

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 248**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 35/407 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05708747 .0**
96 Fecha de presentación: **14.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1711597**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Células progenitoras hepáticas humanas y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:
14.01.2004 US 536405 P
27.10.2004 US 623003 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2012

73 Titular/es:
NOVAHEP AB
DROTTNINGGATAN 33, BOX 7710
103 95 STOCKHOLM, SE

72 Inventor/es:
HOLGERSSON, Suchitra

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 248 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

Células progenitoras hepáticas humanas y métodos de uso de las mismas

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a células progenitoras.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La insuficiencia hepática aguda sigue siendo un problema importante de alta mortalidad. A pesar de la alta incidencia de enfermedades que dan como resultado disfunción e insuficiencia hepática, los principales avances de las terapias médicas están actualmente limitados a la prevención y el tratamiento de ciertas formas de hepatitis vírica. Las enfermedades hepáticas agudas y crónicas siguen tratándose con enfoques sintomáticos en lugar de curativos. El trasplante hepático ortotópico ha sido hasta ahora la única terapia disponible para pacientes con insuficiencia hepática terminal. Desgraciadamente, la disponibilidad de órganos donantes es limitada y muchos pacientes mueren cada año esperando trasplantes de hígado. Recientemente, se ha usado como terapia alternativa el trasplante de hepatocitos sanos a hígado enfermo. Sin embargo, la escasez de donantes de órganos ha limitado la aplicación clínica del trasplante de células hepatocíticas.

La terapia celular con citoblastos y su progenie es un nuevo y prometedor enfoque para la necesidad médica ampliamente insatisfecha en pacientes con enfermedades hepáticas. Una serie de estudios han examinado el potencial del trasplante de citoblastos/células progenitoras (obtenidos de tejidos extrahepáticos e intrahepáticos) en insuficiencia hepática aguda inducida experimentalmente. Aunque los citoblastos/células progenitoras de órganos adultos pueden generar células hepáticas funcionales, dichas células son escasas. Beneficiarían en gran medida la capacidad de producir grandes cantidades de estas células que retuviesen sus funciones definitivas completas protocolos terapéuticos clínicos que implicaran el trasplante de células progenitoras hepáticas para mejorar enfermedades heredadas y adquiridas.

Por tanto, existe la necesidad de una fuente de células progenitoras hepáticas que puedan diferenciarse en células hepáticas funcionales.

25 SUMARIO DE LA INVENCION

La invención está basada en el descubrimiento de una célula progenitora hepática. La célula progenitora es multipotente. La célula progenitora es capaz de diferenciarse *in vivo* en un hepatocito, colangiocito o célula endotelial hepática (concretamente, una célula sinusoidal). Por consiguiente, la invención proporciona una población celular aislada como se define en la reivindicación 1. La población es un cultivo de adhesión. Como alternativa, las células de la población están en suspensión. La célula deriva de tejido hepático, tal como tejido hepático fetal. El tejido es de un ser humano. La célula es inmunorreactiva con CD117 y CD34 y no inmunorreactiva con Lin. Las células proliferan *in vitro*. Las células son capaces de duplicarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25 o más veces y mantener su capacidad de diferenciarse en hepatocitos, colangiocitos o células endoteliales hepáticas.

Se proporcionan también métodos de producción de un hepatocito o colangiocito hepático humano o una célula sinusoidal hepática humana mediante la diferenciación de cultivos de células progenitoras hepáticas en un medio de cultivo que contenga uno o más factores de diferenciación como se definen en las reivindicaciones 5 y 6. Los factores de diferenciación incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).

La invención expone adicionalmente el uso de una célula progenitora hepática multipotente que es CD117⁺, CD34⁺, CD45⁻ y Lin⁻ en la fabricación de una composición para trasplante a un hospedador, por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano, primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo o cerdo. Opcionalmente, se cotransplantan al hospedador células estromáticas hepáticas fetales o células mesenquimáticas hepáticas fetales. El uso de células derivadas de embriones humanos no está comprendido. Se administra al hospedador factor de crecimiento de hepatocitos antes, después o concomitantemente con las células progenitoras. El hospedador padece un trastorno hepático o daño de tejido hepático. Por ejemplo, el sujeto padece hepatitis, cirrosis, cáncer hepático, esteatosis hepática, síndrome de Reye, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, quistes hepáticos o enfermedad de Wilson. El trasplante confiere un beneficio clínico, por ejemplo, aliviar uno o más síntomas del trastorno hepático particular. Los trastornos hepáticos se diagnostican por un médico usando métodos conocidos en la materia.

Se identifican los compuestos que afectan a la proliferación, diferenciación o supervivencia de células hepáticas poniendo en contacto el cultivo de células progenitoras hepáticas con un compuesto de ensayo y determinando si el compuesto tiene efecto sobre la proliferación, diferenciación o supervivencia de las células. De forma similar, se determina el metabolito de un compuesto de ensayo. Los metabolitos se identifican cribando el medio de cultivo después de poner en contacto el cultivo con el compuesto de ensayo. Los metabolitos se identifican mediante métodos conocidos en la materia tales como HPLC, espectroscopia de masas o electroforesis en gel. La actividad antivírica de un compuesto de ensayo se determina introduciendo un virus en un cultivo de células progenitoras en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo y determinando la tasa de supervivencia de las células. Un

aumento de la tasa de supervivencia en presencia del compuesto de ensayo en comparación con en ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo tiene actividad antivírica. La infectividad de un virus se determina poniendo en contacto un cultivo de células progenitoras con un virus y determinando el efecto sobre la proliferación o supervivencia de las células. Una reducción de la supervivencia o proliferación en comparación con un cultivo celular que no se ha puesto en contacto con el virus indica que el virus puede infectar células hepáticas. En contraposición, una similitud de la supervivencia o proliferación en comparación con un cultivo celular que no se ha puesto en contacto con el virus indica que el virus no infecta células hepáticas.

Opcionalmente, el cultivo se diferencia antes de poner en contacto el cultivo con un compuesto de ensayo. La proliferación o supervivencia se determinan mediante métodos conocidos en la materia tales como el ensayo de BrdU. La diferenciación se determina morfológica o histológicamente determinando marcadores de superficie celular hepática. El virus es un virus trófico hepático tal como virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un especialista en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales adecuados a continuación. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Resultarán evidentes otros rasgos y ventajas de la invención a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es una serie de análisis por FACS y fotografías que muestran la caracterización de células progenitoras hepáticas humanas: a, las células de HF clasificadas magnéticamente inmediatamente después del aislamiento se teñían doblemente por CD117 y CD34, pero negativamente por CD90, CD45, albúmina y citoqueratina 19 (CK19); b, las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ crecían en colonias al cultivarse, y el primer marcador en expresarse era el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met), n° de aumentos: 40x; c, las células recién aisladas y propagadas en diversos pases daban lugar a ALB⁻CK19⁻ (flecha blanca), ALB⁺ (verde), CK19⁺ (rojo), ALB⁺CK19⁻ (verde, hepatocitos) y ALB⁻CK19⁺ (rojo, colangiocitos), n° de aumentos: 60x; d, las células adherentes CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ clasificadas magnéticamente, cuando se cultivaban en medio de cultivo que contenía factor de crecimiento endotelial vascular, se diferenciaban en células endoteliales Flk-1⁺ (~50%), colangiocitos CK19⁺ (~13%) y hepatocitos albúmina⁺ (~17%). Aproximadamente un 20% de las células no expresaban ninguno de estos marcadores.

La Fig. 2A es un gráfico de barras que muestra la proliferación de progenitores hepáticos y su progenie. El uso de medio acondicionado (MA) al 20% aumentaba significativamente la proliferación de células progenitoras hepáticas y pudieron someterse a pases varias veces en comparación a sin MA (p<0,001, prueba de t de Student).

La Figura 2B es un gráfico de barras que muestra los resultados de análisis citométricos de flujo que demuestran que se observó una alta proliferación (células BrdU⁺) en células albúmina⁺CK19⁺, albúmina⁺CK19⁻ y albúmina⁻CK19⁺, mientras que la células negativas dobles (albúmina⁻CK19⁻) eran más quiescentes.

La Figura 2C es una serie de fotografías que muestran células progenitoras hepáticas en diversos pases, teñidas con fluorescencia por albúmina (verde) y CK19 (rojo) y enzimáticamente para la detección de la incorporación de BrdU, mostrando capacidad proliferativa en diversas subpoblaciones, n° de aumentos: 40x.

Las Figuras 3A-3N son una serie de fotografías de la localización de células progenitoras hepáticas humanas en el hígado de ratón. **a-b**, Hibridación *in situ* con sonda centromérica humana que muestra señales nucleares en hígado humano (DAB) pero no en hígado de ratón. **c-d**, Usando la inmunohistoquímica, se obtuvieron resultados similares con un anticuerpo anti-núcleos humanos (DAB-Ni). **e-j**, Las células recién aisladas (**e-g**), del 6° y 12° pases, cuando se transplantaban a ratones tratados con D-galactosamina (GalN), mostraban diferenciación en hepatocitos, colangiocitos y células endoteliales (flechas de DAB-Ni). **k**, Se observaron células transplantadas en los hígados, **l-m**, pero no en los bazo ni pulmones de ratones tratados con GalN. **n**, Se usaron hígados de ratones transplantados ficticiamente como controles, n° de aumentos: 60x.

Las Fig. 4A-J son una serie de fotografías que muestran el destino *in vivo* de células progenitoras hepáticas humanas. **a-d**, Las células progenitoras hepáticas humanas un mes después del trasplante a ratones tratados con GalN contenían glucosa-6-fosfatasa (marrón), glucógeno (rosa), dipeptidil peptidasa IV (rojo-marrón) y gamma-glutamil transpeptidasa (marrón). La doble tinción con anticuerpo anti-núcleos humanos (DAB-Ni, flechas) visualizó los núcleos humanos (negro). **e**, Regeneración de un segmento de tejido de ratón completo por progenitoras hepáticas humanas (núcleos negros, flechas). **f**, No se observó expresión de citoqueratina 19 (rojo-marrón) ni **g-j**, albúmina humana (verde) en los ratones transplantados ficticiamente, pero se observó (flechas) en los hígados de ratones tratados con GalN que se habían transplantado con células progenitoras hepáticas humanas recién aisladas y del 6° y 12° pases. **a-j**, (N° de aumentos: 60x). **f**, (N° de aumentos: 200x).

