras, incluyendo, pero sin limitarse a: técnicas ablativas incluyendo ablación láser, separación por densidad, separación por velocidad de sedimentación incluyendo centrifugación zonal, elutriación de células, adherencia selectiva, determinación del peso molecular incluyendo determinación del peso celular con sales de tetrazolio, cribado por tamaños, propagación selectiva, inhibición metabólica selectiva incluyendo el uso de citotoxinas, y separación por múltiples factores.

45 En una realización preferida de la invención, las células progenitoras se obtienen de un feto, un niño, un adolescente o un adulto.

Una realización preferida de la presente invención es que las células hepáticas se hacen crecer selectivamente en un medio definido, complementado con hormonas, libre de suero. Además se prefiere que las células hepáticas se hagan crecer selectivamente el cultivo usando una capa de células alimentadoras, en la que esas células alimentadoras son fibroblastos u otro derivado de célula mesodérmica. Se prefiere que las células alimentadoras sean células alimentadoras humanas, de primate no humano, de cerdo, rata o ratón, pero es aceptable cualquier célula alimentadora de mamífero, ave, reptil, anfibio o pez. Aún una realización más preferida es que las células alimentadoras sean células embrionarias, aunque son aceptables células alimentadoras de tejido neonatal o adulto. Una realización aún más preferida es que las células alimentadoras se clonen y se seleccionen para determinar su capacidad para soportar células progenitoras y madre hepáticas. Todavía una realización más preferida de la invención es que las células progenitoras y madre hepáticas se hagan crecer en cultivo en condiciones de crecimiento, permitiendo de ese modo la identificación como células hepáticas y la expansión de una población de origen clonal.

Una realización preferida de la invención comprende células progenitoras hepáticas de mamífero que son negativas para el MHC de clase I clásico y positivas para ICAM-1. Una clasificación de dos colores es un método conveniente para aislar las células bipotentes: positivas para ICAM-1 y negativas para el MHC de clase I clásico son dos parámetros para definir estas células. Las poblaciones de células positivas para ICAM-1 incluyen células hematopoyéticas, mesequimatosas y hepáticas maduras. El grado de expresión es bastante variable dependiendo del estado de las células (por ejemplo, es diferente en células en un estado activado o quiescente). El antígeno del MHC de clase I clásico se expresa en todas las células hematopoyéticas nucleadas desde las células madre a las células maduras y en los hepatocitos maduros (aunque los hepatocitos maduros tienen menos expresión que las células hematopoyéticas). En hígado fetal de rata, las células negativas para el MHC de clase I clásico incluyen: células progenitoras bipotentes hepáticas, eritrocitos maduros enucleados, y una población de células no identificada. Además, las células pueden expresar el MHC de clase I no clásico. Además, la progenie de células progenitoras puede expresar alfafetoproteína, albúmina, o CK19 y también puede mostrar una característica de crecimiento en la que las células crecen unas sobre otras, es decir, en agrupaciones.

Una realización de la invención es que las células progenitoras aisladas tienen capacidad para dividirse y producir progenie. Además se prefiere que las células progenitoras puedan producir más de aproximadamente diez ciclos mitóticos. Todavía es más preferido que la progenie sean células progenitoras o hepatocitos y células biliares. Una realización preferida de la presente invención es que las células progenitoras y madre hepáticas aisladas se conviertan en un linaje de hepatocitos o células biliares mediante la aplicación selectiva de factor de crecimiento epidérmico (EGF).

En una realización preferida, el procedimiento implica seleccionar células que expresan adicionalmente alfafetoproteína y se unen a un anticuerpo específico para alfa-fetoproteína. En otra realización preferida, el procedimiento implica seleccionar células que, además, sintetizan albúmina y se unen a un anticuerpo específico para albúmina.

Todavía una realización más preferida de la presente invención es que las células progenitoras y madre aisladas se usan como un componente de un hígado extracorpóreo. Una realización más preferida adicional de la presente invención es que el hígado extracorpóreo tiene células progenitoras y madre aisladas y su progenie se usa para mantener con vida a un paciente que padece disfunción o insuficiencia hepática.

La invención da a conocer condiciones de cultivo particulares que son necesarias para la expansión *ex vivo* de células progenitoras hepáticas, demostradas en este caso a partir de feto. Los inventores seleccionaron sublíneas de células embrionarias STO de ratón que demostraron ser ideales como células alimentadoras. Las células alimentadoras se usaron en combinación con un medio definido hormonalmente (HDM) novedoso, libre de suero. La combinación permitió a los inventores establecer diversas líneas de células hepáticas fetales de rata a partir de hígado en E15 en la rata sin transformación maligna de las células. El inventor da a conocer el uso de las líneas de células hepáticas y el sistema de co-cultivo HDM-STO para el desarrollo de un ensayo de formación de colonias (CFA) *in vitro* para definir el crecimiento clonal potencial de células progenitoras hepáticas aisladas recientemente de tejido de hígado. El CFA, cuando se combina con células clasificadas mediante un perfil citométrico de flujo definido, revela células progenitoras bipotentes hepáticas. Por ejemplo, las células progenitoras de hígados de rata en E13, que corresponde a E11.5 en el ratón, y con alto potencial de crecimiento tienen el fenotipo negativo para MHC de clase I clásico (región RT1A en la rata), positivas amortiguadas para OX18 (epítipo monomórfico en antígenos del MHC de clase I), y positivas para ICAM-1. El fenotipo de negativas para RT1A y positivas amortiguadas para OX18 es equivalente a positivas amortiguadas para el MHC de clase I no clásico (MHC de clase Ib). En esta invención se da a conocer que el EGF influye tanto en el crecimiento de las colonias progenitoras como en sus destinos como o bien hepatocitos o bien células epiteliales biliares.

6. EJEMPLOS

Glosario

Antígeno del MHC de clase I clásico. El grupo de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad se encuentra comúnmente en su mayor parte en todas las células nucleadas, aunque se expresan más altamente en las células hematopoyéticas. El antígeno también se conoce como MDHC de clase Ia. La nomenclatura de estos antígenos del MHC clásico va en función de la especie, por ejemplo en seres humanos, los antígenos del MHC se denominan HLA. La tabla 3 proporciona la nomenclatura de los antígenos del MHC clásico en varias especies.

Antígeno del MHC de clase I no clásico. El grupo de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, también conocido como MHC de clase Ib, que puede variar incluso dentro de una especie. La nomenclatura de los antígenos del MHC no clásico varía según la especie, véase, por ejemplo, la tabla 4.

ICAM. La molécula de adhesión intercelular-1 (CD54) es una glucoproteína de membrana y un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Los ligandos para ICAM-1 son la β 2-integrina, LFA-1 (CD11a/CD18) y Mac-1 (CD11b/CD18). Esta molécula también es importante para la unión de los leucocitos al endotelio. Además ICAM-1 desempeña un papel en la extravasación de leucocitos. El término ICAM-1 se usa para designar la forma de estas moléculas encontrada en mamíferos. Los términos ICAM o de tipo ICAM-1 se usan para designar las proteínas homólogas y funcionalmente relacionadas en vertebrados no mamíferos.

Reducción. La reducción es un procedimiento de eliminación de poblaciones de células principales de una suspensión de células. En hígado fetal, las principales células de linaje no hepático son los glóbulos rojos, macrófagos, monolitos, granulocitos, linfocitos, megacariocitos, células estromales progenitoras hematopoyéticas.

5 *Positivas amortiguadas.* En la citometría de flujo activada por fluorescencia, la intensidad de la luz emitida es proporcional al número de moléculas de inmunoglobulina conjugada con fluorocromo unidas a la célula que, a su vez, es proporcional a la densidad del antígeno de la superficie celular en estudio. Puesto que la densidad de superficie o la densidad intracelular de antígenos puede variar desde unos pocos hasta cientos de miles por pocillo, puede medirse un amplio intervalo de intensidades de fluorescencia. El valor de positivas amortiguadas (o amortiguadas) se determina empíricamente y es intermedio entre la intensidad de las células que fluorescen de manera brillante con muchos antígenos y las células tenues con baja expresión del antígeno especificado. La intensidad también puede definirse en lo que se refiere a umbrales o intervalos de intensidad. El fenotipo positivo amortiguado es una característica de un antígeno débilmente expresado. El fenotipo también se describe como débil o de baja expresión.

15 *Crecimiento clonal.* En el cultivo celular, el crecimiento clonal es la mitosis repetida de una única célula inicial para formar un clon de células derivadas de una célula original. El clon de células puede expandirse para formar una colonia o agrupación de células. El crecimiento clonal también se refiere a las condiciones necesarias para soportar la viabilidad y la mitosis de una célula individual. Estas condiciones incluyen normalmente un medio nutriente basal complejo y enriquecido, una ausencia de sueros, presencia de factores de crecimiento y hormonas específicos, sustratos de matriz extracelular de bioquímica definida, y/o co-cultivos de células que suministran uno o más de los factores de crecimiento, hormonas o componentes de la matriz.

20 *Términos de enriquecimiento.* El término "eliminar" significa separar, seleccionar y apartar o bien para conservar o bien para desechar. Por tanto, las células estromales pueden eliminarse de una población mixta mediante cualquiera de varios medios con el intento de o bien mantenerlas o bien desecharlas. El término "aislar" significa separar de un grupo más grande y mantener aparte. Por tanto, las células progenitoras pueden aislarse de una población mixta de células progenitoras y no progenitoras. El término "purificar" significa eliminar por separación componentes no deseados.

25 *Crecimiento en agrupación.* Las células progenitoras hepáticas muestran frecuentemente una característica distintiva, en la que las células se dividen y se mantienen en proximidad mutua. Las células progenitoras forman agrupaciones en las que células se apilan una sobre otra. Las células en la masa tridimensional de células apiladas son adyacentes a las células alimentadoras o a otras células progenitoras. Las agrupaciones también se denominan colonias P o colonias de tipo P y son distintas de las monocapas de células.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención, pero la invención no se limita en modo alguno a estos ejemplos específicos. El experto habitual en la técnica encontrará en estos ejemplos los medios para implementar la presente invención. Además, el experto habitual en la técnica reconocerá una multitud de realizaciones alternativas que se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

35 6.1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE CÉLULAS PROGENITORAS Y MADRE HEPÁTICAS

Ratas. Se obtienen 344 ratas preñadas del Charles River Breeding Laboratory (Wilmington, MA). Para sincronizar las gestaciones, los animales se colocan juntos por la tarde, y en la mañana en que se observa el tapón se designa como día 0. Se usan 344 ratas Fisher macho (200-250 g) para obtener células de hígado adultas.

40 *Establecimiento de líneas de células hepáticas a partir de hígados embrionarios en el día 15.* Se preparan hígados fetales del día 15 de la gestación. Se obtienen suspensiones de células individuales incubando los hígados con tripsina al 0,05% y EDTA 0,5 mM o 10 unidades/ml de termolisina (Sigma, St. Louis, MO) y 100 unidades/ml de desoxirribonucleasa I (Sigma) durante a 37°C. Las células se recubren con Ficoll-paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) para la centrifugación en gradiente de densidad a 450 g durante 15 min. Las células de la fracción de fondo se inoculan en placas de cultivo tisular recubiertas con colágeno de tipo IV 17 mg/ml (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) o laminita 12 µg/ml (Collaborative Biomedical Products) para th1120-3 y rter6 o rhe14321, respectivamente. El medio de cultivo definido hormonalmente libre de suero, HDM, es una mezcla 1:1 medio Eagle modificado por Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, GIBCO/BRL, Grand Island, NY), al que se añaden 20 ng/ml de EGF (Collaborative Biomedical Products), insulina 5 µg/ml (Sigma), dexametasona 10⁻⁷ M (Sigma), transferrina saturada con hierro 10 µg/ml (Sigma), nicotinamida 4,4 x 10⁻³ M (Sigma), albúmina sérica bovina al 0,2% (Sigma), 2-mercaptoetanol 5 x 10⁻⁵ M (Sigma), ácido grasos libre 7,6 µeq/l, glutamina 2 x 10⁻³ M (GIBCO/BRL), CuSO₄ 1 x 10⁻⁶ M, H₂SeO₃ 3 x 10⁻⁸ M y antibióticos. Cada concentración facilitada es la concentración final en el medio. Tras 4 semanas de cultivo, se pusieron en cultivo las células tripsinadas sobre una capa alimentadora de línea de fibroblastos embrionarios de ratón STO tratados con mitomicina C (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville MD). Se clonaron Th1120-3, rter6 y rhe14321 de tres preparaciones independientes de células hepáticas fetales y se mantuvieron en células alimentadoras STO con HDM. Tras el establecimiento de las líneas celulares, se reduce la concentración de EGF hasta 10 ng/ml para todos los cultivos celulares.

Disociación en E13 de hígado fetal. Se diseccionan los hígados fetales en HBSS libre de Ca⁺⁺ helado con HEPES 10m HEPES, MgSO₄ 0,8 mM y EGTA 1 M (pH 7,4). Los hígados se trituran con colagenasa de tipo IV al 0,2%

(Sigma) y 16,5 unidades/ml de termolisina (Sigma) en HBSS preparado con HEPES 10 mM, MgSO₄ 0,8 mM y CaCl₂ 1 mM. Tras la incubación a 37°C durante 10 min., se digiere la suspensión de células con tripsina al 0,025% y EDTA 2,5 mM (Sigma) durante 10 min. Entonces se extingue la tripsina mediante la adición de 1 mg/ml de inhibidor de tripsina (Sigma). Finalmente, las células se tratan con 200 unidades/ml de desoxirribonucleasa I (Sigma). En todos los experimentos, se obtienen 3-5 x 10⁵ células por hígado.

Aislamiento de células de hígado adultas. Se realiza el método de perfusión del hígado de dos etapas para aislar células de hígado. Tras la perfusión, se centrifugan las células durante 1 min. a 50 g dos veces para enriquecer las células parenquimatosas grandes. La viabilidad celular es >90% tal como se mide mediante exclusión por azul tripano.

Ensayo de adhesión celular. La adhesión de las células a fibronectina (Collaborative Biomedical Products), laminina y colágeno de tipo IV se evalúa usando placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning, Cambridge, MA) recubiertas con esas proteínas a de 0,3 a 10 µg/ml. Tras la eliminación de las células STO mediante centrifugación en gradiente de densidad con Percoll (Pharmacia Biotech) a 200 g durante 15 min., se ponen en cultivo 3 x 10⁴ células de las líneas de células hepáticas, th1120-3, rter6, y rhe14321, en cada pocillo durante 10 horas con HDM. Tras aclarar dos veces para eliminar las células flotantes, se añade medio fresco con la sal de tretrazolio WST-1 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) para medir el número de células adherentes variables. Tras 4 horas, se determina la absorbancia según el protocolo del fabricante.