La Figura 4K es una fotografía que muestra la transcripción de genes específicos de hígado humano en hígado de ratón. Se detectaron citoqueratina 19, α -fetoproteína y albúmina humanas en los hígados de ratones tratados con GalN que recibieron células progenitoras hepáticas humanas, pero no en los ratones transplantados ficticiamente. Sin embargo, la α 1-antitripsina estaba ligeramente amplificada también en el control. Se usó glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como gen doméstico.

La Figura 5 es una serie de fotografías que demuestran los efectos del cotransplante de células estromáticas de hígado fetal y células progenitoras de hígado fetal. **A**, La sección de hígado humano normal teñida con anticuerpo anti-núcleos humanos mostraba tinción positiva (negro/marrón). **B**, La sección de hígado de ratón normal no mostraba tinción positiva con el mismo anticuerpo, demostrando la especificidad del anticuerpo. **C**, Los ratones tratados con retrorsina (30 mg/kg), seguida de hepatectomía parcial e inyección subcutánea del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) seguido de transplante de células progenitoras del hígado fetal, no resultaron con un alto injerto de células. **D**, Tratar los ratones con retrorsina (30 mg/kg), seguido de hepatectomía parcial e inyección de células estromáticas aisladas de hígados fetales no daba como resultado un alto injerto de células. **E-H**, Tratar los ratones con retrorsina (30 mg/kg), seguido de hepatectomía parcial y transplante de una mezcla de células estromáticas y progenitoras/citoblastos de hígado fetal daba como resultado un alto injerto de citoblastos. **I-K**, Tratar los ratones con retrorsina (30 mg/kg), seguido de hepatectomía parcial e inyección subcutánea de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) seguido de transplante de células estromáticas y progenitoras de hígado fetal daba como resultado un alto injerto de células.

La Figura 6 es un gráfico que muestra los niveles de detección del factor VIII humano en ratones negros C57 atímicos normales y ratones negros C57 tratados de diversos modos.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la expresión de diversos marcadores de superficie celular hematopoyéticos, hepáticos y pancreáticos en hígados fetales y adultos.

La Figura 8 es una serie de fotografías que muestran marcadores hepáticos en hígado fetal y adulto humano.

La Figura 9A es una serie de análisis por FACS que muestran la caracterización de células progenitoras hepáticas humanas.

Las Figuras 9B-F son una serie de fotografías que muestran la morfología de células progenitoras hepáticas humanas sobre diferentes matrices.

La Figura 10A es una fotografía de una transferencia Northern que muestra la expresión génica de marcadores hepáticos en células progenitoras hepáticas humanas.

La Figura 10B es un gráfico que demuestra la expresión génica de marcadores hepáticos en células progenitoras hepáticas humanas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención está basada en el descubrimiento inesperado de una población definida de células progenitoras no hematopoyéticas en el hígado fetal humano que se propagan *in vitro* durante varios pases y mantienen un fenotipo progenitor. Estas células, cuando se transplantan a animales con lesión hepática aguda, exhibían diferenciación funcional en hepatocitos, colangiocitos y células sinusoidales.

Las enfermedades hepáticas incluyen un amplio espectro de afecciones tanto agudas como crónicas asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas en todo el mundo. El transplante de hepatocitos tiene un enorme potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades hepáticas, pero su uso clínico está obstaculizado por la falta de tejido donante. La generación de hepatocitos *in vitro* a partir de progenitoras de células hepáticas adultas o fetales, o la identificación de una población progenitora que pueda generar *in vivo* células hepáticas maduras, resolvería este problema. Los datos descritos en la presente memoria demuestran la identificación de una población definida de células de hígados fetales humanos que se propagan exitosamente *ex vivo* durante varios pases y, cuando se transplantan a animales con lesión hepática aguda, exhiben diferenciación funcional en hepatocitos, colangiocitos y células sinusoidales. La propagación y diferenciación *in vivo* exitosas de las células progenitoras hepáticas son útiles para el transplante de células hepáticas, el ensayo metabólico y toxicológico de candidatos a fármacos terapéuticos y un vehículo para la terapia génica.

La presente invención proporciona métodos para inducir a células progenitoras hepáticas humanas multipotentes de tejido de hígado fetal humano a proliferar *in vitro* y generar grandes cantidades de progenie de células progenitoras humanas multipotentes capaces de diferenciarse en hepatocitos, colangiocitos y células sinusoidales. Se proporcionan también métodos de diferenciación de la progenie de células progenitoras hepáticas humanas.

Células progenitoras hepáticas humanas

La invención proporciona una población celular consistente en células progenitoras hepáticas humanas (designadas en la presente memoria como CPH) como se definen en la reivindicación 1. Una célula CPH es una célula

indiferenciada que puede inducirse a proliferar usando los métodos de la presente invención. La CPH es capaz de automantenimiento, de tal modo que con cada división celular al menos una célula hija será también una célula CPH. Las CPH pueden propagarse 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más veces.

5 El fenotipado de las CPH revela que estas células no expresan ningún marcador hematopoyético asignado, sin embargo, las células expresan marcadores de citoblastos. Por ejemplo, una CPH es inmunorreactiva con CD117 y CD34 y no inmunorreactiva con el antígeno de superficie de linaje (Lin). La CPH es una célula progenitora multipotente. Se entiende por célula progenitora multipotente que la célula es capaz de diferenciarse en más de un tipo celular. Por ejemplo, la célula es capaz de diferenciarse en un hepatocito, un colangiocito o una célula sinusoidal.

10 La CD117 es también conocida como c-kit, receptor de factor de Steel o receptor de factor de citoblasto. La CD117 es una glucoproteína de superficie celular de 145 kDa que pertenece a la familia de tirosina cinasas receptoras de clase III. Se expresa en la mayoría de células progenitoras hematopoyéticas, incluyendo citoblastos hematopoyéticos multipotentes, así como en las células precursoras asignadas mieloides, eritroides y linfoides. La CD117 se expresa también en unas pocas células hematopoyéticas maduras, por ejemplo, mastocitos. La CD34 es una glucoproteína transmembrana monocatenaria de 110 kDa expresada en células progenitoras hematopoyéticas linfoides y mieloides humanas. El antígeno de superficie de linaje es una mezcla de de 13 a 14 diferentes proteínas de superficie celular que son marcadores de linajes de células sanguíneas maduras.

15 Las CPH se obtienen a partir de tejido hepático embrionario. El tejido hepático puede obtenerse a partir de cualquier animal que tenga tejido hepático tal como peces, reptiles, aves, anfibios y mamíferos, por ejemplo preferiblemente roedores, tales como ratones, y seres humanos. El tejido se obtiene a partir de un feto que es de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas de edad. Las CPH representan aproximadamente un 0,5-0,7% de todo el hígado fetal.

Las CPH pueden mantenerse *in vitro* en cultivos a largo plazo. Las CPH pueden someterse a pases de cultivo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más veces.

25 Antes del trasplante, las CPH recién aisladas (células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻) no expresaban albúmina ni CK19. Sin embargo, después del trasplante, estas células se diferenciaban en hepatocitos y colangiocitos maduros, como se determina mediante la expresión de albúmina, CK19, G-6-P, GGT, DPPIV y glucógeno humanos, y tenían una alta capacidad proliferativa. Las células progenitoras hepáticas expresaban los dos marcadores hematopoyéticos asociados c-kit y CD34, pero no CD45, el marcador que distingue las células hematopoyéticas de las células no hematopoyéticas. Por tanto, las CPH con amplia capacidad proliferativa descritas en la presente memoria no son de origen hematopoyético. Además, al contrario de la capacidad limitada de propagarse *in vitro* de los citoblastos hematopoyéticos adultos, las progenitoras hepáticas de hígados fetales tienen una alta capacidad proliferativa. La observación de que no todas las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ aisladas se adherían a la placa de cultivo y se diferenciaban en células hepáticas durante el cultivo *in vitro* indica que solo una subpoblación de estas células son progenitoras de células hepáticas. Las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻, cuando se cultivan en medio que contienen HGF y EGF, daban lugar a cuatro tipos de células: hepatocitos ALB⁻CK19⁻, ALB⁺CK19⁺ y ALB⁺CK19⁻ y colangiocitos ALB⁻CK19⁻. Excepto para las células negativas dobles, todas las demás subpoblaciones tenían una alta fracción de células proliferantes (BrdU⁺). El subconjunto de células ALB⁻CK19⁻ era altamente quiescente *in vitro*, sin embargo, *in vivo* el aumento de 10 veces del número de células transplantadas en el pase P0 indica que estas células pueden tener una alta capacidad proliferativa. A pesar de la alta capacidad proliferativa de las células progenitoras hepáticas, no se observaron tumores *in vivo* cuatro semanas después del trasplante de células humanas. De forma interesante, las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ de hígados fetales tempranos, cuando se crecían en medio que contiene VEGF, no se diferenciaban solo en hepatocitos y colangiocitos, sino también en células endoteliales sinusoidales.

Condiciones de cultivo

45 Las CPH se hacen proliferar usando los métodos descritos en la presente memoria. Las células se obtienen a partir de tejido de donante mediante la disociación de células individuales de la matriz extracelular conectiva del tejido. Se retira el tejido de fetos usando un procedimiento estéril, y se disocian las células usando cualquier método conocido en la materia, incluyendo el tratamiento con enzimas tales como tripsina, colagenasa y similares, o usando métodos físicos de disociación tales como con un instrumento como un homogeneizador. La disociación de células fetales puede llevarse a cabo en medio de cultivo de tejido.