Sublíneas de STO. Se cultivan cien células de STO original procedente de ATCC en placas de cultivo de 100 mm durante 7 días en DMEM/F12 complementado con el 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, glutamina 2 x 10⁻³ M, 2-mercaptoetanol 5 x 10⁻⁵ M y antibióticos. Se seleccionan cuatro subclones para la caracterización adicional según la morfología celular y la velocidad de crecimiento. Aunque se realiza CFA para rter6 en los cuatro subclones, uno de ellos, STO6, no persiste en la unión a las placas de cultivo tras el tratamiento con mitomicina C. Un subclón, STO5, se transfecta con pEF-Hlx-MC1neo o pEF-MC1neo facilitado amablemente por el Dr. J. M. Adams, The Walter y Eliza Hall Institute of Medical Research.

Se introducen plásmidos linearizados en el sitio *Nde I* en las células mediante reactivo de transfección liposomal DOSPER (Boehringer Mannheim). Tras la selección con G418, se aíslan seis clones. Tres clones de cada uno se analizan mediante CFA.

Tinción inmunohistoquímica de colonias. Las placas de cultivo se fijan en metanol-acetona (1:1) durante 2 min. a temperatura ambiente, se aclaran y se bloquean mediante solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con el 20% de suero de cabra (GIBCO/BRL) a 4°C. Para la inmunohistoquímica doble de alfa-fetoproteína y albúmina, se incuban las placas con anticuerpo anti-albúmina de rata (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) seguido por IgG anti-conejo conjugado con rojo Texas (Vector laboratories, Burlingame, CA) y anticuerpo policlonal anti-alfa-fetoproteína de rata conjugado con FITC (Nordic Immunology, Tilburg, Países Bajos). Para el marcaje doble de albúmina y CK19, se usan anticuerpo monoclonal anti-CK19 (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) e IgG anti-ratón conjugado con FITC (Caltag, Burlingame, CA) en lugar de anticuerpo anti-alfa-fetoproteína.

Análisis citométrico de flujo. Se analizan las células en un dispositivo de FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) y se clasifican usando un citómetro de flujo Moflow (Cytomation, Fort Collins, CO). Las suspensiones de células de hígado fetal en E13 se incuban con HBSS, que contiene el 20% de suero de cabra (GIBCO/BRL) y el 1% de gelatina teleostea (Sigma), en hielo para evitar la unión de anticuerpo no específica. Tras el aclarado, las células se resuspenden con anticuerpo B5 anti-RTIA^{a,b,1} de rata conjugado con FITC (Pharmingen, San Diego, CA) y anticuerpo 1A29 anti ICAM-1 de rata conjugado con PE (Pharmingen). En algunos experimentos, las células se tiñen con anticuerpo OX18 anti-MHC de clase I monomórfico de rata biotinilado (Pharmingen) seguido por una segunda tinción con estreptavidina-rojo670 (GIBCO/BRL) para la tinción con 3 colores. Todas las tinciones se realizan con HBSS libre de Ca⁺⁺ helado que contiene HEPES 10 mM, MgSO₄ 0,8 mM, EGTA 0,2 mM, y BSA al 0,2% (pH 7,4). Las tres líneas de células hepáticas establecidas se someten a tripsinización y se fraccionan mediante centrifugación en gradiente de densidad con Percoll para eliminar las células alimentadoras. La línea de células de hematoma de rata, FTO-2B, y la línea de células epiteliales de hígado de rata, WB-F344, así como las células de hígado adultas se tiñen para comparación con las líneas de células hepáticas fetales. Las líneas celulares son amables obsequios del Dr. R.E.K. Fournier, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, y del Dr. M.-S. Tsao, Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC, respectivamente. Las células se bloquean y se tiñen con B5 conjugado con FITC, OX18, 1A29 conjugado con PE o anticuerpo Ha2/5 anti-integrina β1 de rata conjugado con FITC (Pharmingen). Se usa la IgG anti-ratón conjugada con FITC para OX18. Se tiñen las suspensiones de células de tres líneas de células hepáticas fetales con anticuerpo anti-CD98 de ratón biotinilado seguido por una segunda tinción con estreptavidina-rojo así como anticuerpo anti-Acm de rata para seleccionar poblaciones de células de ratón.

CFA para líneas de células hepáticas, células clasificadas, y células de hígado adultas. Las líneas de células hepáticas se siembran en placa por triplicado a 500 células por 9,6 cm² en la capa de células alimentadoras STO tratadas con mitomicina C con el mismo HDM que el usado para mantener cada línea celular. Antes de sembrar en placa, las células se someten a tripsinización y se fraccionan mediante centrifugación en gradiente de densidad con Percoll para eliminar las células alimentadoras. Los cultivos se incuban durante de 10 a 14 días con cambios de medio un día sí y uno no. Entonces se realiza tinción por inmunofluorescencia doble de alfa-fetoproteína y albúmina. Se

analizan 100 colonias por pocillo mediante la morfología de la colonia, el tipo P o F, y la expresión de alfa-fetoproteína y albúmina. Las colonias se tiñen usando Diff-Quick (Baxter, McGaw Park, IL) para contar el número de colonias por pocillo. En el CFA para las células clasificadas primarias y las células de hígado adultas, se cambia el número de células sembradas en placa tal como se describe. Como otra modificación secundaria, se amplía el periodo de cultivo hasta entre 14 y 17 días, y se aumenta la concentración de dexametasona hasta 10⁻⁶ M. El resto de los procedimientos se realiza igual que anteriormente. En el CFA para las células de hígado adultas, no se eliminan los pequeños números de grupos de células de hígado de la suspensión de células tras la preparación. Por tanto, podría producirse un número indefinido de colonias a partir de los grupos. Para el CFA de diferenciación biliar en células clasificadas, se realiza la tinción por inmunofluorescencia doble de albúmina y CK19 de las colonias a los 5 días de cada uno de los cultivos en presencia o ausencia de EGF. En el día 5 de los cultivos, cualquier colonia con más de una célula CK19⁺ se cuenta como colonia CK19⁺. En los días 10 y 15, las colonias que contienen múltiples agrupaciones de dos células CK19⁺ o una agrupación de más de tres células CK19⁺ se cuentan como una colonia CK19⁺. Aproximadamente se cuentan 100 colonias por pocillo. Cada punto representa la media \pm DE de los cultivos teñidos por triplicado.

6.2. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE CÉLULAS HEPÁTICAS DE RATA FETALES USANDO ALIMENTADORAS DE CÉLULAS EMBRIONARIAS DE RATÓN CON UN MEDIO HORMONALMENTE DEFINIDO.

Se intentan realizar cultivos sencillos a largo plazo de células hepáticas E15 de rata para ver cuánto tiempo pueden mantenerse y expandirse *ex vivo* células hepáticas fetales para producir progenie. Tras una centrifugación en gradiente de densidad para eliminar células mononucleares hematopoyéticas, se cultivan las células de hígado fetales en placas de cultivo recubiertas por colágeno tipo IV o laminina y en HDM (véase el ejemplo 6.1). Las células sobreviven bien durante más de 4 semanas. Sin embargo, cultivos secundarios sobre placas recubiertas con laminina o colágeno tipo IV reciente no permiten una expansión adicional. Cuando se usan líneas celulares de fibroblastos de ratón embrionarios STO tratadas con mitomicina C como capa alimentadora para los cultivos secundarios, crecen muchos agregados de células. Eventualmente se establecen varias líneas de células hepáticas estables a partir de cuatro experimentos independientes.

Se realizan análisis inmunohistoquímicos de alfa-fetoproteína y albúmina en las poblaciones celulares en crecimiento continuo antes de clonar las líneas celulares. Ambas proteínas, alfa-fetoproteína y albúmina, se usan como marcadores para confirmar que se originaban poblaciones celulares del linaje hepático. Una población celular con una tendencia a formar pilas de células, denominadas colonias P, tenía una intensa expresión de alfa-fetoproteína y albúmina, mientras que otro grupo produjo monocapas aplanadas, denominadas colonias F, con una expresión disminuida de alfa-fetoproteína y sin albúmina. Los fibroblastos de ratón embrionarios, STO, no muestran ninguna reactividad frente a ningún anticuerpo. Para un análisis adicional, se seleccionan tres líneas de células hepática clonadas a partir de experimentos independientes mediante criterios morfológicos de colonias o bien de tipo P o bien de tipo F (figura 1A-1C). Rhe14321 (figura 1A) consiste principalmente en células pequeñas empaquetadas, colonias de tipo P, mientras que th1120-3 (figura 1C) sólo constituye una monocapa aplanada de colonias de tipo F. Rter6 (figura 1B) es un fenotipo intermedio de estos dos. De manera interesante, la heterogeneidad de rter6 todavía se observa tras tres rondas de clonación secuencial de la colonia aplanada. Para ver la heterogeneidad de colonias derivadas de células individuales en rhe14321 y rter6, se cultivan las células sobre fibroblastos STO durante de 10 a 14 días a una densidad de sembrado de 500 células por 9,6 cm² (un pocillo de una placa de 6 pocillos). Entonces se caracterizan las colonias en cuanto a su morfología y su expresión de alfa-fetoproteína y albúmina. La figura 2A-2F muestra los resultados. En las líneas celulares, rhe14321 (figura 2B) y rter6 (figura 2C), y en la población celular original antes de la clonación (figura 2A), casi todas las colonias de tipo P expresan fuertemente alfa-fetoproteína, mientras que las colonias de células de tipo F no lo hacen. Además, se observa la intensa expresión tanto de alfa-fetoproteína como de albúmina sólo en colonias de tipo P. La diferencia morfológica en las líneas de células hepáticas clonadas se correlaciona con el porcentaje de la colonia de tipo P (figura 2bB y 2C). El porcentaje de colonias de tipo P en CFA de rter6 y rhe14321 es del 33,3% (\pm 8,6% DE) y del 65,7% (\pm 4,0% DE), respectivamente. Se cuenta el número total de colonias por pocillo para calcular la eficacia de crecimiento clonal (eficacia de colonia). La eficacia de rter6 y rhe14321 es del 45,7% (\pm 1,3% DE) y del 36,4% (\pm 1,1% DE), respectivamente. Las células th1120-3 se unen estrechamente entre sí a lo largo de sus bordes laterales dificultando la preparación de suspensiones de células individuales. Sin embargo, las células th1120-3 no producen agrupaciones apiladas (figura 1C).

A continuación, se someten a prueba las preferencias de cada una de las líneas celulares para adherirse a componentes específicos de matrices extracelulares (ECM), porque la adhesión de células de hígado de ratón a proteínas ECM tales como laminina, colágeno de tipo IV, y fibronectina, cambia en diferentes fases del desarrollo. Mientras que el colágeno de tipo IV es el más eficaz en la unión de th1120-3 (figura 1C), similar a los hallazgos para las células de hígado adultas, funciona peor para rter6 (figura 1B) y rhe14321 (figura 1A). La laminina es el sustrato más eficaz para la adhesión de rhe14321 (figura 1A). Esta preferencia es similar a la de cultivos primarios de células de hígado fetales de ratón (Hirata *et al.*, 1983). En resumen, la expresión conservada de alfa-fetoproteína y albúmina en colonias de tipo P y la adherencia preferible a laminina de rhe14321, sugieren que las poblaciones celulares que producen colonias de tipo P están más estrictamente asociadas con células progenitoras hepáticas.

6.3. AISLAMIENTO DE SUBCLONES DE STO PARA LA FORMACIÓN DE COLONIAS; ENSAYO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS

5 Para desarrollar un sistema de CFA para identificar células progenitoras hepáticas bipotentes con alto potencial de crecimiento, el sistema de cultivo tiene que poder soportar la expansión celular a densidades de sembrado clonales y con conservación de las funciones hepáticas originales críticas. La albúmina y la alfa-fetoproteína son dos de los marcadores más significativos para el desarrollo hepático temprano. Las condiciones de cultivo que optimizan las colonias de tipo P deben ser las mejores, ya que las colonias de tipo P, pero no de tipo F, mantienen la expresión de alfa-fetoproteína y albúmina durante la expansión clonal. Por tanto, se comparan los subclones de STO en cuanto a su soporte de colonias de tipo P de *rter6*. Uno de los clones, STO5, soporta la formación de colonias de tipo P más que cualquiera de las otras sublíneas y más que la línea original (figura 2D). El CFA de *rhe14321* también confirma que STO5 es un alimentador más eficaz que el STO original (figura 2E). El producto del gen *Hlx* de ratón, expresado en las células mesenquimatosas que recubren el tubo digestivo desde E10.5, es esencial para la expansión de células hepáticas fetales. Aunque la expresión de ARNm para el gen *H1x* se analiza en todos los subclones de STO, no hay ninguna diferencia significativa en su expresión entre los subclones (datos no mostrados). Además, los transfectantes estables de *Hlx* de ratón en STO5 no dan como resultado una mejora en los ensayos de formación de colonias (figura 2F). Sin embargo, se usa un clon de los transfectantes para los experimentos adicionales, porque el transfectante soporta una persistencia más estable de la morfología original de STO5 a pasos relativamente altos.

6.4. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS A PARTIR DE HÍGADO FETAL E13 USANDO LOS MARCADORES ANTIGÉNICOS DE SUPERFICIE Y EL ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS.

20 En el hígado fetal coexisten hepatopoyesis y grandes cantidades de hematopoyesis. Hasta ahora, se ha analizado extensamente el perfil antigénico de células progenitoras hematopoyéticas, mientras que los estudios de células progenitoras hepáticas tempranas todavía están comenzando. El perfil antigénico de células hepáticas se analiza usando las tres líneas de células hepáticas establecidas en este estudio, una línea celular de hepatocarcinoma adulto (FTO-2B), una línea celular epitelial de hígado de rata adulta (WB-F344), y células de hígado adultas recién aisladas (figura 3A-3X). En comparación con FTO-2B, WB-F344, y células de hígado adultas, el patrón de la más inmadura de las líneas de células hepáticas fetales, *rhe14321*, es bastante único porque no hay ninguna expresión de clase I de MHC clásica (RT1A1) (figura 3A). La línea celular *th1120-3* es similar a *rhe14321* en el patrón de RT1A1 (figura 3I), OX18 (clase I de pan-MHC) (figura 3J), e ICAM-1 (figura 3K), mientras que *rter6* tiene una expresión relativamente alta de RT1A1 (figura 3E) y OX18 (figura 3F). Adicionalmente, otra línea celular de un experimento diferente, que tiene una morfología idéntica a *rhe14321* (figura 1A-1D), también es RT1A1⁻, OX18^{dull}, e ICAM-1⁻. La expresión de integrina b1 es similar en todas las líneas celulares, mientras que el patrón de RT1A1^{a,b,1} e ICAM-1 es único entre ellas. El perfil antigénico de células de hígado adultas es RT1A1⁺ (figura 3U), OX18⁺ (figura 3V), e ICAM-1⁺ (figura 3W). Dado que, en la rata adulta, todas las células de médula ósea excepto los eritrocitos maduros expresan fuertemente moléculas de clase I de MHC, la población hepática fetal puede separarse de las poblaciones celulares hemopoyéticas mediante expresión de clase I de MHC. Las suspensiones de células de hígados de rata E13 se tiñen con anticuerpos anti-RT1A1⁺ e ICAM-1. Las figuras 4A1 a 4A2 muestran los 2 patrones de tinción con color de RT1A1⁺ e ICAM-1. Para determinar qué fracción contiene la población de células hepáticas, se aíslan cinco fracciones (figuras 4B-1 a 4B-5) mediante citometría de flujo activada por fluorescencia y después se examinan mediante CFA para determinar el potencial de crecimiento clonal. Las figuras 4B-1 a 4B-5 representan el resultado de la nueva clasificación de las cinco fracciones tras la citometría. Las colonias de células hepáticas, definidas mediante expresión de albúmina y alfa-fetoproteína, también pueden distinguirse morfológicamente, permitiendo contar el número de colonias hepáticas por pocillo. La mayoría de las colonias hepáticas se detectan en el umbral RT1A1^{1dull} e ICAM-1⁺ (tabla 1, figura 4B-2, es decir umbral 2), y la frecuencia de la colonia de tipo P es del 75,6% (±4,9% DE). El umbral 1 (figura 4B-1) muestra un número mucho menor de colonias, y las demás fracciones contienen números despreciables de células con capacidad de formación de colonias. En los umbrales 1 y 2, la expresión tanto de alfa-fetoproteína como de albúmina se confirma en todas las colonias hepáticas. Algunas de las colonias, derivadas de células en el umbral 2, son más grandes que otras. Para investigar la expresión de clase I de MHC en las células hepáticas en detalle, se usan tres tinciones con color de RT1A1⁺, ICAM-1, y OX18 con la dispersión lateral (SSC) como otro parámetro para el fraccionamiento de células. La dispersión lateral (SSC), un reflejo de la granularidad de células, es un parámetro útil para la separación de células hepáticas de hematopoyéticas, dado que las células hepáticas fetales contienen gotitas de lípidos desde tan sólo la fase E11 de gestación. Las figuras 4C-1 a 4C-5 muestran que el umbral 2 contiene el mayor número de células formadoras de colonias. En el umbral R2 basado en SSC, la población correspondiente al umbral 2 muestra claramente un fenotipo RT1A1⁺ y OX18^{dull} (figuras 4C-1 a 4C-5 y figuras 4D-1 a 4D-4). El CFA confirma que R4 aloja más células formadoras de colonias que el umbral 2 (tabla 1). Estos resultados sugieren que la mayoría de las poblaciones RT1A1⁺, OX18^{dull} e ICAM-1⁺ de hígado de rata E13 son células hepáticas que producen colonias alfa-fetoproteína⁺ y albúmina⁺. Es el perfil antigénico idéntico encontrado para células *rhe14321* (figuras 3A a 3D).

Tabla 1. Frecuencia de colonias hepáticas de hígado fetal en E13 clasificado basándose en la expresión de RT1A e ICAM-1.

Umbral	Células inoculadas (por pocillo)	Colonias hepáticas (por pocillo)	Eficacia de formación de colonias (%)
1	1000	8,7 ± 4,0	0,87
2	500	136,3 ± 4,6	27
3	5000	10,0 ± 7,9	0,13
4	5000	6,3 ± 0,6	0,13
5	5000	5,0 ± 1,0	0,10
R3	1000	7,0 ± 2,6	0,70
R4	500	269,3 ± 9,8	54

5 El cultivo de formación de colonias en STO5hlx que contienen el número de células indicado de cada fracción de E13 de hígado fetal. Se estableció el número de colonias hepáticas a partir de cultivos teñidos por triplicado (media ± DE). La eficacia de la formación de colonias expresa el porcentaje de células inoculadas al cultivo que pasaron a formar colonias analizadas tras 16 días del cultivo.

6.5. DIFERENTE REQUISITO DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS E13 Y CÉLULAS DE HÍGADO ADULTAS

10 Se estudió el requisito de crecimiento de las células hepáticas sometidas a citometría a partir de hígado E13 usando los alimentadores de STO5 definidos y el HDM. Desde hace mucho tiempo se ha sabido que EGF es un potente factor de crecimiento para células de hígado adultas. Por tanto, se investigan los efectos de EGF para la formación de colonias de células hepáticas sometidas a citometría. El tamaño de colonia de las células hepáticas RT1A¹⁻, OX18^{dull}, ICAM-1⁺ se vuelve mayor en ausencia de EGF, mientras que las células de hígado adultas sólo produjeron colonias en presencia de EGF (figura 5A). Además, la morfología de las colonias derivadas de células de hígado adultas es el tipo F típico, mientras que todas las células hepáticas RT1A¹⁺ producen colonias de tipo P sin EGF. Sin embargo, la eficacia de colonias se reduce ligeramente mediante la ausencia de EGF (figura 6A). De manera interesante, las condiciones de cultivo en ausencia de EGF enfatizan los dos tipos de colonias P, P1 y P2. Aunque la mayoría de las colonias son de tipo P2, en el día 12 de cultivo, resulta difícil distinguir definitivamente los dos tipos porque algunos de ellos no tienen la morfología típica. Estos resultados sugieren que las células hepáticas fetales y las células de hígado adultas son intrínsecamente diferentes en cuanto a su requisito de crecimiento así como en su expresión de RT1A¹ (figuras 3 y 4) y morfología de colonia.

25 Tras 3 semanas de cultivo, cuando el crecimiento parece alcanzar un máximo, se evalúa la expresión de RT1A¹⁻, OX18, e ICAM-1. Tal como se muestra en las figuras 5B a 5D, no se induce la expresión de RT1A¹, mientras que se reduce la de OX18. El nivel de ICAM-1 no cambia. Además, se calcula el número promedio de células de colonias individuales a partir del número de células recuperadas, el porcentaje de células hepáticas de rata y la eficacia de colonias. El número de células estimado alcanza de 3 a 4 x 10³ (tabla 2). Esto indica que la célula individual que formaba las colonias se dividía un promedio de aproximadamente 11-12 veces en estas condiciones de cultivo.

Tabla 2. Cálculo del número de células en colonias hepáticas individuales.

Número de células inoculadas	Densidad de sembrado (célula/cm ²)	Duración del cultivo (día)	Número de células recuperadas	Porcentaje de células de rata (%)	Eficacia de colonias (%)	Promedio de número de células en una colonia individual
500	18	18	1,5 x 10 ⁶	58	41	4,2 x 10 ³
4000	51	21	6,0 x 10 ⁶	90	44	3,1 x 10 ³
4000	51	20	4,0 x 10 ⁶	69	21	3,3 x 10 ³

30 Se cultivaron células sometidas a citometría a partir de R4 en la figura 4C-5 en células alimentadoras ST05hlx en placas de 60 mm o 100 mm. Tras el periodo indicado del cultivo celular se recuperaron todas las células y se contó el

número total de células. El porcentaje de células de rata es a partir del análisis de citometría de flujo basado en la expresión de ICAM-1 de rata y CD98 de ratón. La eficacia de colonias indica el porcentaje de células inoculadas al cultivo que pasaron a formar colonias. Se obtuvieron datos de cultivos teñidos por triplicado (media) a partir de experimentos realizados en paralelo con:

- 5 Promedio de número de células en colonia individual = (número de células recuperadas x porcentaje de células de rata/100)/número de células inoculadas x eficacia de colonias/100)

6.6. EVIDENCIA DE BIOPOTENCIAL EN CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS RT1A⁺

10 En la fase E13 de gestación en la rata, se piensa que las células hepáticas tienen un precursor bipotente que da lugar al hepatocito maduro y epitelio del conducto biliar. Sin embargo, antes de los descubrimientos de la presente invención, no se ha realizado ninguna evidencia directa de si los dos destinos se originan a partir de una única célula o no. Para determinar si las células hepáticas fetales RT1A⁺ OX18^{duil} ICAM-1⁺ pueden diferenciarse para dar el linaje biliar en este sistema de cultivo, se tiñeron las colonias mediante anticuerpo anti-CK19 como marcador específico para células epiteliales biliares. CK19 se expresa en células precursoras epiteliales del conducto biliar tras el día 15,5 en el hígado de rata fetal, momento en el que desaparece la expresión de albúmina en las células. Se cultivan las células RT1A⁺ ICAM-1⁺ sometidas a citometría en presencia o ausencia de EGF, y se monitorizan sus destinos mediante la expresión de CK19 y albúmina tras 5 días de cultivo. Tras los primeros 5 días, las colonias CK19⁺ son despreciables en los cultivos tratados con EGF, mientras que aparecieron unas pocas colonias que contenían células CK19⁺ en aquellos en ausencia de EGF (figuras 6a a 6b). Aunque la intensidad de la expresión de CK19 es bastante débil, las células CK19⁺ muestran una expresión reducida de albúmina. En el día 10 del cultivo, tal como se muestra en las figuras 6a a 6b, algunas colonias aparentemente sólo expresan CK19 o albúmina y otras tienen una expresión doble positiva. El patrón de las células CK19⁺ y albúmina⁺ en una colonia individual es recíproco. El número de colonias doble positivas colonias y colonias positivas únicamente para CK19 todavía es mayor en ausencia de EGF (figura 6a). En presencia de EGF, muchas de las colonias consisten sólo en células albúmina⁺ en el día 10 (figura 6b). Eventualmente, el porcentaje de colonias doble positivas alcanza casi el 100% en ausencia de EGF en el día 15 (figura 6a). En conjunto, EGF suprime drásticamente la aparición de colonias CK19⁺ mediante el cultivo (figura 6b). Estos resultados sugieren que las células RT1A⁺, OX18^{duil}, e ICAM-1⁺ de hígado fetal E13 pueden diferenciarse hacia el linaje biliar y su destino puede verse influido por EGF *in vitro* (figura 7).

6.7. AISLAMIENTO DE CÉLULAS PRECURSORAS HEPÁTICAS HUMANAS Y NO HUMANAS USANDO ANTICUERPOS FRENTE A ICAM y EPÍTOPOS DE MHC DE CLASE I CLÁSICO.

30 La estructura molecular y la función biológica de antígenos del MHC de clase I clásico están sumamente conservadas entre los vertebrados, y lo mismo sucede para los antígenos de ICAM. Sin embargo, los antígenos del MHC no se encuentran en los invertebrados. Los antígenos del MHC son las moléculas más exhaustivamente investigadas de las especies de vertebrados. Aunque la información sobre antígenos de ICAM es limitada, las funciones biológicas de los antígenos de ICAM se conservan en muchos mamíferos tales como seres humanos, ratones y ratas. Hasta ahora, se ha clonado ADN complementario de ICAM-1 para seres humanos, chimpancés, ratones, ratas, perros y bovinos. La conclusión de los datos de secuencia es que la estructura molecular está altamente conservada en todas las especies. Por tanto, eligiendo anticuerpos específicos para ICAM-1 en una especie dada y anticuerpos para el antígeno del MHC de clase I designado según la tabla, pueden aislarse las poblaciones celulares enriquecidas en células progenitoras hepáticas.

40 Tabla 3. Antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad - Nomenclatura

Especie	Ratas	Ratones	Seres humanos
MHC	RT1	H-2	HLA
Clase I de MHC clásica	A	K, D, L	A, B, C
Clase I de MHC no clásica	C/E, M	TL, Q, M	E, F, G, H, J, X

45 OX18 reconoce un epítipo monomórfico de antígenos de clase I de MHC de rata. Por tanto, el anticuerpo reconoce clase I de MHC no clásica así como clase I de MHC clásica. El número exacto de loci del MHC de clase I no clásico no está definido en ninguna especie, porque varía entre miembros de la misma especie. Por tanto, en el futuro, puede descubrirse un nuevo locus como clase I de MHC no clásica en subpoblaciones de estas especies.

Una realización de la invención es un método de predicción del fenotipo de células progenitoras hepáticas. Esta característica se ilustra en la tabla de marcadores de superficie celular claves en diversas especies.

Tabla 4. Marcadores para células progenitoras hepáticas, basándose en la presente invención.

Especie	Rata	Ratón	Ser humano
Clase I de MHC clásica	Negativo para RT1A	Negativo para H-2K y/o negativo para H-2D y/o negativo para H-2L	Negativo para HLA-A y/o negativo para HLA-B y/o negativo para HLA-C
Clase I de MHC no clásica	Positivo amortiguado para C/E y/o M	Positivo amortiguado para TL y/o Q y/o M	Positivo amortiguado para E, F, G, H, J, y/o X
ICAM-1	Positivo	Positivo	Positivo

6.8. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS BIPOTENTES DE RATA Y COMPARACIÓN CON HEPATOCITOS ADULTOS

5 Tabla 5. Marcadores internos y de superficie celular en células de rata.

Marcadores	Células hepáticas bipotentes	Hepatocitos adultos**
Datos de células recién aisladas		
ICAM-1	+	+
CD90 (Thy-1)	-	-
CD44H	+	-*
MHC de clase I (RTIA ¹)	-	+
OX18	Amortiguado	+
Datos de células cultivadas		
Alfa-fetoproteína	+	+ en varias células en la mayoría de las colonias
Albúmina	+EGF: muchas células positivas -EGF: menos células positivas	+
CK19	+EGF: pocas células positivas -EGF: muchas son positivas	- ***

EGF = factor de crecimiento epidérmico que cuando se añade a las condiciones de cultivo parece impulsar las células hacia el linaje hepatocítico y bloquea el desarrollo del linaje biliar. En ausencia de EGF, hay una diferenciación espontánea hacia los linajes tanto biliar como hepatocítico.