50 Por ejemplo, puede llevarse a cabo la disociación de células en 0,1% de tripsina y 0,05% de ADNasa en DMEM. Las células disociadas se centrifugan a baja velocidad, a entre 200 y 2000 rpm, habitualmente a entre 400 y 800 rpm, y se resuspenden entonces en un medio de cultivo. Las células hepáticas pueden cultivarse en suspensión o sobre un sustrato fijo. Se siembran las suspensiones de células disociadas en cualquier recipiente capaz de mantener las células, particularmente matraces de cultivo, placas de cultivo o matraces giratorios, y más particularmente en matraces de cultivo pequeños tales como matraces de cultivo de 25 cm². Las células cultivadas en suspensión se resuspenden a aproximadamente 5 x 10⁴ a 2 x 10⁵ células/ml (por ejemplo, 1 x 10⁵ células/ml). Se siembran las células sembradas sobre un sustrato fijo a aproximadamente 2-3 x 10³ células/cm². Opcionalmente, se recubren las placas de cultivo con una proteína de matriz tal como colágeno. Las células hepáticas disociadas pueden disponerse en cualquier medio de cultivo conocido capaz de mantener el crecimiento celular, incluyendo HEM, DMEM, RPMI, F-

12 y similares, que contenga los suplementos necesarios para el metabolismo celular tales como glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas tales como transferrina y similares. El medio de cultivo puede contener también antibióticos para evitar la contaminación con levadura, bacterias y hongos tales como penicilina, estreptomycin, gentamicina y similares. El medio de cultivo puede contener suero derivado de vacas, caballos, pollos y similares.

Las condiciones de cultivo deberían ser cercanas a las condiciones fisiológicas. El pH del medio de cultivo debería ser cercano al pH fisiológico (por ejemplo, entre pH 6-8, entre aproximadamente pH 7-7,8 o pH 7,4). Las temperaturas fisiológicas están en el intervalo entre aproximadamente 30 y 40°C. Las CPH se cultivan a temperaturas entre aproximadamente 32 y aproximadamente 38°C (por ejemplo, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 37°C).

Opcionalmente, el medio de cultivo se suplementa con al menos un factor de crecimiento inductor de la proliferación ("mitogénico"). Un "factor de crecimiento" es una proteína, péptido u otra molécula que tiene un efecto inductor del crecimiento, de la proliferación, inductor de la diferenciación o trófico sobre las CPH. Los "factores de crecimiento inductores de la proliferación" son factores tróficos que permiten a las CPH proliferar, incluyendo cualquier molécula que se una a un receptor sobre la superficie de la célula para ejercer un efecto trófico o inductor del crecimiento sobre la célula. Los factores de crecimiento inductores de la proliferación incluyen EGF, anfirregulina, factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF o FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2), factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), VEGF y combinaciones de los mismos. Los factores de crecimiento se añaden habitualmente al medio de cultivo a concentraciones en el intervalo entre aproximadamente 1 ng/ml y 1 mg/ml. Las concentraciones entre aproximadamente 1 y 100 ng/ml son habitualmente suficientes. Pueden efectuarse fácilmente ensayos de valoración sencillos para determinar la concentración óptima de un factor de crecimiento particular.

Los efectos biológicos de los factores de crecimiento y tróficos están generalmente mediados por la unión a receptores de superficie celular. Se han identificado los receptores de una serie de estos factores y están disponibles anticuerpos y sondas moleculares para receptores específicos. Puede analizarse en las CPH la presencia de receptores de factor de crecimiento en todas las etapas de diferenciación. En muchos casos, la identificación de un receptor particular proporciona la guía para la estrategia de uso en la diferenciación adicional de las células a lo largo de rutas de desarrollo específicas con la adición de factores de crecimiento o tróficos exógenos.

Generalmente, después de aproximadamente 3-10 días *in vitro*, se retiran mediante aspiración del medio las CPH en proliferación y se añade medio reciente al matraz de cultivo. Opcionalmente, se recoge el medio aspirado, se filtra y se usa como medio acondicionado para pases posteriores de las CPH. Por ejemplo, se usa el medio acondicionado al 10%, 20%, 30%, 40% o más.

El cultivo de células CPH puede someterse fácilmente a pases para reiniciar la proliferación. Por ejemplo, después de 3-7 días *in vitro*, se agitan bien los matraces de cultivo y se transfieren entonces las CPH a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugan a baja velocidad. Se aspira el medio y se resuspenden las CPH en una pequeña cantidad de medio de cultivo. Se cuentan entonces las células y se resiembran a la densidad deseada para reiniciar la proliferación. Este procedimiento puede repetirse semanalmente para dar como resultado un aumento logarítmico del número de células viables en cada pase. Se continúa el procedimiento hasta obtener el número deseado de CPH.

Las CPH y progenie de CPH pueden crioconservarse mediante cualquier método conocido en la materia hasta que sean necesarias (véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.071.741, solicitudes de patente internacional PCT WO93/14191, WO95/07611, WO96/27287, WO96/29862 y WO98/14058, Karlsson *et al.*, 65 *Biophysical J.* 2524-2536 (1993)). Las CPH pueden suspenderse en una disolución isotónica, preferiblemente un medio de cultivo celular, que contenga un crioconservante particular. Dichos crioconservantes incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol y similares. Estos crioconservantes se usan a una concentración de 5-15% (por ejemplo, 8-10%). Las células se congelan gradualmente a una temperatura de -10 a -150°C (por ejemplo, de -20 a -100°C o de -70 a -80°C).

Diferenciación de células progenitoras hepáticas humanas

Dependiendo de las condiciones de cultivo, las CPH pueden diferenciarse en hepatocitos, colangiocitos o células sinusoidales.

Las CPH pueden diferenciarse en hepatocitos o colangiocitos cultivando las CPH sobre un sustrato fijo en un medio de cultivo con HGF y EGF. Como alternativa, las CPH pueden diferenciarse en células sinusoidales cultivando las CPH sobre un sustrato fijo en un medio de cultivo con VEGF.

La diferenciación de las CPH puede inducirse también mediante cualquier método conocido en la materia que active la cascada de eventos biológicos que conduce al crecimiento, lo que incluye la liberación de trifosfato de inositol y Ca²⁺ intracelular, la liberación de diacilglicerol y la activación de proteína cinasa C y otras cinasas celulares y similares. El tratamiento con ésteres de forbol, factores de crecimiento inductores de la diferenciación y otras señales químicas puede inducir la diferenciación. En lugar de factores de crecimiento inductores de la proliferación para la proliferación de CPH (véase anteriormente), pueden añadirse factores de crecimiento inductores de la

diferenciación al medio de cultivo para influir en la diferenciación de las CPH. Otros factores de crecimiento inductores de la diferenciación incluyen factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), hormona liberadora de tirotrópina (TRH), factor de crecimiento transformante beta (TGF β), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) y similares.

- 5 Los hepatocitos, colangiocitos o células sinusoidales diferenciados se detectan usando técnicas inmunocitoquímicas conocidas en la materia. La inmunocitoquímica (por ejemplo, inmunofluorescencia de doble marcador y métodos de inmunoperoxidasa) usa anticuerpos que detectan proteínas celulares para distinguir las características celulares o propiedades fenotípicas de las células hepáticas. Los marcadores celulares de los hepatocitos y colangiocitos incluyen albúmina y CK10, mientras que los marcadores celulares de células sinusoidales incluyen Flk. Otros marcadores adecuados incluyen glucosa-6-fosfatasa, glucógeno, dipeptidil peptidasa IV y gamma-glutaril transpeptidasa.

La inmunocitoquímica puede usarse también para identificar células hepáticas, detectando la expresión de genes hepáticos responsables de la función hepática tales como albúmina, alfa-1-antitripsina, CK-19, α -proteína fetal o factor VIII humano.

- 15 Puede efectuarse también una histoquímica de hibridación *in situ* usando sondas de ADNc o ARN específicas del ARNm de genes hepáticos. Estas técnicas pueden combinarse con métodos inmunocitoquímicos para potenciar la identificación de fenotipos específicos. Si es necesario, pueden aplicarse los anticuerpos y sondas moleculares discutidos anteriormente a procedimientos de transferencia Western y Northern respectivamente para ayudar a la identificación de células.

20 Transplante de células progenitoras hepáticas humanas

El transplante de nuevas células a hígado dañado tiene el potencial de reparar el tejido hepático dañado, restableciendo así la función hepática. Opcionalmente, se cotransplantan células estromáticas fetales y/o HGF con las CPH. Sin embargo, la ausencia de células adecuadas con fines de transplante ha evitado que se alcanzase el potencial completo de este procedimiento. Las células "adecuadas" son células que satisfacen los siguientes criterios: (1) pueden obtenerse en grandes cantidades; (2) pueden hacerse proliferar *in vitro* permitiendo la inserción de material genético, si es necesario; (3) son capaces de sobrevivir indefinidamente y facilitar la reparación hepática al transplantarse al hígado y (4) son no inmunogénicas, obtenidas preferiblemente a partir de tejido del propio paciente o de un donante compatible.

- 30 Las CPH obtenibles a partir de tejido hepático fetal, que pueden dividirse durante periodos prolongados mantenidas *in vitro* usando las condiciones de cultivo descritas en la presente memoria, satisfacen todos los requisitos deseables de células adecuadas con fines de transplante hepático y son una estirpe celular particularmente adecuada, ya que las células no se han inmortalizado y no son de origen tumorigénico. El uso de CPH en el tratamiento de trastornos hepáticos puede demostrarse mediante el uso de modelos animales.