10 * Otros han mostrado que los hepatocitos adultos y los epitelios biliares adultos son negativos para CD44H (Cruishank SM *et al*, J Clin Pathol 1999 52:730-734) y CD 90 (Gordon G *et al* American Journal of Pathology 157:771-786).

** Los hepatocitos adultos son los que pueden proliferar mediante crecimiento hiperplásico en cultivo en las condiciones especificadas anteriormente.

15 *** CK 19 no se expresa en hepatocitos adultos *in vivo*. Sin embargo, en cualquier cultivo de células de hígado adultas, pueden observarse una o dos células que expresan algo de CK19 pero sin capacidad de inducción aparente mediante las condiciones de cultivo y sin distinciones morfológicas entre las células positivas y negativas. Esto contrasta con las observaciones en hígado fetal *in vivo* y en los cultivos de células bipotentes hepáticas y de otras células de hígado fetales.

20 6.9. FENOTIPADO ANTIGÉNICO DE CÉLULAS DE HÍGADO FETALES HUMANAS

Se tiñen células de hígado fetales humanas con anticuerpo frente a CD14. Se identifican varias poblaciones mediante citometría de flujo en dos colores de HLA (ABC) frente a CD14. Estas poblaciones incluyen un grupo

designado R2 caracterizado mediante tinción de HLA intermedia y sin tinción de CD14 y otro grupo designado R3 caracterizado mediante alta tinción de CD14 alta tinción de HLA. Cuando se tiñe para detectar la alfa-fetoproteína, las células R3 son positivas para alfa-fetoproteína y las R2 contienen dos subpoblaciones, sólo una de las cuales se tiñe para AFP.

5 6.10. AISLAMIENTO ADICIONAL DE CÉLULAS PRECURSORAS HEPÁTICAS HUMANAS USANDO ANTICUERPOS FRENTE A MARCADORES DE EXPRESIÓN INCLUYENDO CLASE I DE MHC NO CLÁSICA, ALFA-FETOPROTEÍNA, ALBÚMINA, Y CK19.

10 Con el fin de seleccionar epítomos monomórficos se incubó la suspensión de células con anticuerpo conjugado con fluoresceína frente a los epítomos monomórficos de clase I de HLA. El experto en la técnica reconocerá que puede usarse cualquiera de muchos otros fluorocromos en vez de la fluoresceína, incluyendo, pero sin limitarse a, rodamina y rojo de Tejas. Como alternativa, se usa inmunofluorescencia indirecta para marcar las células. Es decir, se conjuga el marcador fluorescente con un anticuerpo dirigido frente a la inmunoglobulina de la especie en la que se provoca el anticuerpo primario. Se somete la muestra celular a citometría mediante fluorescencia de alto rendimiento (citometría de flujo usando cualquiera de una variedad de instrumentos de citometría comercialmente disponibles o fabricados a medida). Se seleccionan células progenitoras hepáticas que tienen fluorescencia intermedia o amortiguada con los anticuerpos anti-epítomos monomórficos marcados.

15 También pueden prepararse ventajosamente composiciones enriquecidas en células progenitoras hepáticas de rata mediante citometría de suspensiones de células de hígado usando anticuerpos frente a CD44H. Las células de hígado que muestran un alto nivel de dispersión lateral también expresan CD44H y expresan alfa-fetoproteína. En particular, las células que expresan alfa-fetoproteína también expresan altos niveles de CD44H. En cambio, las células de hígado que tienen un bajo nivel de dispersión lateral no expresan CD44 en altos niveles.

20 Las células de hígado que muestran un alto nivel de dispersión lateral no muestran una distinción dependiente de CD90 en la expresión de alfa-fetoproteína. Sin embargo, las células que muestran un bajo nivel de dispersión lateral muestran una alta distinción dependiente de CD90 en la expresión de alfa-fetoproteína. En particular, las células que expresan alfa-fetoproteína también expresan altos niveles de CD90.

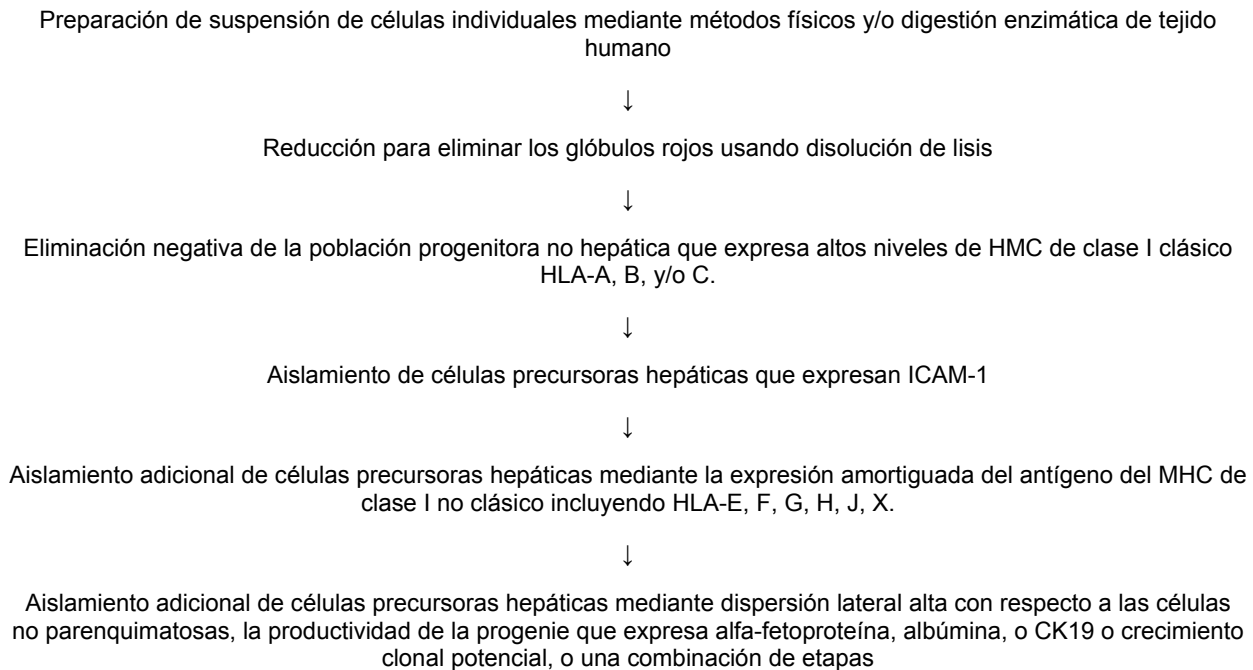
25 Como alternativa, se usan anticuerpos específicos para epítomos polimórficos, incluyendo, pero sin limitarse a, HLA-A2, HLA-B27, y HLA-Bw22, para identificar y aislar células progenitoras hepáticas.

Además, se usan anticuerpos específicos para antígenos de clase I de HLA no clásico, incluyendo HLA-G, HLA-E, y HLA-F, para identificar y aislar células progenitoras hepáticas que expresan el antígeno.

30 Resulta evidente que estos métodos pueden adaptarse fácilmente a células progenitoras hepáticas no de mamíferos.

6.11. AISLAMIENTO ADICIONAL DE CÉLULAS PRECURSORAS HEPÁTICAS HUMANAS USANDO MÉTODOS DE AISLAMIENTO POR AFINIDAD DE ALTO RENDIMIENTO CON ANTICUERPOS FRENTE A MARCADORES DE EXPRESIÓN INCLUYENDO ALFA-FETOPROTEÍNA, ALBÚMINA, CLASE I DE MHC NO CLÁSICA I Y CK19

35 Se presenta esquemáticamente a continuación un protocolo de aislamiento:

Diagrama para el aislamiento de células precursoras hepáticas humanas

Pueden usarse ventajosamente otros métodos de reducción y eliminación del componente de glóbulos rojos y estos métodos pueden reducir también parte de la población celular estromal. Estos métodos incluyen fraccionamiento con gradientes de Percoll y disminución específica usando anticuerpo frente a glicoforina A, CD45, o ambos. Además, estos métodos incluyen velocidad de sedimentación, separación en gradientes de densidad distintos de con Percoll, por ejemplo, Ficoll, centrifugación zonal y elutriación de células. Mediante estos métodos se eliminan glóbulos rojos, hepatocitos poliploides, células hematopoyéticas y células estromales.

El aislamiento de poblaciones celulares que son positivas para ICAM-1 y negativas para antígeno del MHC de clase I clásico está caracterizado adicionalmente con otros marcadores incluyendo el MHC de clase I no clásico para identificar células progenitoras hepáticas. Además, la progenie de estas células progenitoras se marca con anticuerpos frente a proteínas citoplasmáticas, tales como alfa-fetoproteína y/o albúmina, marcadores que desde hace mucho tiempo se sabe que son característicos de las células progenitoras hepáticas. La alfa-fetoproteína y la albúmina son representativas de los marcadores bien conocidos para las células progenitoras hepáticas que no pueden usarse para seleccionar células viables, puesto que el marcaje de las células para estas proteínas requiere la permeabilización de las células, un proceso que destruye su viabilidad. Sin embargo, pueden someterse a prueba muestras de células de una población para determinar la presencia de alfa-fetoproteína, albúmina, y citoqueratina. De ese modo, se deducen las características de la población completa. Sin embargo, la alta correlación entre los marcadores de superficie celular (por ejemplo, positivas para ICAM-1, positivas amortiguadas para OX-18, negativas para el MHC de clase I clásico) y la capacidad de crecimiento clonal con los marcadores citoplasmáticos alfa-fetoproteína, albúmina, o CK19 demuestra que pueden aislarse células viables usando selección sólo para los marcadores de superficie.

6.12. AISLAMIENTO ADICIONAL DE CÉLULAS PRECURSORAS HEPÁTICAS HUMANAS USANDO DISPERSIÓN LATERAL.

La dispersión lateral no puede usarse, por sí misma, para identificar un tipo celular tal como las células precursoras hepáticas. Sin embargo, es muy útil como complemento para seleccionar mediante otros medios tales citometría de flujo activada por fluorescencia para marcadores. Para una población identificada por un marcador dado, tal como el MHC de clase I clásico, hay que centrarse en una subpoblación definida por sus características de dispersión lateral (véase la figura 4c).

Es importante darse cuenta de que las células hepáticas maduras son sumamente granulares (muestran una dispersión lateral muy alta); las células progenitoras hepáticas son intermedias en cuanto a granularidad; y las poblaciones celulares no parenquimatosas tienen incluso menos granularidad que las células precursoras hepáticas. En las células de tejido fetal, que consisten casi en su totalidad en células no parenquimatosas y células progenitoras hepáticas, las células progenitoras hepáticas tienen la mayor granularidad. Las células progenitoras hepáticas se seleccionan como la población celular que es intermedia en granularidad mediante citometría de flujo.

Las composiciones enriquecidas en células progenitoras hepáticas humanas también pueden prepararse ventajosamente clasificando suspensiones de células de hígado usando anticuerpos frente a CD14 en combinación con anticuerpos frente a HLA, la versión humana del MHC. Todos los métodos de inmunoselección son igualmente

5 aplicables. Como ejemplo particular, se usa citometría de flujo para aislar células: células designadas R2 que expresan niveles relativamente intermedios de HLA y no expresan CD 14, y células designadas R3 que expresan niveles relativamente altos de HLA y niveles relativamente altos de CD14. Las células R2 se caracterizan además por tener dos subpoblaciones mediante la expresión de alfa-fetoproteína. Las células R3 se caracterizan además porque consisten sólo en células que expresan alfa fetoproteína.

6.13. ELIMINACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS NO HEPÁTICAS MEDIANTE SELECCIÓN NEGATIVA CON ANTICUERPOS FRENTE A GLICOFORINA A o CD45.

10 Las células progenitoras hepáticas se distinguen de los glóbulos rojos mediante el uso de anticuerpos monoclonales (glicoforina A para seres humanos) y un antisuero policlonal frente a antígeno de glóbulos rojos si no se dispone de anticuerpos monoclonales. Además, las células que expresan el antígeno leucocitario común (CD45) también expresan el antígeno del MHC de clase I clásico. Por tanto, por defecto, CD45 no es un antígeno que pueda usarse para identificar las células progenitoras hepáticas de roedor, pero se usa como alternativa o complemento a la selección negativa mediante el MHC de clase I clásico.

6.14. IDENTIFICACIÓN DE CÁNCERES HEPÁTICOS Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO

15 Los marcadores que se han usado para identificar células progenitoras hepáticas incluyendo los antígenos del HLA de clase I no clásico, ICAM- 1 y alfa-fetoproteína pueden usarse para caracterizar cánceres hepáticos para definir mejor los tratamientos satisfactorios para esos cánceres. Los cánceres, en general, son transformantes de células madre y poblaciones de células progenitoras tempranas. Sin embargo, estos transformantes a menudo conservan la expresión de los marcadores antigénicos compartida con sus homólogos normales. Los cánceres hepáticos, distinguidos mediante esos marcadores antigénicos, pueden identificarse como cánceres que responden en distintas formas a las modalidades terapéuticas oncológicas (por ejemplo, fármacos quimioterápicos, radiación y terapias con adyuvantes).

6.15. IDENTIFICACIÓN y SELECCIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

25 Los marcadores descritos en el presente documento y las metodologías para la selección también pueden usarse para caracterizar la diferenciación de células madre embrionarias (ES) a ciertos destinos. Las células ES se están haciendo populares como posibles células madre polivalentes para su uso en la reconstitución de cualquier tejido. Sin embargo, los estudios de inyección anteriores de células ES en tejidos dieron como resultados tumores, algunos de los cuales eran malignos. La única forma en que van a usarse clínicamente las células ES es para diferenciarlas en células madre determinadas y luego inyectar las células madre determinadas. Las células madre embrionarias se mantienen en cultivo celular en condiciones de cultivo que permitan su proliferación para formar progenie. La progenie de ES se somete a citometría de flujo tras su incubación con anticuerpos frente los antígenos del MHC de clase I e ICAM-1. La progenie de ES que cumple con los criterios para las células progenitoras hepáticas se expande cultivo celular. Los marcadores que se han identificado pueden utilizarse para definir un destino hepático para una célula madre determinada.

35 6.16. USO CONJUTAMENTE CON TERAPIA GÉNICA

Los marcadores de células progenitoras de hígado identificados en el presente documento se usan para identificar poblaciones celulares para terapias génicas. Hasta la fecha, las terapias génicas a menudo no han funcionado o no han funcionado bien con direccionamiento a poblaciones celulares maduras. Los principales éxitos en terapias génicas hasta la fecha han sido terapias génicas *ex vivo* en poblaciones de células progenitoras hepatopoyéticas. Por tanto, las terapias génicas *ex vivo* para el hígado se usan con células progenitoras y madre determinadas hepáticas aisladas mediante los protocolos. Asimismo, las terapias génicas que implican "vectores inyectables dirigidos" se mejoran mediante al centrarse en las células progenitoras hepáticas diana. De esta forma, pueden mejorarse errores innatos del metabolismo, incluyendo hemofilia, deficiencia del complejo I de la cadena respiratoria, fenilcetonuria, galactosemia, tirosinemia hepato-renal, intolerancia a la fructosa hereditaria, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, enfermedad de almacenamiento en el retículo endoplasmático, hiperoxaluria tipo 1, deficiencia de 3-beta-hidroxi-delta-5-C27-esteroide deshidrogenada, enfermedades de almacenamiento de glucógeno (incluyendo deficiencia de glucosa-6-fosfatasa, glucosa-6-fosfatasa translocasa, enzima desramificante, fosforilasa hepática, y fosforilasa-b-cinasa), defectos en la oxidación o transferencia de ácidos grasos (incluyendo acidurias orgánicas, defectos de acil-CoA deshidrogenasas), porfiria, y bilirrubina uridina difosfato glucuroniltransferasa.

50 Las células progenitoras hepáticas pueden usarse para la terapia génica de la siguiente forma:

La fenilcetonuria (PKU) es un trastorno autonómico recesivo producido por una deficiencia en fenilalanina hidroxilasa (PAH) en el hígado. La PAH cataliza la conversión de fenilalanina en tirosina usando tetrahidrobiopterina como cofactor. Los pacientes con PKU muestran retraso mental profundo e hipopigmentación de la piel, el cabello y los ojos debido a un aumento en la cantidad de fenilalanina en los fluidos corporales. Aunque una rígida restricción en la dieta reduce significativamente los niveles séricos de fenilalanina, el reducido cumplimiento, incluso en la adolescencia o en la edad adulta temprana, a menudo conduce a una disminución en el rendimiento mental o de comportamiento. La técnica de terapia génica es una alternativa a la terapia dietética para la PKU. El desarrollo de un ratón mutante *PaH^{enu2}* para PKU facilitó los efectos de intentar este enfoque. Hasta ahora, se han desarrollado tres sistemas de vectores

5 diferentes, complejos de ADN/proteína, retrovirus y adenovirus recombinantes. El efecto de la transferencia génica mediada por adenovirus duraba sólo un corto periodo tras la inyección debido a la respuesta inmunitaria del huésped frente al virus recombinante. Aunque los retrovirus recombinantes y los complejos de ADN/proteína pueden transducir eficazmente hepatocitos deficientes en PAH *in vitro*, la utilidad clínica del enfoque *ex vivo* es limitada debido principalmente al bajo número de células que pueden reimplantarse con éxito en el hígado. El uso de células progenitoras hepáticas con alto potencial de crecimiento puede eliminar el problema mencionado anteriormente.

Diagrama para la terapia génica *ex vivo* para usar células progenitoras hepáticas autólogas

Aislamiento de células progenitoras hepáticas de un paciente con PKU (o para estudios experimentales de un ratón deficiente en PAH, *Pah^{enu2}*).

↓

Transducción de las células con ADNc de PAH humana y gen de resistencia a neomicina para la selección de G418 mediante métodos virales y no virales.

↓

Expansión *ex vivo* de las células en células alimentadoras que contienen el gen de resistencia a neomicina con G418 durante 7-14 días.

↓

Recogida de las células con dispa. Esta pronasa no es eficaz para las células alimentadoras. Por tanto, sólo pueden recuperarse de los cultivos las células progenitoras hepáticas con el ADNc de PAH y neomicina.

↓

Infusión de las células en el hígado del huésped mediante la vena porta o el bazo.

6.17. USO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS BIPOTENTES EN TERAPIA CELULAR

10 Se usa un modelo de rata con insuficiencia hepática para evaluar la terapia de trasplante de células heterogéneas. La insuficiencia hepática se modela mediante la eliminación quirúrgica de aproximadamente el 70% del hígado y la ligación del conducto biliar común en un grupo experimental de diez ratas macho (de 125 a 160 g de peso corporal). Un grupo control simulado de diez ratas de edad y sexo correspondientes se somete a anestesia similar, laparotomía en línea media y manipulación del hígado, pero sin ligación de los conductos biliares y sin hepatectomía.

15 Se prepara una población de células precursoras hepáticas enriquecida tal como se describió anteriormente. En resumen, los hígados de 12 crías de rata embrionarias (día 14 embrionario) se extraen asépticamente, se cortan en dados, se aclaran en EDTA 1 mM en BSS de Hank sin calcio ni magnesio, pH 7.0, luego se incuban durante hasta 20 minutos en BSS de Hank que contiene colagenasa 0,5 mg/ml para producir una suspensión de células casi individual.

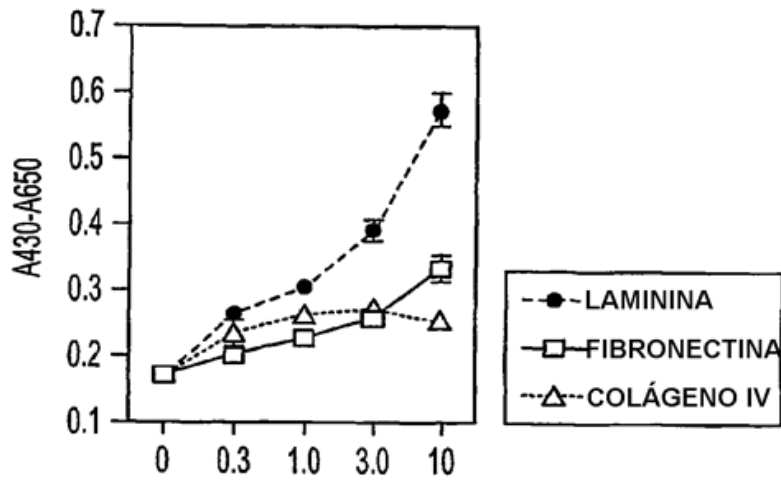
Se preparan células progenitoras hepáticas bipotentes mediante cualquiera de los métodos anteriores.

20 Un día tras la hepatectomía o la operación simulada, las ratas, tanto experimentales como control simulado, se someten a incisión abdominal de 5 mm para exponer el bazo. Se escogió aleatoriamente la mitad de los animales de cada uno de los grupos experimental y control simulado, se les inyectaron 0,1 ml de cada una de las composiciones de células progenitoras hepáticas composición bipotentes, directamente en el bazo. Todas las incisiones se cierran con grapas quirúrgicas. El número de células administradas a grupos diferentes de animales puede ser de aproximadamente 10^3 hasta aproximadamente 10^{10} , en particular, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 y 10^{10} . Se administra ciclosporina A
25 inmunosupresora, 1 mg/kg de peso corporal, diariamente por vía intraperitoneal.

30 Se monitorizan los niveles sanguíneos de bilirrubina y las actividades de gamma glutamil transferasa y alanina aminotransferasa dos días antes de la hepatectomía o de la operación de hepatectomía simulada y en los días 3, 7, 14 y 28 tras la operación. Se registra el peso corporal, el consumo de agua y una inspección visual de la letargia en los mismos días. A los 28 días tras la hepatectomía se sacrifica a todos los animales supervivientes para la evaluación histológica del bazo y el hígado.

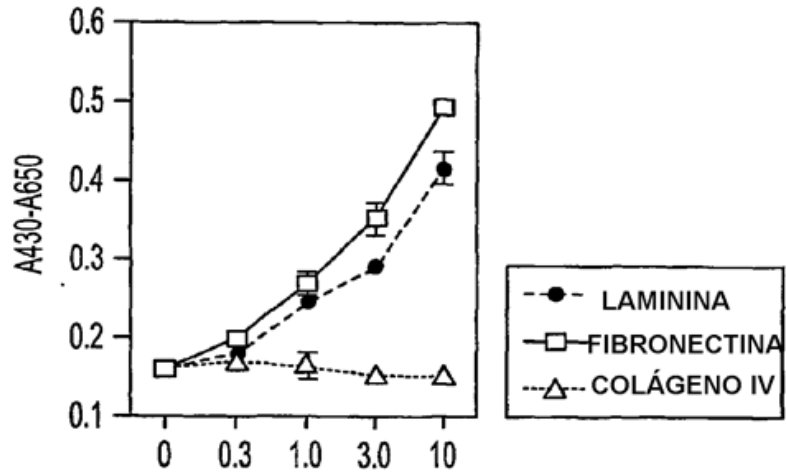
REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de una mezcla de células de vertebrado enriquecidas en células progenitoras hepáticas que comprende:
 - (a) obtener una suspensión de células de vertebrado y
 - 5 (b) posteriormente en cualquier orden, o de manera sustancialmente simultánea, eliminar de la suspensión de células aquellas células que expresan al menos un antígeno del MHC de clase Ia y aislar de la suspensión de células aquellas células que son positivas para el antígeno ICAM-1, para proporcionar una mezcla de células enriquecida en células progenitoras.
2. Método para la identificación de células progenitoras hepáticas, que comprende:
 - 10 (a) obtener una suspensión de células que se sospecha que incluye células progenitoras hepáticas; y
 - (b) identificar las células que expresan el antígeno ICAM-1 y no expresan el antígeno del MHC de clase Ia.
3. Método de obtención de una mezcla de células de vertebrado enriquecidas en células progenitoras hepáticas que comprende:
 - 15 a) proporcionar una célula madre embrionaria de vertebrado, a excepción de las células madre embrionarias humanas,
 - b) expandir la célula madre embrionaria para producir una progenie de células madre embrionarias, y
 - c) aislar aquella progenie de células madre embrionarias que expresan al menos el antígeno ICAM-1 y no expresan el antígeno del MHC de clase Ia.
4. Método según la reivindicación 1, que comprende además aislar de la suspensión de células aquellas células que expresan al menos un antígeno del MHC de clase Ib.
- 20 5. Método según la reivindicación 2, que comprende además identificar las células que expresan al menos un antígeno del MHC de clase Ib.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la suspensión de células se obtiene de endodermo o médula ósea.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en el que el endodermo se selecciona del grupo que consiste en hígado, páncreas, pulmón, intestino, tiroides, gónada y combinaciones de los mismos.



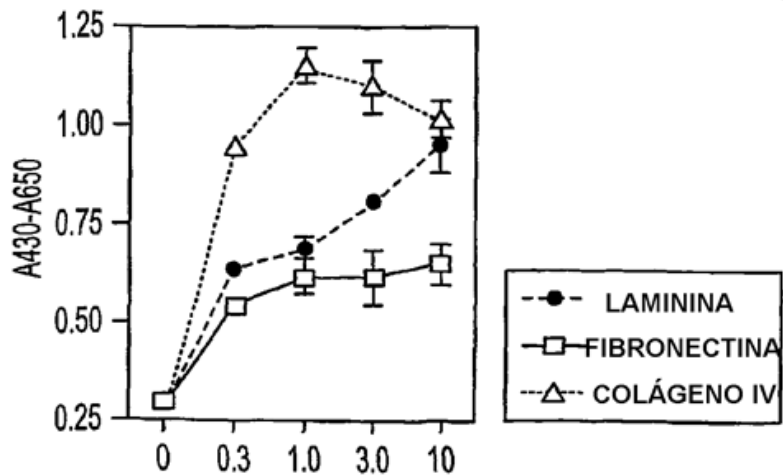
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA PARA RECUBRIMIENTO (µg/ml)

FIG. 1A



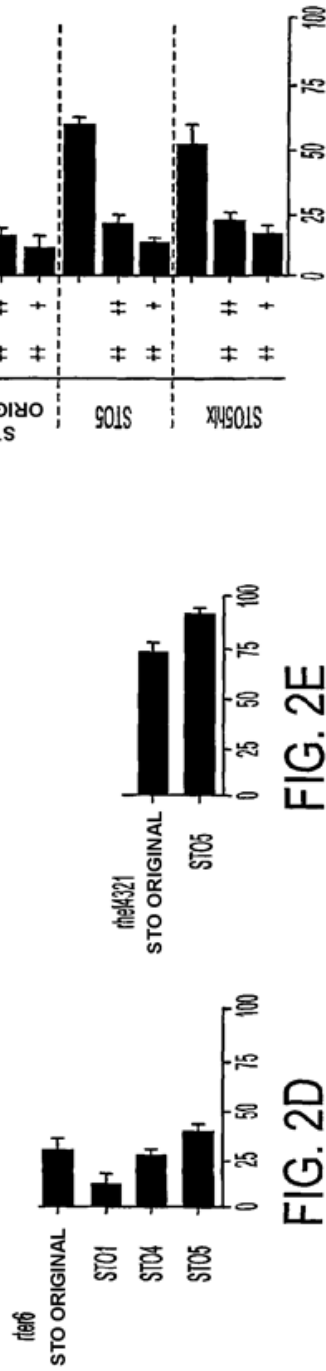
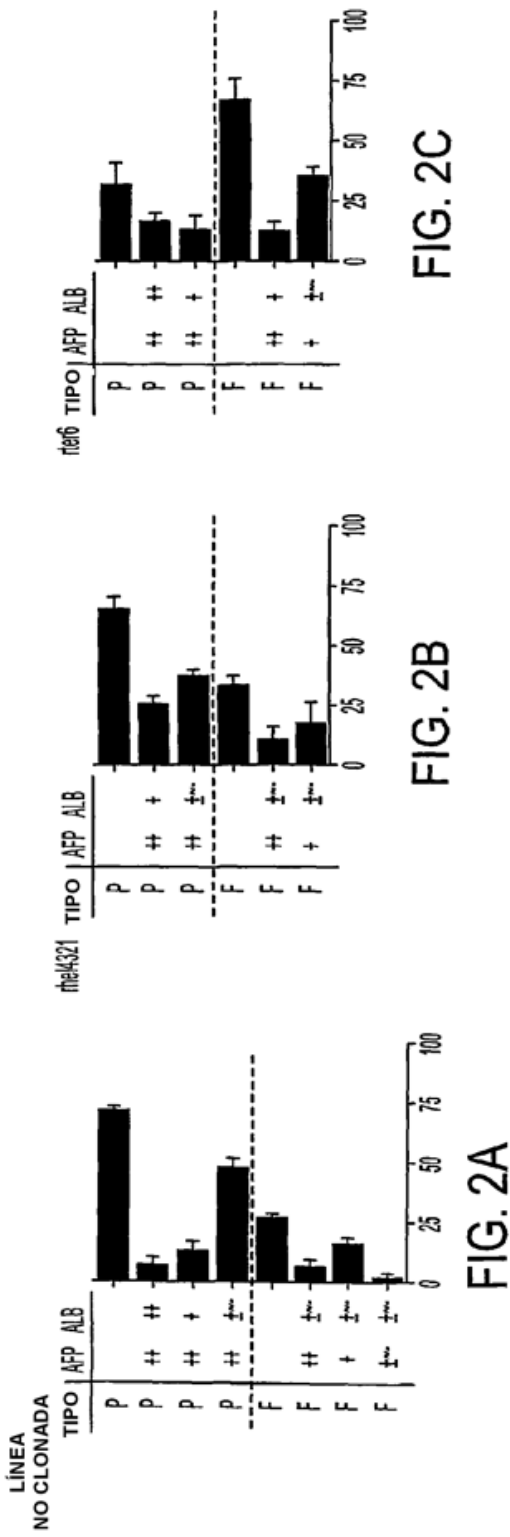
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA PARA RECUBRIMIENTO (µg/ml)