- 35 Las CPH se administran a cualquier animal con síntomas hepáticos anormales o de insuficiencia hepática. Las CPH pueden prepararse a partir de tejido donante que sea xenogénico para el hospedador. Para que los xenoinjertos sean exitosos, se emplea habitualmente algún método de reducción o eliminación de la respuesta inmunitaria al tejido implantado. Por tanto, los receptores de CPH pueden inmunosuprimirse mediante el uso de fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina o mediante estrategias de inmunosupresión local que emplean inmunosupresores aplicados localmente. La inmunosupresión local se da a conocer por Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992). La patente de Estados Unidos 5.026.365 da a conocer métodos de encapsulación adecuados para inmunosupresión local.

- 45 Como alternativa a emplear técnicas de inmunosupresión, pueden aplicarse a las CPH métodos de sustitución o bloqueo génico usando recombinación homóloga en citoblastos embrionarios, como enseñan Smithies *et al.*, 317 Nature 230-234 (1985), y extenderse a la sustitución o bloqueo génico en estirpes celulares (Zheng *et al.*, 88 Proc. Natl. Acad. Sci. 8067-8071 (1991)), para la anulación de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las CPH que carecen de expresión de MHC permiten el injerto de poblaciones de células hepáticas enriquecidas a través de la barrera de histocompatibilidad alogénica, y quizás incluso xenogénica, sin necesidad de inmunosuprimir el receptor. Las revisiones y citas generales para el uso de métodos recombinantes para reducir la antigenicidad de células donantes se dan a conocer también por Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992). Se dan a conocer enfoques ejemplares para la reducción de la inmunogenicidad de transplantes por modificación de superficie por las solicitudes de patente internacional PCT WO 92/04033 y PCT/US99/24630. Como alternativa, puede reducirse la inmunogenicidad del injerto preparando CPH a partir de un animal transgénico que tiene antígenos de MHC alterados o eliminados.

- 55 Las CPH pueden encapsularse y usarse para suministrar factores al hospedador según tecnologías de encapsulación conocidas, incluyendo microencapsulación (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.352.883, 4.353.888 y 5.084.350) y macroencapsulación (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y las solicitudes de patente internacional PCT WO 92/19195 y WO 95/05452). La macroencapsulación se describe en las patentes de Estados Unidos 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859,

4.968.733, 5.800.828 y la solicitud de patente internacional PCT WO 95/05452. El número de células en los dispositivos puede variar, preferiblemente cada dispositivo contiene entre 10^3 - 10^9 células (por ejemplo, de 10^5 a 10^7 células). Pueden implantarse múltiples dispositivos de macroencapsulación en el hospedador.

5 Se ensaya el uso de las CPH preparadas a partir de tejido alogénico del receptor mediante métodos bien conocidos de tipado de tejido, para que coincida estrechamente con el tipo de histocompatibilidad del receptor.

10 Las CPH pueden prepararse a veces a partir del propio hígado del receptor (por ejemplo, en el caso de biopsias de eliminación de tumor). En dichos casos, las CPH pueden generarse a partir de tejido disociado y hacerse proliferar *in vitro* usando los métodos descritos anteriormente. Tras una propagación adecuada del número de células, pueden recogerse las CPH, modificarse genéticamente si es necesario y disponerse para inyección directa en el hígado del receptor.

Las CPH que se administran a la región hepática pueden formar un injerto hepático, de modo que las células formen conexiones normales con las células hepáticas vecinas, manteniendo el contacto con las células hepáticas transplantadas o existentes. Por tanto, las CPH transplantadas restablecen el tejido hepático que se ha dañado debido a enfermedad y envejecimiento.

15 La integración funcional del injerto en el tejido hepático del hospedador puede valorarse examinando la eficacia de los injertos sobre el restablecimiento de diversas funciones, incluyendo el análisis de sangre de alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), albúmina, proteína total y bilirrubina total y directa.

20 La capacidad de propagar CPH *in vitro* para uso en transplante es también útil para la terapia génica *ex vivo*. Por tanto, las CPH proporcionan un modo adicional de recuperar y propagar células hepáticas para uso como vehículos en ensayos de terapia génica *ex vivo*.

Modificación genética de células progenitoras hepáticas

25 Aunque las CPH son células primarias no transformadas, poseen rasgos de una estirpe celular continua. En el estado indiferenciado, las CPH se dividen continuamente y son por tanto dianas para la modificación genética. En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente se inducen a diferenciarse en hepatocitos, colangiocitos o células sinusoidales mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

30 El término "modificación genética" designa la alteración estable o transitoria del genotipo de una CPH mediante la introducción intencionada de ADN exógeno. El ADN puede ser sintético o con carencias naturales y puede contener genes, porciones de genes u otras secuencias de ADN útiles. El término "modificación genética" como se usa en la presente memoria no se pretende que incluya las alteraciones de origen natural tales como las que aparecen por la actividad vírica natural, recombinación genética o similar.

35 Cualquier modificación genética útil de las células está dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, las CPH pueden modificarse para producir o aumentar la producción de una sustancia biológicamente activa tal como un factor de crecimiento o similar. En una realización, la sustancia biológicamente activa es un factor de transcripción tal como un factor de transcripción que modula la diferenciación genética. En una realización alternativa, la sustancia biológicamente activa es un factor de proliferación no mitogénico, por ejemplo, v-myc, T grande de SV-40 o telomerasa.

40 La modificación genética se efectúa por infección con vectores víricos (retrovirus, herpesvirus modificados, herpesvirus, adenovirus, virus adenoasociados y similares) o transfección usando métodos conocidos en la materia (lipofección, transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y similares) (véase Maniatis *et al.*, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1982)). Por ejemplo, los constructos génicos quiméricos pueden contener promotores víricos, por ejemplo repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas, de virus de simio 40 (SV40), citomegalovirus (CMV) o específicos de células de mamífero tales como tirosina hidroxilasa (TH, un marcador de células de dopamina), DBH, feniletanolamina *N*-metiltransferasa (PNMT), ChAT, GFAP, NSE, las proteínas NF (NF-L, NF-M, NF-H y similares) que dirigen la expresión de los genes estructurales que codifican la proteína deseada. Además, los vectores pueden incluir un marcador de selección de fármaco tal como el gen de aminoglucósido fosfotransferasa de *E. coli*, que cuando se coinfecta con el gen de ensayo, confiere resistencia a geneticina (G418), un inhibidor de la síntesis proteica.

45 Las CPH pueden modificarse genéticamente usando transfección con vectores de expresión. En un protocolo, el ADN vectorial que contiene los genes se diluye en 0,1X TE (Tris 1 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM) a una concentración de 40 µg/ml. Se añaden 22 µl del ADN a 250 µl de 2X HBS (NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, dextrosa 12 mM, HEPES 50 mM) en un tubo de plástico desechable estéril de 5 ml. Se añaden lentamente 31 µl de CaCl₂ 2 M y se incuba la mezcla durante 30 minutos (min) a temperatura ambiente. Durante esta incubación de 30 min, se centrifugan las células a 800 g durante 5 min a 4°C. Se resuspenden las células en 20 volúmenes de PBS enfriado con hielo y se dividen en alícuotas de 1×10^7 células, que se centrifugan de nuevo. Se resuspende cada alícuota de células en 1 ml de suspensión de ADN-CaCl₂ y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente. Se diluyen

entonces las células en medio de crecimiento y se incuban durante 6-24 h a 37°C en 5-7% de CO₂. Se centrifugan de nuevo las células, se lavan con PBS y se devuelven a 10 ml de medio de crecimiento durante 48 h.

Las CPH se modifican genéticamente también usando técnicas de transfección con fosfato de calcio. Para transfección con fosfato de calcio estándar, se disocian mecánicamente las células en una suspensión de células individuales, se siembran sobre discos tratados de cultivo de tejido a un 50% de confluencia (50.000-75.000 células/cm²) y se dejan unirse durante una noche. En un protocolo, se efectúa el procedimiento de transfección de fosfato de calcio modificado como sigue: se añade ADN (15-25 µg) en tampón TE estéril (Tris 10 mM, EDTA 0,25 mM, pH 7,5) diluido a 440 µl con TE, y 60 µl de CaCl₂ 2 M (pH 5,8 con tampón HEPES 1 M) al tampón de ADN/TE. Se añaden gota a gota a esta mezcla un total de 500 µl de 2x HeBS (HEPES-disolución salina tamponada; NaCl 275 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, dextrosa 12 mM, tampón HEPES 40 mM en polvo, pH 6,92). Se deja reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min. Se lavan brevemente las células con 1x HeBS, se añade 1 ml de la disolución de ADN precipitado con fosfato de calcio a cada placa y se incuban las células a 37°C durante 20 min. Después de esta incubación, se añaden 10 ml de medio a las células y se disponen las placas en un incubador (37°C, 9,5% de CO₂) durante 3-6 horas adicionales. Se retiran el ADN y el medio mediante aspiración al final del periodo de incubación, se lavan las células 3 veces y se devuelven entonces al incubador.

Cuando la modificación genética es para la producción de una sustancia biológicamente activa, la sustancia puede ser aquella que sea útil para el tratamiento de un trastorno hepático dado. Las CPH se modifican genéticamente para expresar un agente biológicamente activo, tal como factores de crecimiento y receptores de factor de crecimiento. Por ejemplo, puede desearse modificar genéticamente células para que secreten un factor de crecimiento inductor de la proliferación o un factor de crecimiento inductor de la diferenciación. Los productos de factor de crecimiento útiles en el tratamiento de trastornos hepáticos incluyen HGF, VEGF, FGF-1, FGF-2, EGF, TGFα, TGFβ, PDGF, IGF y las interleucinas.

Las CPH modificadas genéticamente pueden implantarse para terapia celular o terapia génica en el SNC de un receptor necesitado de la molécula biológicamente activa producida por las células modificadas genéticamente. Las técnicas de transplante se detallan a continuación.

Como alternativa, las CPH modificadas genéticamente pueden someterse a diversos protocolos de diferenciación *in vitro* antes del implante. Una vez se han diferenciado las células, se vuelve a ensayar la expresión de la proteína deseada. Las células que tienen el fenotipo deseado pueden aislarse e implantarse en receptores necesitados de la proteína o molécula biológicamente activa que se expresa por la célula modificada genéticamente.