FIG. 1B



CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA PARA RECUBRIMIENTO(µg/ml)

FIG. 1C



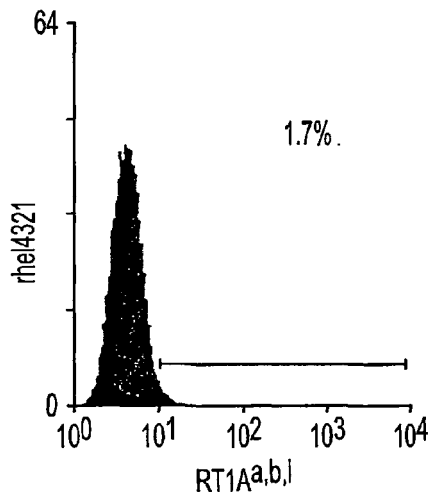


FIG. 3A

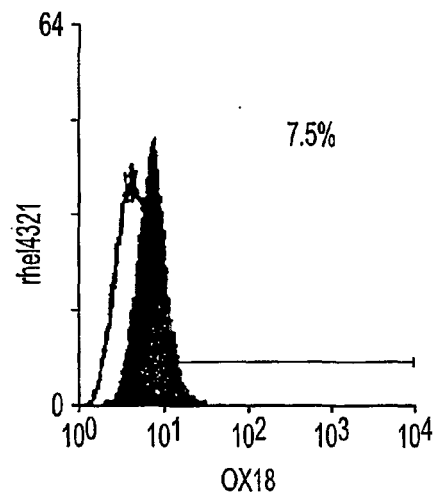


FIG. 3B

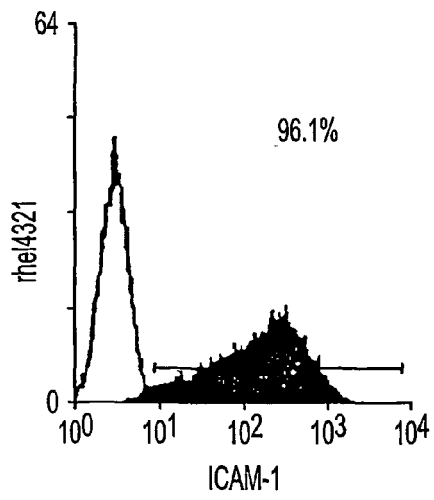


FIG. 3C

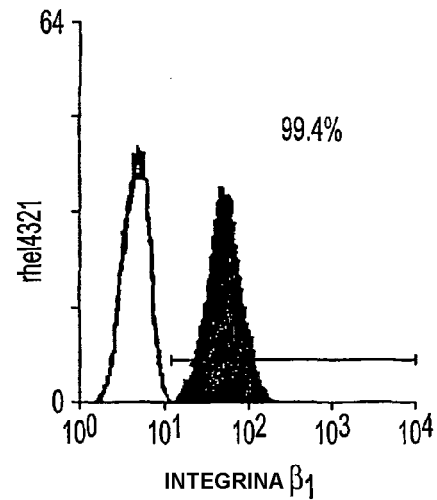


FIG. 3D

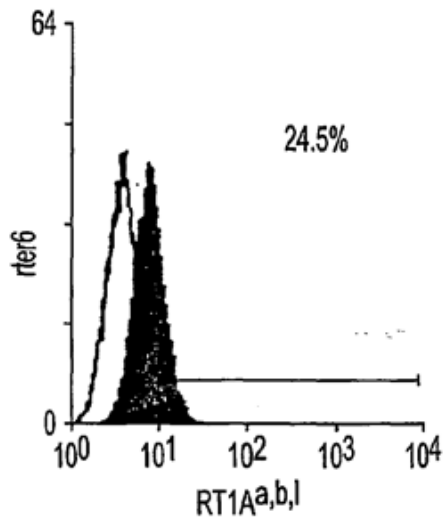


FIG. 3E

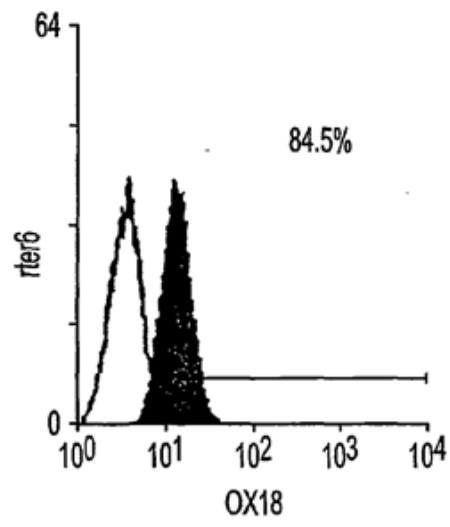


FIG. 3F

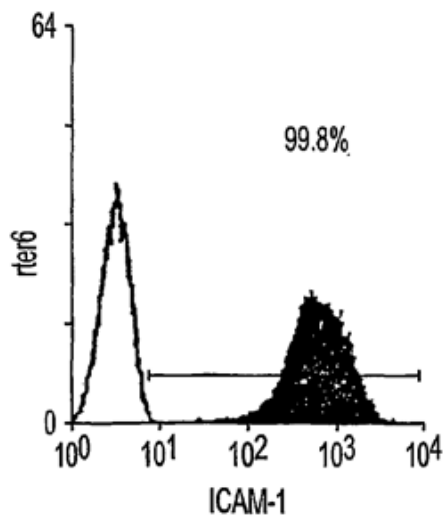


FIG. 3G

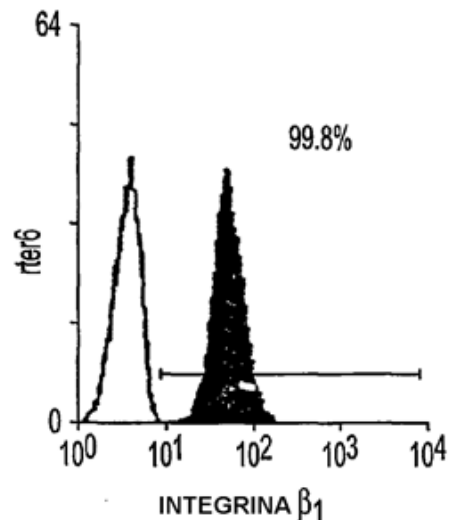


FIG. 3H

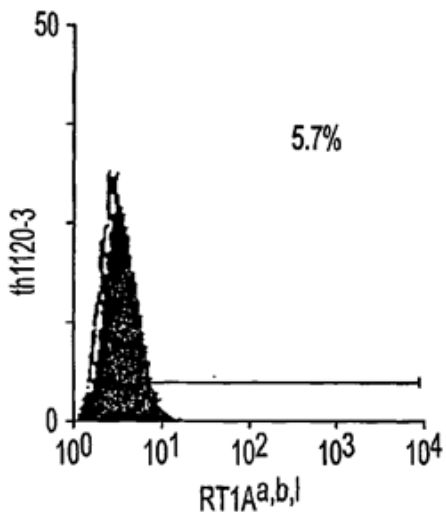


FIG. 3I

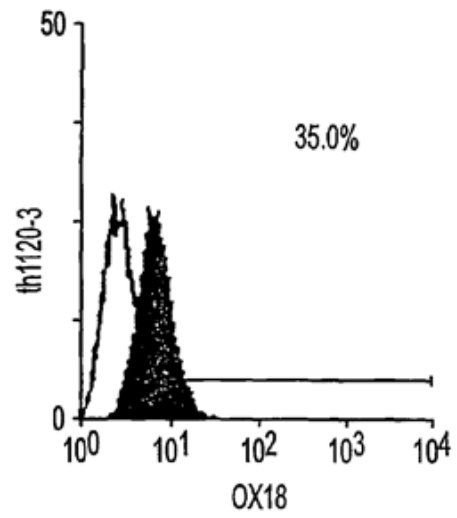


FIG. 3J

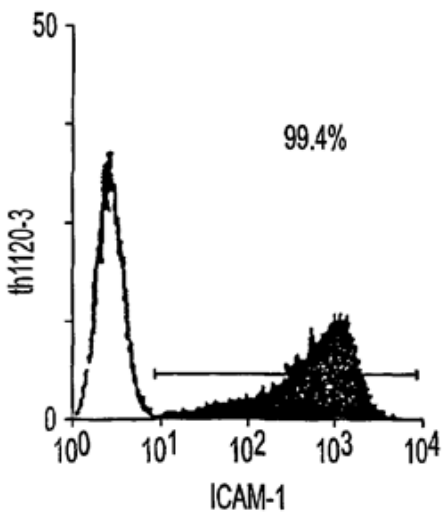


FIG. 3K

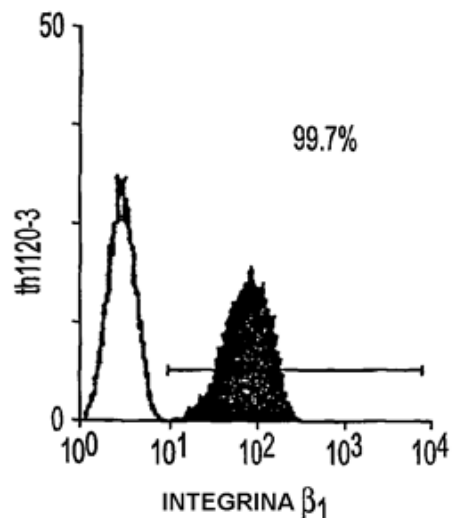


FIG. 3L

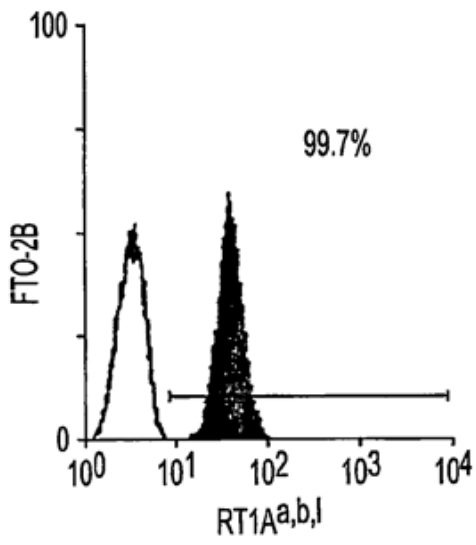


FIG. 3M

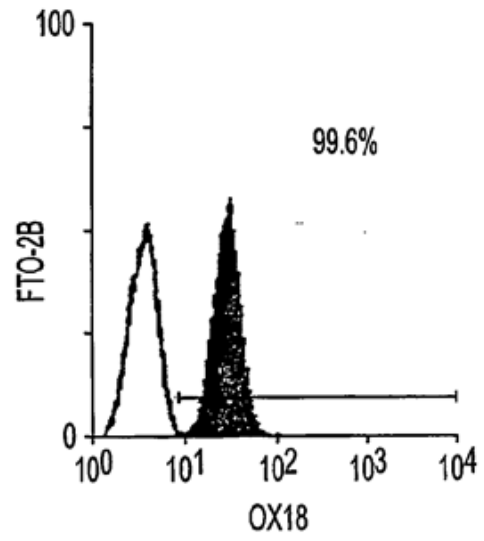


FIG. 3N

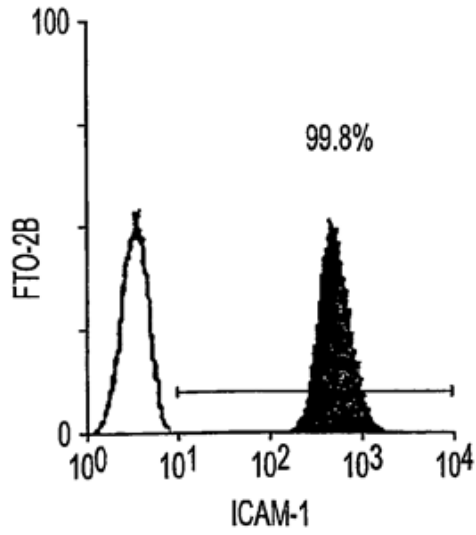


FIG. 3O

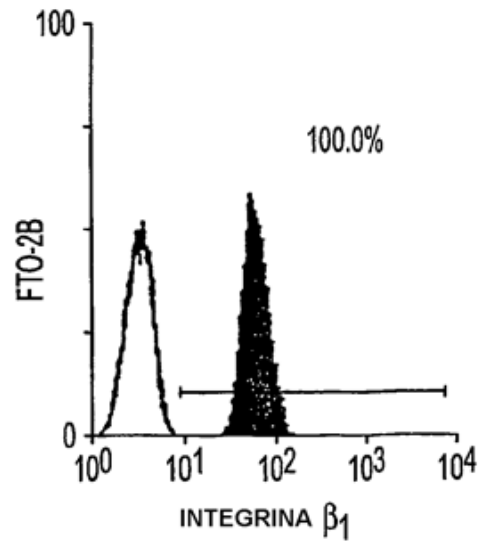


FIG. 3P

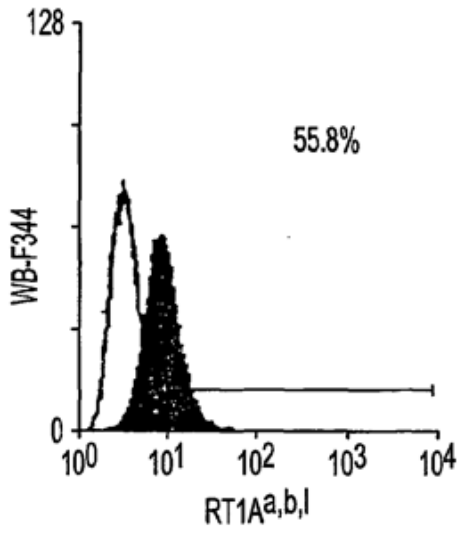


FIG. 3Q

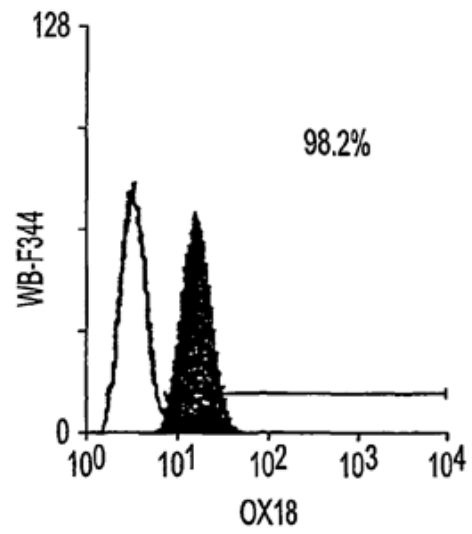


FIG. 3R

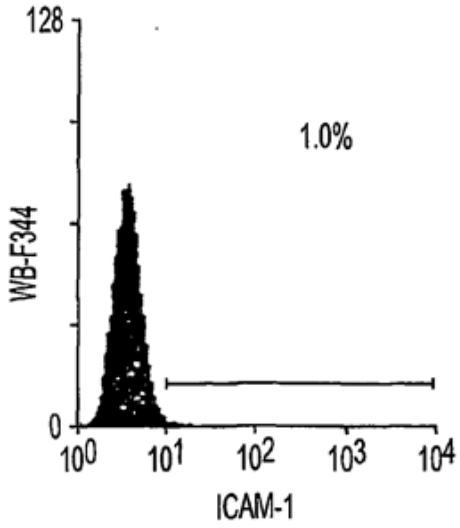


FIG. 3S

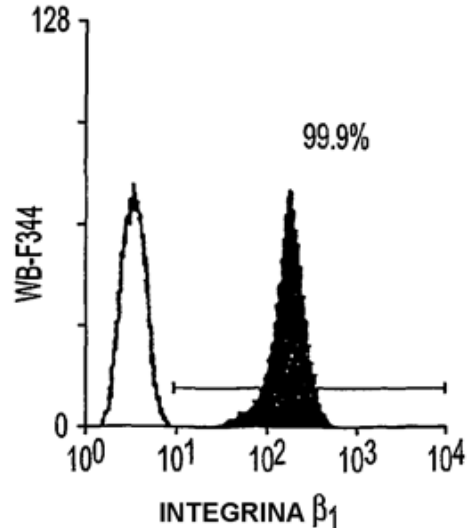


FIG. 3T

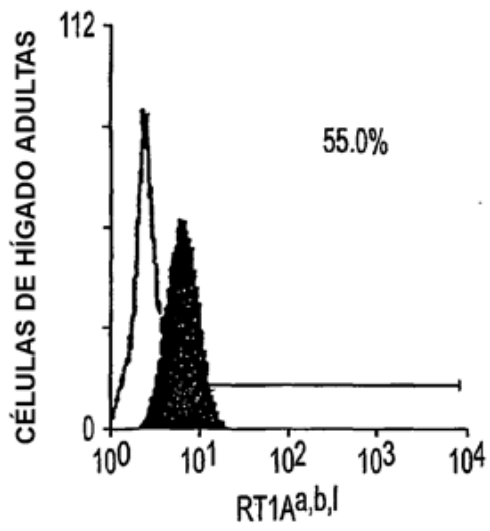


FIG. 3U

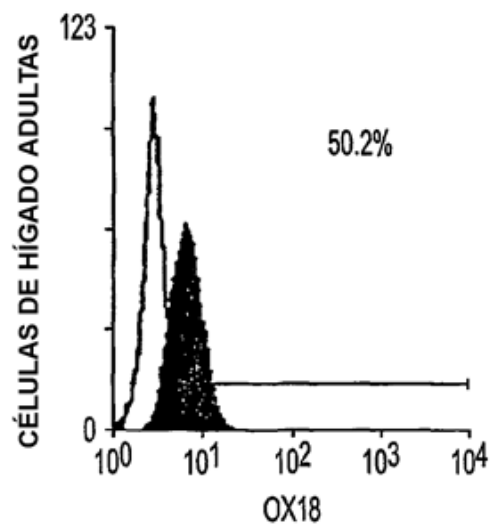


FIG. 3V

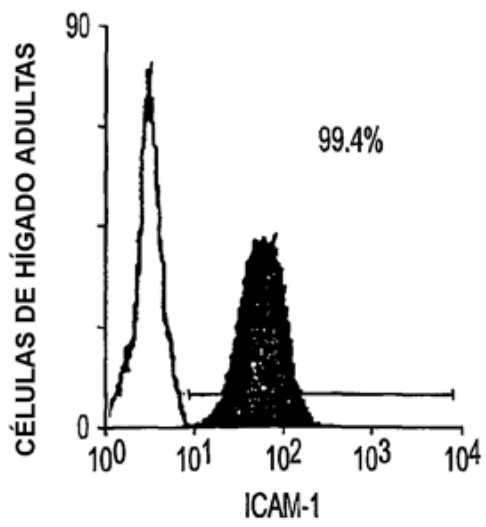


FIG. 3W

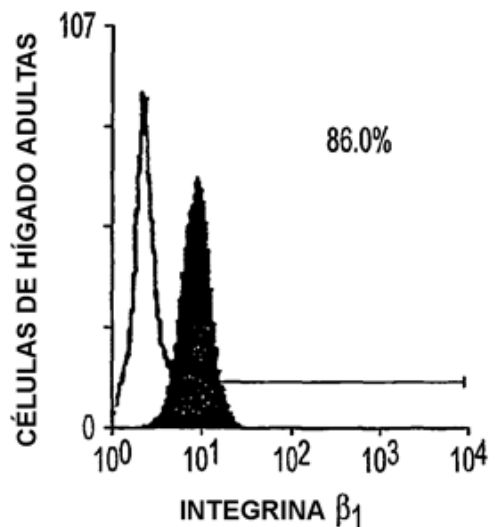


FIG. 3X

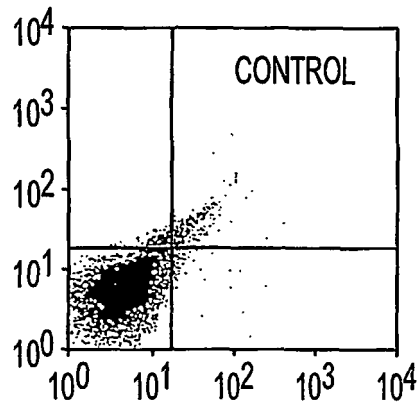


FIG. 4A-1

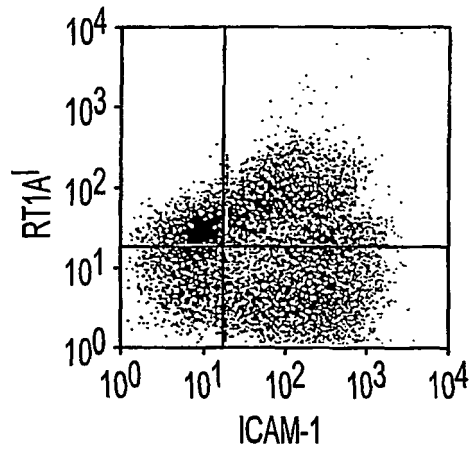


FIG. 4A-2

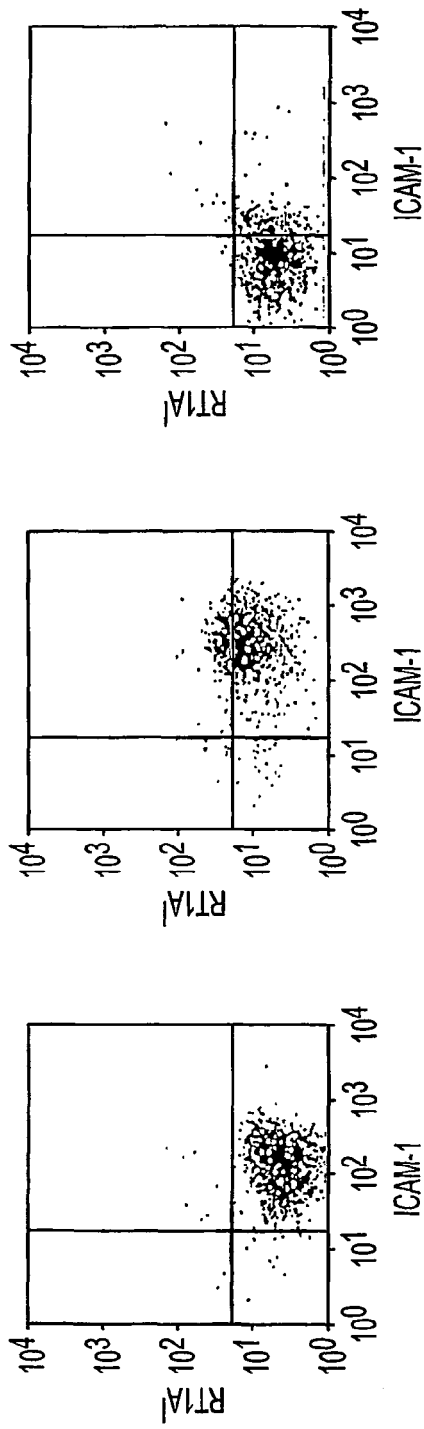


FIG. 4B-1

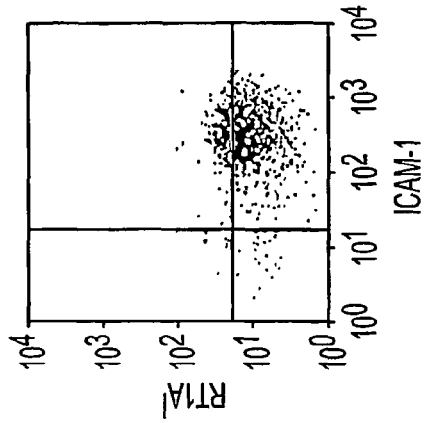


FIG. 4B-2

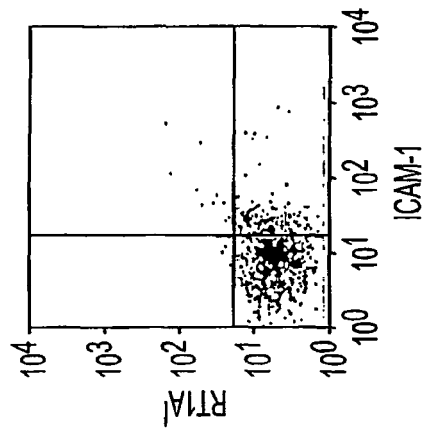


FIG. 4B-3

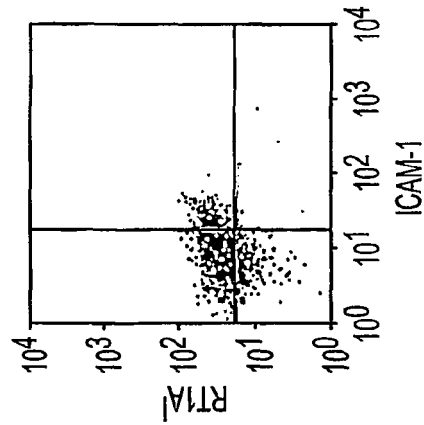


FIG. 4B-4

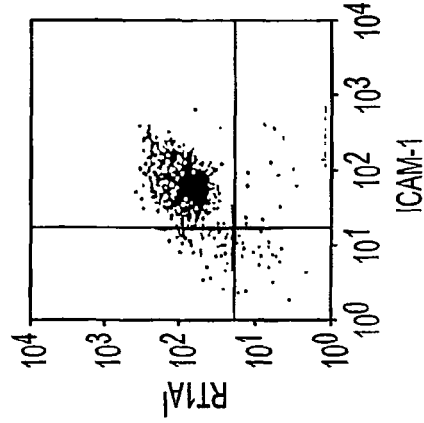