Métodos para cribar los efectos de los fármacos sobre las células progenitoras hepáticas

Pueden usarse cultivos de CPH para cribar composiciones terapéuticas potenciales. Por ejemplo, las CPH se usan para identificar compuestos que afecten a la proliferación, diferenciación o supervivencia de células hepáticas. Además, las CPH se usan para identificar compuestos antiviricos, determinar la infectividad de un virus o identificar metabolitos de un compuesto de ensayo. Estas composiciones de ensayo pueden aplicarse a células en cultivo a diversas dosificaciones, y monitorizarse la respuesta de las células durante diversos periodos de tiempo. Las características físicas de las células pueden analizarse observando el crecimiento celular y la morfología con microscopio. Puede analizarse la inducción de la expresión de niveles nuevos o aumentados de proteínas tales como enzimas, receptores y otras moléculas de superficie celular, o de neurotransmisores, aminoácidos, neuropéptidos y aminos biogénicas con cualquier técnica conocida en la materia que pueda identificar la alteración del nivel de dichas moléculas. Estas técnicas incluyen la inmunohistoquímica, que usa anticuerpos contra dichas moléculas, o el análisis bioquímico. Dicho análisis bioquímico incluye ensayos de proteína, ensayos enzimáticos, ensayos de unión de receptor, ensayos de inmunosorción ligados a enzima (ELISA), análisis electroforéticos, análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), transferencias Western y radioinmunoensayos (RIA). Los análisis de ácido nucleico tales como las transferencias Northern pueden usarse para examinar los niveles de ARNm que codifica estas moléculas o enzimas que sintetizan estas moléculas.

Las CPH pueden usarse en métodos para la determinación del efecto de un agente biológico sobre células hepáticas. El término "agente biológico" designa cualquier agente, tal como un virus, proteína, péptido, aminoácido, lípido, carbohidrato, ácido nucleico, nucleótido, fármaco, profármaco u otra sustancia que pueda tener efecto sobre células neurales, tanto si dicho efecto es dañino, beneficioso u otro. Los agentes biológicos que son beneficiosos para las células hepáticas se designan en la presente memoria como "agentes hepáticos", un término que comprende cualquier sustancia biológica o farmacéuticamente activa que pueda probarse potencialmente útil para la proliferación, diferenciación o funcionamiento de células hepáticas o el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático.

Para determinar el efecto de un agente biológico potencial sobre células hepáticas, puede obtenerse un cultivo de CPH a partir de tejido hepático o, como alternativa, a partir de un hospedador aquejado de una enfermedad o trastorno hepático. La elección de las condiciones de cultivo depende del agente particular que se esté ensayando y de los efectos que se quieran conseguir. Una vez se obtienen las células a partir del tejido donante deseado, se hacen proliferar *in vitro*.

Es posible cribar agentes biológicos que aumenten la capacidad proliferativa de las CPH, lo que sería útil para generar grandes cantidades de células con fines de trasplante. Es también posible cribar agentes biológicos que inhiban la proliferación de CPH. Las CPH se siembran en presencia de los factores biológicos de interés y se ensaya el grado de proliferación que aparezca. Pueden determinarse los efectos de un agente biológico o combinación de agentes biológicos sobre la diferenciación y supervivencia de las CPH y su progenie.

Es posible cribar CPH que se hayan inducido ya a diferenciarse antes del cribado. Es también posible determinar los efectos de los agentes biológicos sobre el proceso de diferenciación aplicándolos a las CPH antes de la diferenciación. Generalmente, el agente biológico puede solubilizarse y añadirse al medio de cultivo a concentraciones variables para determinar el efecto del agente a cada dosis. El medio de cultivo puede recargarse con el agente biológico cada par de días en cantidades que mantengan la concentración del agente más o menos constante.

Los cambios en la proliferación se observan por un aumento o reducción del número de células. Un "factor regulador" es un factor biológico que tiene un efecto regulador sobre la proliferación de CPH. Por ejemplo, un factor biológico se consideraría un "factor regulador" si aumentara o redujera el número de CPH que proliferan *in vitro* en respuesta a un factor de crecimiento inductor de la proliferación (tal como EGF). Como alternativa, el número de CPH que responden a factores inductores de la proliferación puede permanecer constante, pero la adición del factor regulador afecta a la velocidad a la que proliferan las CPH. Un factor de crecimiento inductor de la proliferación puede actuar como factor regulador cuando se usa en combinación con otro factor de crecimiento inductor de la proliferación.

Usando este método de cribado, un especialista en la materia puede cribar los efectos secundarios del fármaco potencial sobre células hepáticas ensayando los efectos de los agentes biológicos sobre la proliferación y diferenciación de células hepáticas o la supervivencia y función de las células hepáticas diferenciadas. Las CPH proliferadas se siembran típicamente a una densidad de aproximadamente $5-10 \times 10^6$ células/ml. Si se desea ensayar el efecto del agente biológico sobre un tipo celular diferenciado particular o una composición dada de células, puede manipularse la relación de células hepatocíticas y colangiocíticas obtenida después de la diferenciación, separando los diferentes tipos de células.

Los efectos de los agentes biológicos se identifican basándose en las diferencias significativas en cuanto a los cultivos de control con respecto a criterios tales como las relaciones de fenotipos expresados, viabilidad celular y alteraciones de la expresión génica. Las características físicas de las células pueden analizarse observando la morfología celular y el crecimiento con microscopio. La inducción de la expresión de niveles nuevos o aumentados de proteínas tales como enzimas, receptores y otras moléculas de superficie celular puede analizarse con cualquier técnica conocida en la materia que pueda identificar la alteración del nivel de dichas moléculas. Estas técnicas incluyen inmunohistoquímica, que usa anticuerpos contra dichas moléculas, o análisis bioquímicos. Dichos análisis bioquímicos incluyen ensayos de proteína, ensayos enzimáticos, ensayos de unión de receptor, ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), análisis electroforéticos, análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), transferencias Western y radioinmunoensayos (RIA). Los análisis de ácido nucleico tales como transferencias Northern y PCR puede usarse para examinar los niveles de ARNm que codifica estas moléculas o enzimas que sintetizan estas moléculas.

Los factores implicados en la proliferación de CPH y la proliferación, diferenciación y supervivencia de progenie de CPH, y sus respuestas ante agentes biológicos, pueden aislarse construyendo colecciones de ADNc a partir de CPH o progenie de CPH en diferentes etapas de su desarrollo usando técnicas conocidas en la materia. Las colecciones de células en una etapa de desarrollo se comparan con aquellas de células en diferentes etapas de desarrollo para determinar la secuencia de expresión génica durante el desarrollo y para revelar los efectos de diversos agentes biológicos o para revelar nuevos agentes biológicos que alteren la expresión génica en células hepáticas. Cuando las colecciones se preparan a partir de tejido disfuncional, pueden identificarse los factores genéticos que desempeñan un papel en la causa de disfunción comparando las colecciones de tejido disfuncional con las de tejido normal. Esta información puede usarse en el diseño de terapias para tratar los trastornos. Adicionalmente, pueden identificarse sondas para uso en el diagnóstico de diversos trastornos genéticos o para uso en la identificación de células hepáticas en una etapa de desarrollo particular.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no se limita, por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1: MÉTODOS GENERALES

Aislamiento de células hepáticas fetales humanas

Se concedió permiso para el presente estudio por el comité ético local del hospital de la Universidad de Huddinge. Se obtuvieron tejidos de HF humanos a partir de fetos abortados a las 6-9,5 semanas de gestación según las directrices suecas. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético local. Se efectuó un legrado uterino por aspiración modificado (33). La edad gestacional se estimó según marcadores anatómicos específicos (34) en los fetos de <12 semanas de gestación y por medidas del diámetro biparietal por ultrasonidos en fetos mayores (35). La edad gestacional se da como edad menstrual. Los abortos se efectuaron en embarazos sin anomalías

aparentes, y no se incluyeron los fetos con anomalías. Se diseccionó el HF y se dispuso en un tubo estéril que contenía medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corp., RU). Se disgregó el hígado en una suspensión de células individuales mediante paso a través de una malla metálica de 70 μm . Se centrifugó la suspensión de células individuales a 200 g durante 10 min para sedimentar las células. Se habían cribado serológicamente en todas las mujeres que donaron tejido fetal la sífilis, toxoplasmosis, rubéola, VIH-1, citomegalovirus, hepatitis B y C, parovirus y herpesvirus simples de tipos 1 y 2.