FIG. 4B-5

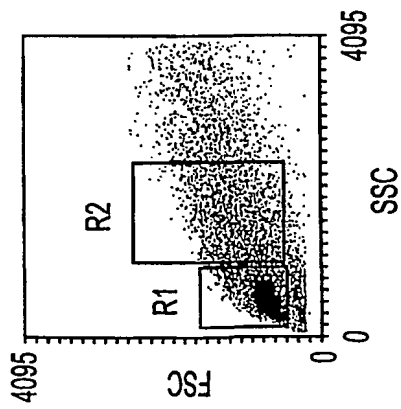


FIG. 4C-1

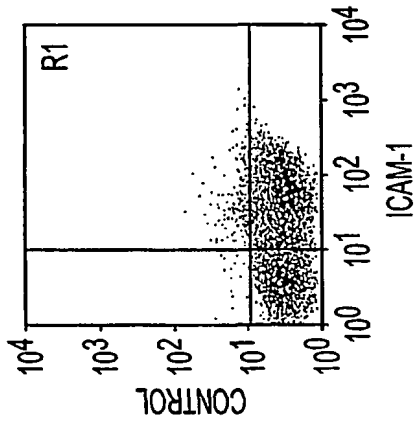


FIG. 4C-2

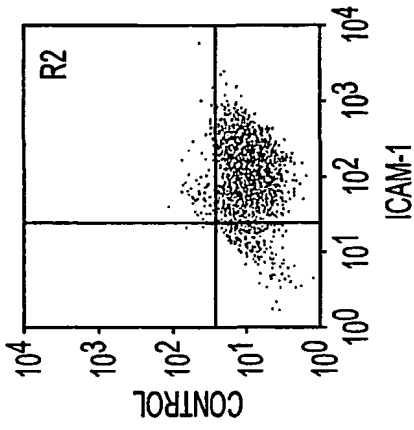


FIG. 4C-4

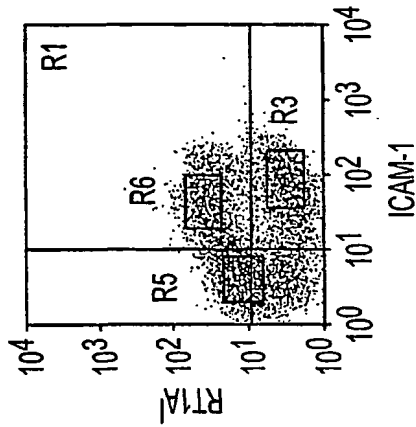


FIG. 4C-3

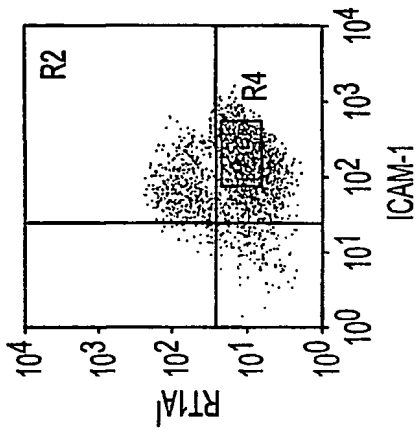


FIG. 4C-5

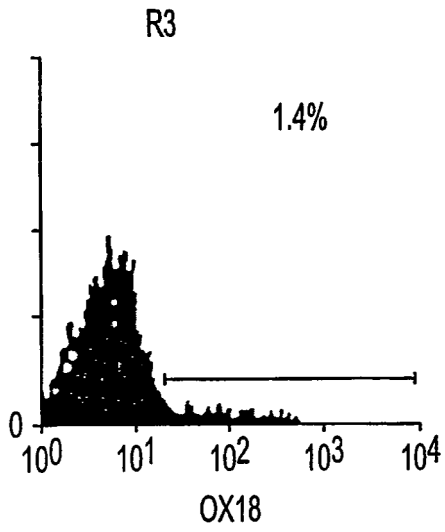


FIG. 4D-1

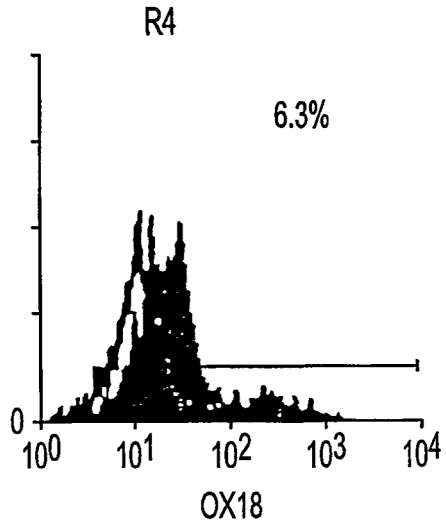


FIG. 4D-2

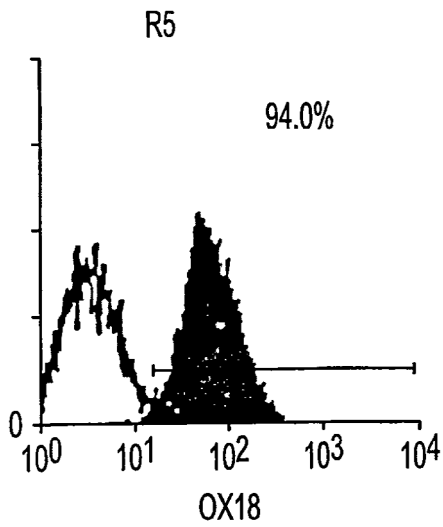


FIG. 4D-3

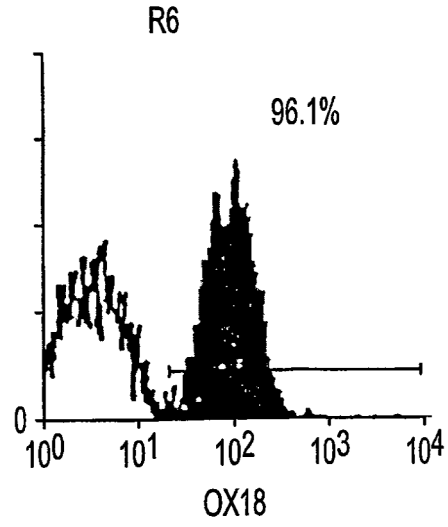


FIG. 4D-4

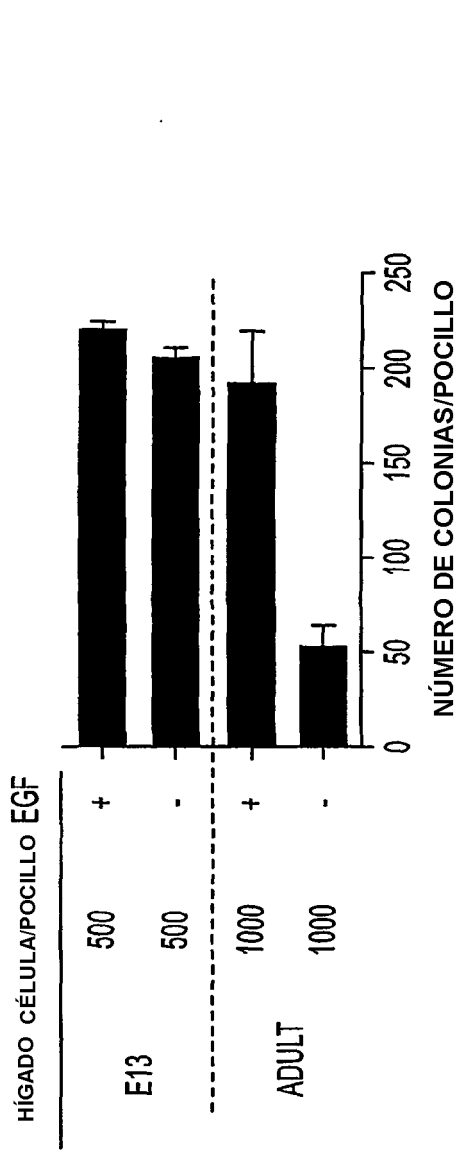


FIG. 5A

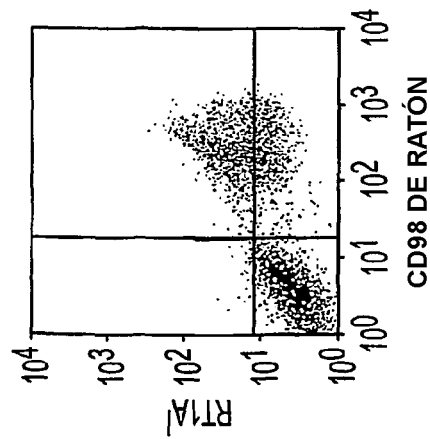


FIG. 5B

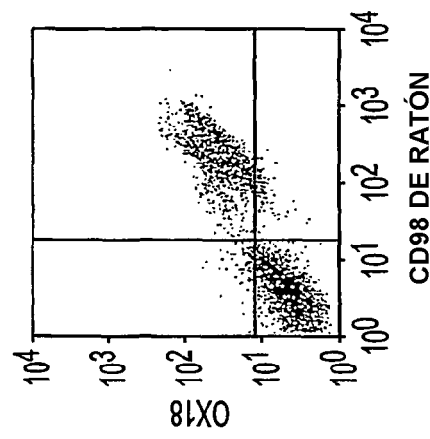


FIG. 5C

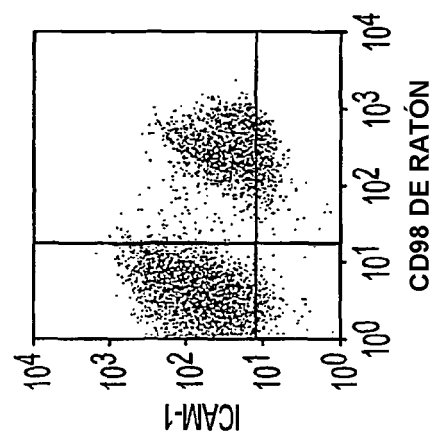


FIG. 5D

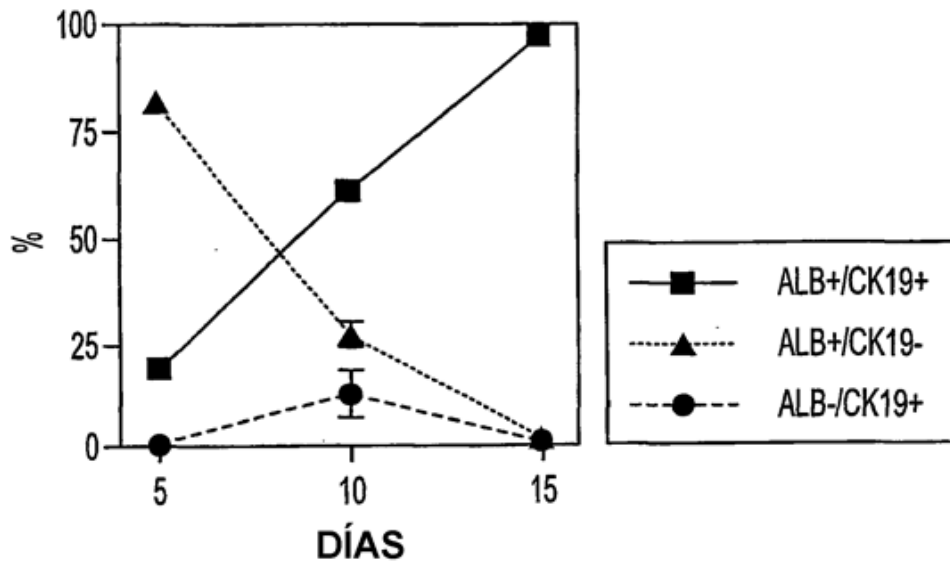


FIG. 6A

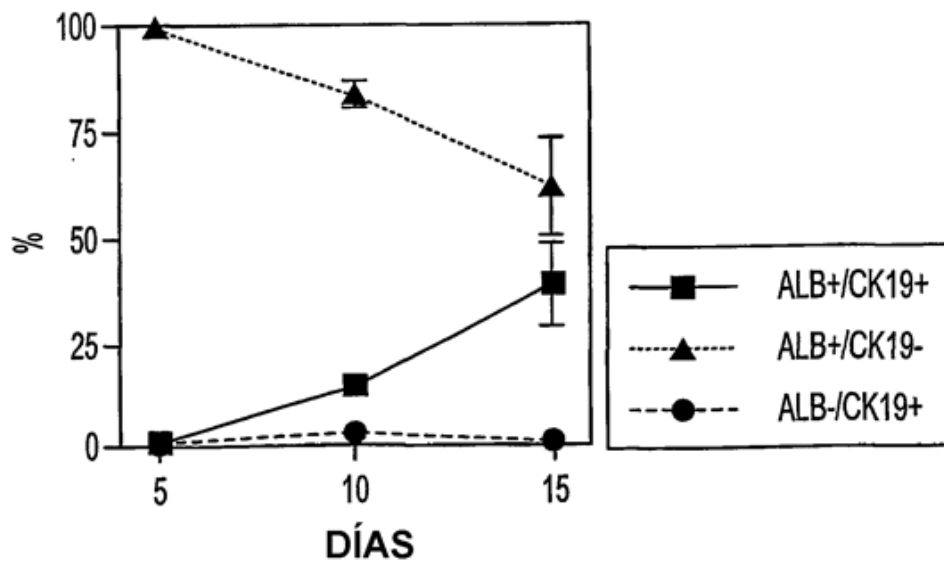


FIG. 6B

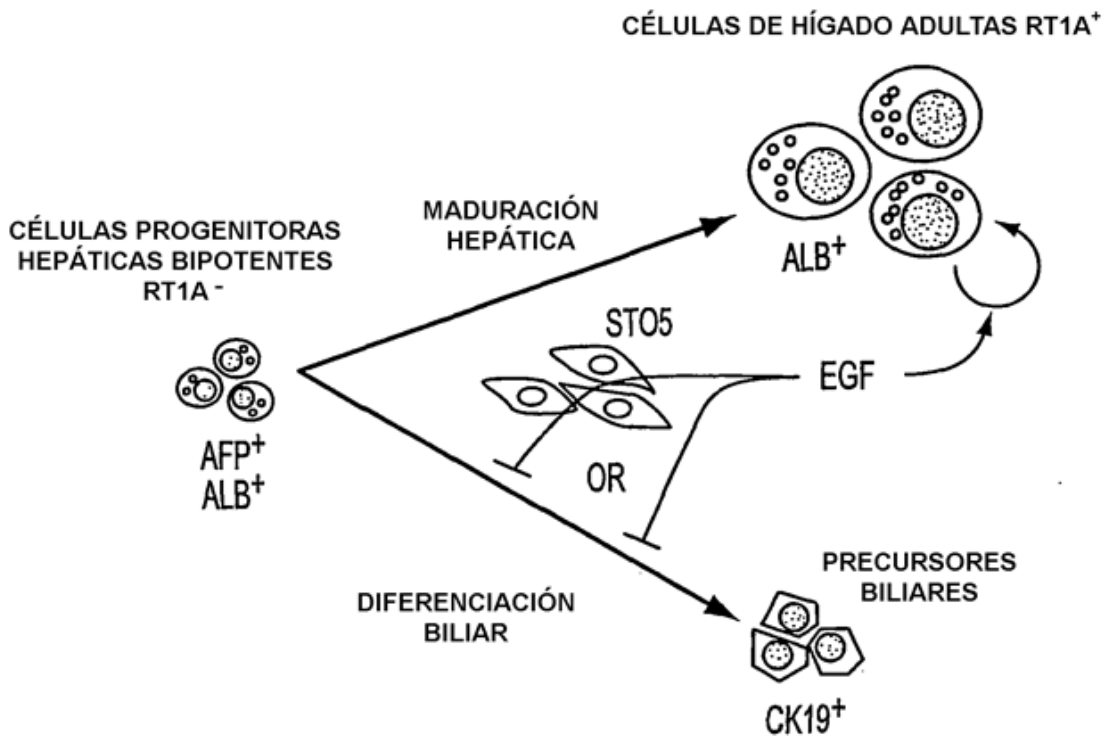


FIG. 7