Aislamiento de células mediante clasificación celular magnética y cultivo in vitro

Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de células hepáticas fetales en las semanas de gestación 7-9. Se aislaron las células usando el kit de enriquecimiento y aislamiento de células progenitoras primigenias humanas (Stem cell technologies, Vancouver, Canadá) seguido del sistema de perlas magnéticas para la separación activada magnéticamente de células (Stem cell technologies). El método está basado en una selección negativa de esta población usando un cóctel de empobrecimiento que incluye anticuerpos de 12 antígenos de superficie celular específicos de linaje (anti-CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b, glucoforina A). Se llevó a cabo el procedimiento como se describe por los fabricantes. En cada ocasión, se analizaron inmediatamente las células progenitoras recuperadas por citometría de flujo para asegurar que no estaban presentes células lin^+ contaminantes y para confirmar el genotipo progenitor ($\text{CD117}^+/\text{CD34}^+/\text{lin}^-$) de las células. Se ensayó la viabilidad de las células progenitoras recuperadas al final del procedimiento, después de lo cual se sembraron las células en placas Petri de plástico recubiertas con colágeno de tipo I (Biocoat, Becton and Dickinson, Nueva Jersey, EE.UU.) y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO, Invitrogen, Estocolmo, Suecia) que contenía 10% de suero fetal de ternero inactivado, penicilina y estreptomycin, 5% de L-glutamina, 5% de aminoácidos esenciales mínimos, HGF 50 ng/ml (R&D Systems, Abingdon, Inglaterra), EGF 20 ng/ml (R&D Systems) y factor de crecimiento de fibroblastos básico 10 ng/ml (R&D Systems). Se recogió el medio cada tres días, se centrifugó, se esterilizó por filtración y se usó como medio acondicionado (MA). Se efectuó todo el subcultivo posterior usando MA al 20%. En algunos experimentos, se cultivaron las células progenitoras en medio DMEM que contenía HGF 20 ng/ml, EGF 10 ng/ml y VEGF 50 ng/ml (R&D Systems) y se dejó dividir en cultivo. Para la detección de la proliferación, se incubaron las células en cultivo con el análogo de timidina BrdU (30 mM) durante 30 min. Se lavaron las células y se tiñeron por albúmina, citoqueratina 19 y BrdU usando un anticuerpo de cabra conjugado con FITC contra albúmina humana (Natutec, Frankfurt, Alemania), un anticuerpo anti-citoqueratina 19 humana no conjugado (Neomarker, EE.UU.) y un anticuerpo anti-BrdU no conjugado (Sigma, Estocolmo, Suecia). Otros anticuerpos usados para fenotipado fueron anti-CD45, CD14, CD90, CD117 y CD34 (Pharmingen, EE.UU.), anti-Flk-1 (ReliaTech, Alemania) y anticuerpos específicos de la subclase secundaria IgG1 de cabra anti-ratón (FITC/rojo Tejas) e IgG2a de cabra anti-ratón. Se usó citometría de flujo e inmunocitoquímica para fenotipar las células progenitoras. Se llevaron a cabo los procedimientos como se ha descrito (36).

Se usaron células progenitoras recién aisladas (P0) y células propagadas *in vitro* en los pases 6 (P6) y 12 (P12) para lo estudios de trasplante.

Ratones

El comité de cuidado y uso de animales del hospital Huddinge aprobó los protocolos animales. Se indujo el daño hepático en ratones C57 negros/atímicos ($n=16$) mediante la administración de GalN (Sigma Chemicals Co., Estocolmo, Suecia) por vía intraperitoneal a 0,7 g/kg de peso corporal 24 h antes de una hepatectomía parcial. Se disolvió la GalN en disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS) a 100 mg/ml. Se llevó a cabo la hepatectomía parcial (HP) como se ha descrito anteriormente (37). Se continuó la administración de GalN durante 10 días después de la HP.

Se transplantaron células progenitoras hepáticas al bazo de estos animales. Se anestesiaron los animales con éter y se inyectaron típicamente 1×10^5 células recién aisladas (P0) y 1×10^6 células de los pases 6 y 12 suspendidas en 200 μl de medio DMEM en el bazo durante aproximadamente 10-15 s. Se transplantaron ficticiamente 4 ratones con solo medio DMEM. Después de asegurar la hemostasia, se cerró la incisión abdominal y se monitorizaron detalladamente los animales hasta su recuperación.

Preparación de hígados y análisis de fluorescencia en criosecciones

Se sacrificaron los ratones 4 semanas después del trasplante y se extirparon hígados, bazos y pulmones. Se congelaron rápidamente 2 o 3 biopsias de cada hígado de aproximadamente 2 mm^2 en nitrógeno líquido y se usaron en el aislamiento de ARN para efectuar análisis de PCR-TI. Se congeló rápidamente el resto del tejido hepático para análisis de fluorescencia e inmunohistoquímico. Se secaron al aire criosecciones de 5 μm , se fijaron con 30% de acetona fría en metanol durante 10 min y se analizaron adicionalmente por inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

Se ensayaron inicialmente dos métodos para la detección de células humanas en el parénquima de ratón: a) una técnica de hibridación *in situ* que usa una sonda de ADN humano total marcada con digoxigenina (Cytocell, Oxfordshire, RU) (38) y b) un anticuerpo monoclonal de ratón anti-núcleos humanos (Chemicon, CA, EE.UU.), seguido de tinción con anticuerpo secundario de caballo anti-ratón biotinilado. Se llevó a cabo el procedimiento de

inmunoperoxidasa usando el kit Vectastain Elite ABC (ImmunKemi, Estocolmo, Suecia) como se describe por los fabricantes. Se usó el kit de sustrato tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB)-níquel como desarrollador del color. Para las dobles tinciones, se usaron combinaciones de DAB (da una tinción de color marrón) y/o DAB-Ni (negro) y/o el kit Vector NovaRed. Eran otros anticuerpos primarios usados un anticuerpo de cabra anti-albúmina humana conjugado con FITC (no reactivo cruzado con ratón) (Natutec, Frankfurt, Alemania), un anticuerpo anti-citoqueratina humana 19 no conjugado (Neomarker, EE.UU.) y un anticuerpo de ratón anti-CD26 humana no conjugado (detecta la dipeptidil peptidasa IV) (Pharmingen, EE.UU.). Se demostraron GGT, G-6-P y glucógeno *in situ* como se ha descrito anteriormente (39, 40). Se contratiñeron las secciones con hematoxilina y se montaron en medios de montaje (ImmunKemi, Estocolmo, Suecia).

10 *Análisis morfológico*

Se cribaron en 60 secciones en serie de cada hígado de ratón las células humanas positivas de DAB-Ni. Se determinó el número de células transplantadas en agrupamientos de tres tamaños, concretamente, células dispuestas individualmente o en agrupamientos de $\geq 2-20$ o > 20 células cada uno. Se analizó un mínimo de 100 campos de alta resolución en tejidos de todos los animales transplantados.

15 *Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (PCR-TI)*

Se extrajo el ARN total de cuatro tejidos de hígado murino quimérico humano-ratón y un tejido de hígado de ratón normal usando el kit de aislamiento de ARN Micro-FastTrack (Invitrogen, Groningen, Holanda). Se usaron cebadores específicos humanos para detectar la expresión de albúmina, CK-19, α -fetoproteína y $\alpha 1$ -antitripsina humanas en hígado de ratón. Se seleccionaron los cebadores para CK-19, α -fetoproteína, albúmina, antitripsina y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) usando el software Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems). Se diseñó cada conjunto de cebadores para orientarse al ADNc diana solo, no a ADN contaminante. Se sintetizaron comercialmente los conjuntos de cebadores por CyberGene (Huddinge, Suecia).

Las secuencias cebadoras eran

"CK-19 codificante": 5'-CCTGCGGGACAAGATTCTTG-3' (SEQ ID NO: 1),

25 anticodificante- 5'-ACGGGCGTTGTCGATCTG-3' (SEQ ID NO:2), tamaño de producto esperado (pb):70

" α -fetoproteína codificante": 5'-GCAAAGCTGAAAATGCAGTTGA-3' (SEQ ID NO: 3),

anticodificante 5'-GGAAAGTTCGGGTCCCAAAA-3' (SEQ ID NO:4), tamaño de producto esperado (pb):129

"albúmina codificante": 5'-GCTTTGCCGAGGAGGGTAA-3' (SEQ ID NO: 5),

anticodificante 5'-GGTAGGCTGAGATGCTTTTAAATGT-3', tamaño de producto esperado (pb):88

30 " $\alpha 1$ -antitripsina codificante": 5'-CAGAGGAGGCACCCCTGAA-3' (SEQ ID NO: 6),

anticodificante 5'-AGTCCCTTCTCGTTCGATGGT-3'(SEQ ID NO:7), tamaño de producto esperado (pb): 71

"G6PD codificante": 5'-TGC CCC CGA CCG TCT AC-3' (SEQ ID NO: 8),

anticodificante 5'-ATG CGG TTC CAG CCT ATC TG-3'(SEQ ID NO:9), tamaño de producto esperado (pb):76.

35 Se realizaron las reacciones de PCR por duplicado en placas ópticas de 96 pocillos en un volumen total de 25 μ l. Cada reacción contenía 2,5 μ l de ADNc, 12,5 μ l de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y 500 nM de cada cebador. Se incluyeron controles positivos y negativos en todos los procesos. Las condiciones de ciclación térmica eran 2 min a 50°C inicialmente y 10 min a 95°C, como se recomienda por el fabricante. Las condiciones del ciclo eran 40 ciclos a 95°C durante 15 s y a 60°C durante 1 min. Se incluyó el gen doméstico, G6PD, como control de normalización endógena, que se usó para confirmar el aislamiento de ARN y transcripción inversa exitosos y la cantidad total de ARN en cada muestra. Para visualizar los resultados de la PCR-TI, se procesaron los productos de PCR por un sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturante al 12,5% listo para usar y se tiñeron las bandas mediante tinción con plata automatizada (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

Métodos estadísticos

45 Los datos se presentan como media \pm DE. Se analizó la significación de las diferencias con la prueba de t de Student y el análisis de varianza (ANOVA). Un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo.

EJEMPLO 2. LAS CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS CD117⁺/CD34⁺/LIN⁻ PUEDEN DIFERENCIARSE EN HEPATOCITOS Y COLANGIOCITOS *IN VITRO*

50 Usando un kit diseñado para aislar progenitoras hematopoyéticas primigenias, se obtuvo una población de células a partir de hígados fetales humanos (sg 6-9) que no expresaban ningún marcador hematopoyético asignado. El fenotipado adicional de esta población mostró expresión de los marcadores de citoblastos CD117 y CD34, pero no

expresión de marcadores hepáticos tales como albúmina (marcador hepatocítico) y CK19 (marcador colangiocítico). Tampoco había expresión de Thy-1 (CD90) ni CD45 (Fig. 1a). Esta población representa aproximadamente un 0,5%-0,7% de los hígados fetales completos en las semanas de gestación 6-9. No se observaron expresiones de CD45 y CD90 durante el subcultivo de las células. Tras el cultivo, se encontró que estas células eran una mezcla de poblaciones tanto adherentes (~85%) (Fig. 1b) como no adherentes (~15%). La población no adherente no pudo propagarse adicionalmente en las condiciones de cultivo dadas a continuación. Las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ y su progenie tienden a crecer en colonias (Fig. 1b). El primer marcador que se expresó por las células progenitoras adherentes después de 2 días en cultivo fue c-Met (receptor de factor de crecimiento de hepatocitos) (Fig. 1b). El cultivo *in vitro* de estas células durante 2 semanas en medio de cultivo que contiene factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) mostró la presencia de cuatro tipos de células: i) ~85% de células positivas dobles que expresan albúmina y CK19, ii) ~4% de células negativas dobles, iii) ~6% de células positivas simples que expresan solo albúmina y iv) ~5% de células positivas simples que expresan solo CK19 (Fig. 1c). Se mantuvo este fenotipo durante varios pases durante el cultivo (Fig. 1c). Sin embargo, de P11 en adelante hubo un ligero descenso del número de células positivas dobles (~60%) y negativas dobles (~3%), mientras que aumentaban las células positivas simples por albúmina o CK19. Estos datos demuestran que las células progenitoras primigenias no hematopoyéticas de hígados en desarrollo temprano pueden diferenciarse *in vitro* en hepatocitos y colangiocitos.

EJEMPLO 3: LAS CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS CD117⁺/CD34⁺/LIN⁻ SE DIFERENCIAN EN CÉLULAS ENDOTELIALES SINUSOIDALES HEPÁTICAS *IN VITRO* EN PRESENCIA DE FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR

De forma interesante, cuando se dejaron diferenciar células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ adherentes en medio de cultivo que contenía factor de crecimiento endotelial vascular 50 ng/ml (VEGF), se observó una gran proporción de células con morfología de tipo endotelial. La caracterización adicional de esta población celular usando marcadores de células hepáticas, incluyendo Flk-1, conocido por expresarse en progenitores endoteliales hepáticos fetales, reveló cuatro poblaciones de células: a) células endoteliales que expresan el receptor Flk-1 (~50%), b) hepatocitos (~13%), c) colangiocitos (~17%) (Fig. 1d) y d) una población celular que no expresaba ninguno de estos marcadores (~20%) (datos no mostrados). El fenotipo sinusoidal de las células Flk-1⁺ se confirmó usando un amplio panel de anticuerpos (Tabla 1). Se usaron células endoteliales de vena umbilical humana para demostrar las diferencias fenotípicas entre células endoteliales vasculares y sinusoidales (Tabla 1). El análisis por microscopia electrónica reveló la presencia de orificios y la ausencia de membrana basal característicos de las células endoteliales sinusoidales (datos no mostrados). Estos datos muestran que las células progenitoras primigenias no hematopoyéticas de hígados en desarrollo temprano pueden diferenciarse *in vitro* en hepatocitos, colangiocitos y células endoteliales.

Tabla 1. Rendimiento y viabilidad celular de células progenitoras primigenias aisladas magnéticamente y cultivadas a partir de hígados fetales en el primer trimestre

Edad embrionaria del hígado fetal	Nº total de células	Nº de CD117 ⁺ /CD34 ⁺ /Lin ⁻	Viabilidad	Tiempo medio de duplicación	Nº de subpases celulares obtenidos	Nº aproximado de células obtenidas
6 semanas	6x10 ⁶	3,1x10 ⁴	93%	12-15 días	4	~5x10 ⁵
6 semanas	5,6x10 ⁶	2x10 ⁴	95%	7-10 días	4	~4,5x10 ⁵
6,5 semanas	10x10 ⁶	4,5x10 ⁴	94%	4-5 días	12*	~400x10 ⁶
6,5 semanas	6,8x10 ⁶	2,5x10 ⁴	97%	4-5 días	14*	~360x10 ⁶
8 semanas	8x10 ⁶	3,2x10 ⁴	92%	10-12 días	2	~7x10 ⁴
8,5 semanas	15x10 ⁶	6,5x10 ⁴	90%	4-5 días	12*	~550x10 ⁶
8 semanas	7x10 ⁶	3,2x10 ⁴	95%	12-14 días	2	~8x10 ⁵
8,5 semanas	18x10 ⁶	6,5x10 ⁴	92%	2-3 días	10*	~70x10 ⁶
9,5 semanas	13x10 ⁶	5,5x10 ⁴	97%	8-10 días	9*	~50x10 ⁶
9 semanas	11x10 ⁶	7,5x10 ⁴	94%	3-4 días	12*	~307x10 ⁶
9 semanas	5,6x10 ⁶	4,5x10 ⁴	93%	8-10 días	2	~10x10 ⁴
9,5 semanas	10,5x10 ⁶	7,5x10 ⁴	92%	4-5 días	12*	~320x10 ⁶
9,5 semanas	17,6x10 ⁶	8,8x10 ⁴	95%	5-7 días	12	~360x10 ⁶

9 semanas	14x10 ⁶	13,3x10 ⁴	96%	3-4 días	11	~272x10 ⁶
9,5 semanas	15,5x10 ⁶	9,5x10 ⁴	97%	12-14 días	4	~389x10 ⁶
9,5 semanas	13,6x10 ⁶	12x10 ⁴	91%	4-5 días	11	~245x10 ⁶

*Células aún en cultivo actualmente

EJEMPLO 4: LAS CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS PUEDEN SOMETERSE EXTENSAMENTE A PASES IN VITRO

La proliferación de las progenitoras hepáticas dependía del uso regular de medio acondicionado (ME) al 20% durante el cultivo. Usando ME al 20%, estas células pueden cultivarse hasta al menos 12 pases. La retirada del ME redujo significativamente el número de pases celulares obtenidos (p<0,001, Fig. 2a), reflejando una reducción en la proliferación de las células. Se encontró que se observaba una alta capacidad proliferativa en las células positivas dobles (ALB⁺CK19⁺) y las células positivas simples de albúmina (ALB⁺CK19⁻), como se detectaba por la incorporación de BrdU (Fig. 2b y c). Las células pueden mantenerse durante largos periodos con un fenotipo estable. Es importante mencionar que no todos los HF generaron células que proliferaban rápidamente y que podían mantenerse en cultivo durante varios pases (Tabla 2). La proliferación exitosa durante largos periodos dependía de la calidad del tejido de HF obtenido. Sin embargo, se encontró que las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ aisladas a partir de todos los HF ensayados se diferenciaban en células hepáticas. Los datos de los estudios *in vitro* demostraron que las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ y su progenie tienen una amplia capacidad de replicación y pueden mantenerse durante largos periodos con un fenotipo estable.

Tabla 2. Características fenotípicas de células Flk-1⁺ obtenidas a partir de progenitores hepáticos

Anticuerpos contra	HUVEC	Flk-1 ⁺
CD141	+	+
*CD142	+	+
CD144	+	-
LDL acetilado	+	+
Ulex Europaeus	+	-
*CD106	+	+
CD62E	+	-
CD31	+	-
VWF	+	-
CD105	+	+
Fibroblasto	-	-
α-actina	-	-
*Expresado solo en células endoteliales activadas. HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana		

EJEMPLO 5: LAS CÉLULAS PROGENITORAS FETALES HUMANAS PROPAGADAS SE INJERTAN EXITOSAMENTE Y SE DIFERENCIAN EN HEPATOCITOS, COLANGIOCITOS Y SINUSOIDES MADUROS EN LOS HÍGADOS DE RATONES TRATADOS CON GALN

Para ensayar si las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ aisladas recientemente (P0) y las células propagadas en cultivo (P6 y P12) tienen el potencial de diferenciarse y ser funcionales *in vivo*, se transplantaron estas células a ratones que se hepatectomizaron parcialmente en primer lugar y se trataron entonces con D-galactosamina (GalN) para inducir lesión hepática aguda. Este protocolo induce lesión hepática aguda y facilita la regeneración hepática (21). Dos ratones del grupo de control y dos del grupo de ensayo murieron al cabo de 24 h después del tratamiento. Se presentan los resultados de los ratones supervivientes a las cuatro semanas después del trasplante celular. Después del trasplante intraesplénico, las células en P0 primarias, así como las células sometidas a subpases P6 y P12, sobrevivieron en el hígado de ratón tratado con GalN. Los experimentos para comparar los resultados obtenidos usando una sonda centromérica humana y un anticuerpo anti-núcleos humanos para localizar las células transplantadas dieron resultados similares. La especificidad de especie de la sonda de ADN humana (Fig. 3a y b) y el anticuerpo anti-núcleos humanos se demuestra por el resultado positivo con hígado humano (Fig. 3c) y la

5 inmunohistoquímica negativa con hígados transplantados ficticiamente de ratones atímicos (Fig. 3d). Las células CD117⁺/CD34⁺/lin⁻ recién aisladas, cuando se transplantaban, se diferenciaban en hepatocitos (Fig. 3e), células sinusoidales (Fig. 3f) y conductos biliares formados (Fig. 3g) a las 4 semanas después del trasplante. Las células progenitoras hepáticas en P6 y P12, cuando se transplantaban, se injertaban y reconstituían el hígado dañado agudamente (Fig. 3h-j). Se encontraron células transplantadas en los hígados de los ratones (Fig. 3k) pero no en otros tejidos tales como bazo (Fig. 3l) y pulmón (Fig. 3m) ni en animales transplantados ficticiamente (Fig. 3n). Las células transplantadas humanas expresaban marcadores hepatocíticos tales como glucosa-6-fosfatasa (G-6-P) (Fig. 4a) y glucógeno (Fig. 4b) y marcadores biliares tales como dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) (Fig. 4c) y gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) (Fig. 4d). En tres ratones, se encontraron segmentos de tejido regenerado que estaban repoblados al 90% por células hepáticas humanas (Fig. 4e). Se observaron también zonas claras de conductos biliares completamente repobladas por progenitoras humanas. Estas células se teñían positivamente por CK19 y anticuerpo anti-núcleos humanos (Fig. 4f). Se usó anticuerpo monoclonal contra albúmina humana que no reacciona de forma cruzada con albúmina de murido para examinar la expresión de albúmina humana en las células transplantadas. La inmunohistoquímica negativa con hígados transplantados ficticiamente de ratones atímicos (Fig. 4g) mostró la especificidad de especie del anticuerpo. Se encontraron varias estructuras positivas de albúmina (Fig. 4h-j) en los 10 ratones transplantados, sin embargo no se observaron focos que expresaran albúmina humana en ratones transplantados ficticiamente (n=2) usando condiciones idénticas. Se detectó albúmina humana solo en los hígados de los ratones, pero no en el bazo ni los pulmones. Como nota de interés, no se observaron formaciones tumorales en ninguno de los ratones analizados.

20 Para determinar si el injerto hepático era comparable entre células progenitoras hepáticas humanas en P0, P6 y P12, se cribaron en 60 secciones en serie de cada hígado de ratón las células humanas positivas de DAB-Ni. Se determinó el número de células transplantadas en agrupamientos de tres tamaños, concretamente, células dispuestas individualmente o en agrupamientos de ≥ 5 -20 o >20 células. El análisis mostró que no había una diferencia significativa en el número de células transplantadas dispuestas individualmente o en agrupamientos de ≥ 2 -20 células entre los animales que recibían células en P0, P6 y P12. No se observaron agrupamientos de >20 células en los ratones transplantados con células en P0, pero se observaron en ratones que recibieron células en P6 o P12 (Tabla 3) ($p < 0,001$, ANOVA). En ratones transplantados con células en P0, se detectó un aumento de 10 veces del número de células humanas transplantadas, mientras que en ratones inyectados con células en P6 y P12, se detectó un aumento de 6 veces (Tabla 3). Estos datos demuestran que las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ recién aisladas proliferan exitosamente y se diferencian *in vivo* en hepatocitos, colangiocitos y células endoteliales sinusoidales maduras. Además, las células CD117⁺/CD34⁺/Lin⁻ propagadas *in vivo* y su progenie proliferan *in vivo* y reconstituyen exitosamente el hígado de ratón dañado.

Tabla 3. Injerto de células progenitoras hepáticas humanas en ratones tratados con D-GaIN

Detección de las células transplantadas 4 semanas después del trasplante					
Nº de pase celular	Nº de células transplantadas	Células humanas detectadas (0,6 cm ³ de volumen hepático total después de hepatectomía parcial)	% de células individuales	% de agrupamientos de ≥ 2 -20 células	% de agrupamientos de >20 células
P0	1x10 ⁶	1,0 \pm 0,2x10 ⁶	58	42	0
P0			60	40	0
P6			57	41	2
P6	1x10 ⁶	6,7 \pm 2,3x10 ⁶	50	45	5
P6			51	47	2
P6			52	45	3
P12			63	35	2
P12	1x10 ⁶	6,1 \pm 2,2x10 ⁶	57	40	3
P12			62	33	5
P12			58	40	2

35 **EJEMPLO 6: TRANSCRIPCIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE HIGADO HUMANO EN RATONES TRANSPLANTADOS CON CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS HUMANAS**

5 Se confirmó el injerto de las células transplantadas determinando la expresión de genes humanos en los ratones transplantados. Se analizaron los hígados de los ratones sacrificados un mes después del trasplante de células progenitoras hepáticas fetales humanas mediante PCR-TI usando cebadores específicos de genes específicos de hígado humanos, incluyendo albúmina, α 1-antitripsina, CK19 y AFP. El ADN del hígado de un ratón atímico transplantado ficticiamente dio como resultado la amplificación de G6PD, que se usó como control de la integridad del ARN. Los cebadores de CK19, albúmina y AFP eran específicos de especie para los seres humanos, ya que no amplificaban los genes de ratón respectivos, sin embargo, no se encontró que la α 1-antitripsina fuese específica de especie (Fig. 4k). Estos resultados muestran que tanto las células recién aisladas (P0) como en diversos pasajes P6 y P12 se injertan en el hígado de ratón dañado.

10 **EJEMPLO 7: PROTECCIÓN DEL FACTOR VIII HUMANO EN RATONES TRANSPLANTADOS CON CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS**

15 Los niveles de FVIII humano son despreciables en ratones de hígado dañado químicamente y hepatectomizados, así como en ratones tratados de la misma manera y que además reciben el factor de crecimiento HGF y/o células estromáticas. Sin embargo, los ratones de hígado dañado químicamente y hepatectomizados que recibían solo células progenitoras hepáticas humanas o una combinación de HGF+células estromáticas+progenitoras demostraron altos niveles de FVIII humano en su plasma (Figura 6).

REIVINDICACIONES

1. Una población de células aisladas consistente en células derivadas de tejido hepático de un ser humano que son
 - a. CD117⁺, CD34⁺, CD45⁻ y Lin⁻;
- 5 b. capaces de proliferar en un cultivo y
 - c. capaces de diferenciarse *in vivo* en un hepatocito, un colangiocito y una célula sinusoidal.
2. La población celular aislada de la reivindicación 1, en la que la población es capaz de duplicarse al menos 6 veces.
- 10 3. La población celular aislada de la reivindicación 1, en la que la población es capaz de duplicarse al menos 12 veces.
4. La población celular aislada de la reivindicación 1, en la que dicha población es un cultivo de adhesión.
5. Un método de producción de una célula sinusoidal hepática humana *in vitro* que comprende
 - a. proporcionar una suspensión celular que comprende una célula CD117⁺, CD34⁺ y Lin⁻;
 - b. cultivar la suspensión celular y
 - 15 c. diferenciar la progenie celular en un medio de cultivo que contiene factor de crecimiento endotelial vascular.
6. Un método de producción de un hepatocito o colangiocito hepático humano *in vitro* que comprende:
 - a. proporcionar una suspensión celular que comprende una célula CD117⁺, CD34⁺ y Lin⁻;
 - b. cultivar la suspensión celular y
 - c. diferenciar la progenie celular en un medio de cultivo que contiene EGF y HGF.
- 20 7. Un método de producción de una población de células progenitoras hepáticas humanas que se diferencian *in vivo* en hepatocitos, colangiocitos y células sinusoidales, que comprende seleccionar de una población de células derivadas de hígado humano las células que son CD117⁺, CD34⁺, CD45⁻ y Lin⁻.
8. Uso de una célula progenitora hepática multipotente que comprende proporcionar un cultivo celular *in vitro* que comprende células progenitoras hepáticas CD117⁺, CD34⁺, CD45⁻ y Lin⁻ humanas multipotenciales, en el que
 - 25 dichas células mantienen la capacidad multipotencial de diferenciarse en hepatocitos, colangiocitos o células sinusoidales, para la fabricación de una composición para trasplante a un hospedador.
9. El uso de la reivindicación 8, en el que el trasplante comprende adicionalmente el cotrasplante de células estromáticas hepáticas fetales o células mesenquimáticas hepáticas fetales a dicho hospedador, excluyendo el uso de embriones humanos.
- 30 10. El uso de la reivindicación 8, en el que el trasplante comprende adicionalmente administrar a dicho hospedador factor de crecimiento de hepatocitos.

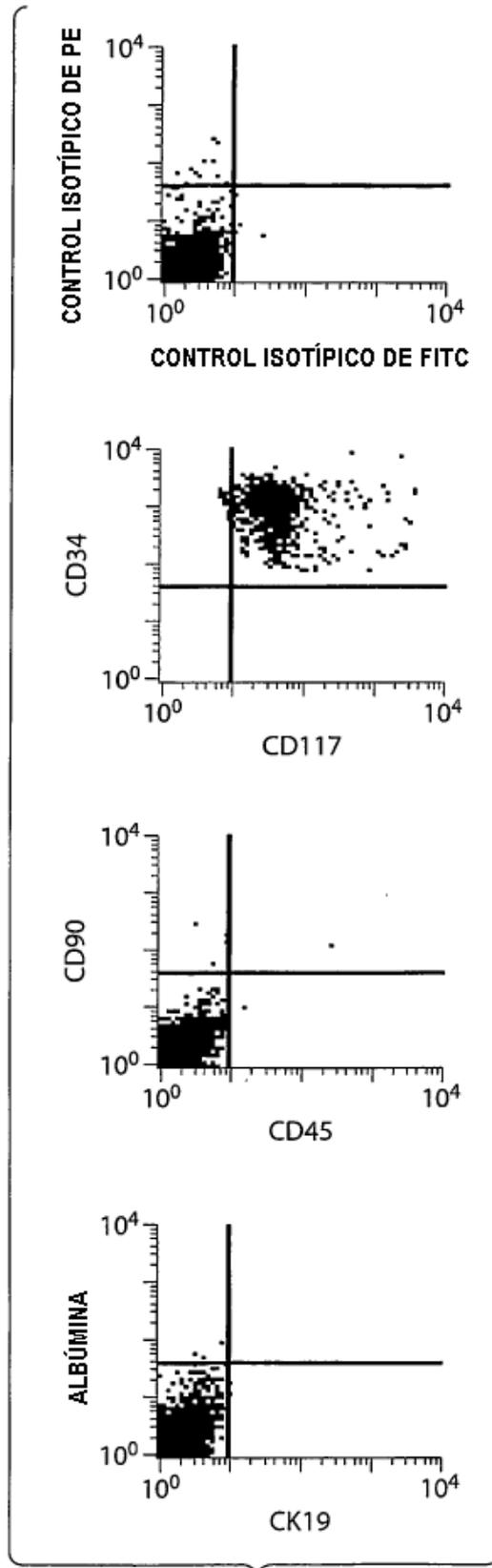


Fig. 1A

CÉLULAS CD117+/CD34+/Lin-



CULTIVO DE 1 DÍA

CÉLULAS CD117+/CD34+/Lin-



CULTIVO DE 4 DÍAS

CÉLULAS CD117+/CD34+/Lin-



c-Met

Fig. 1 B

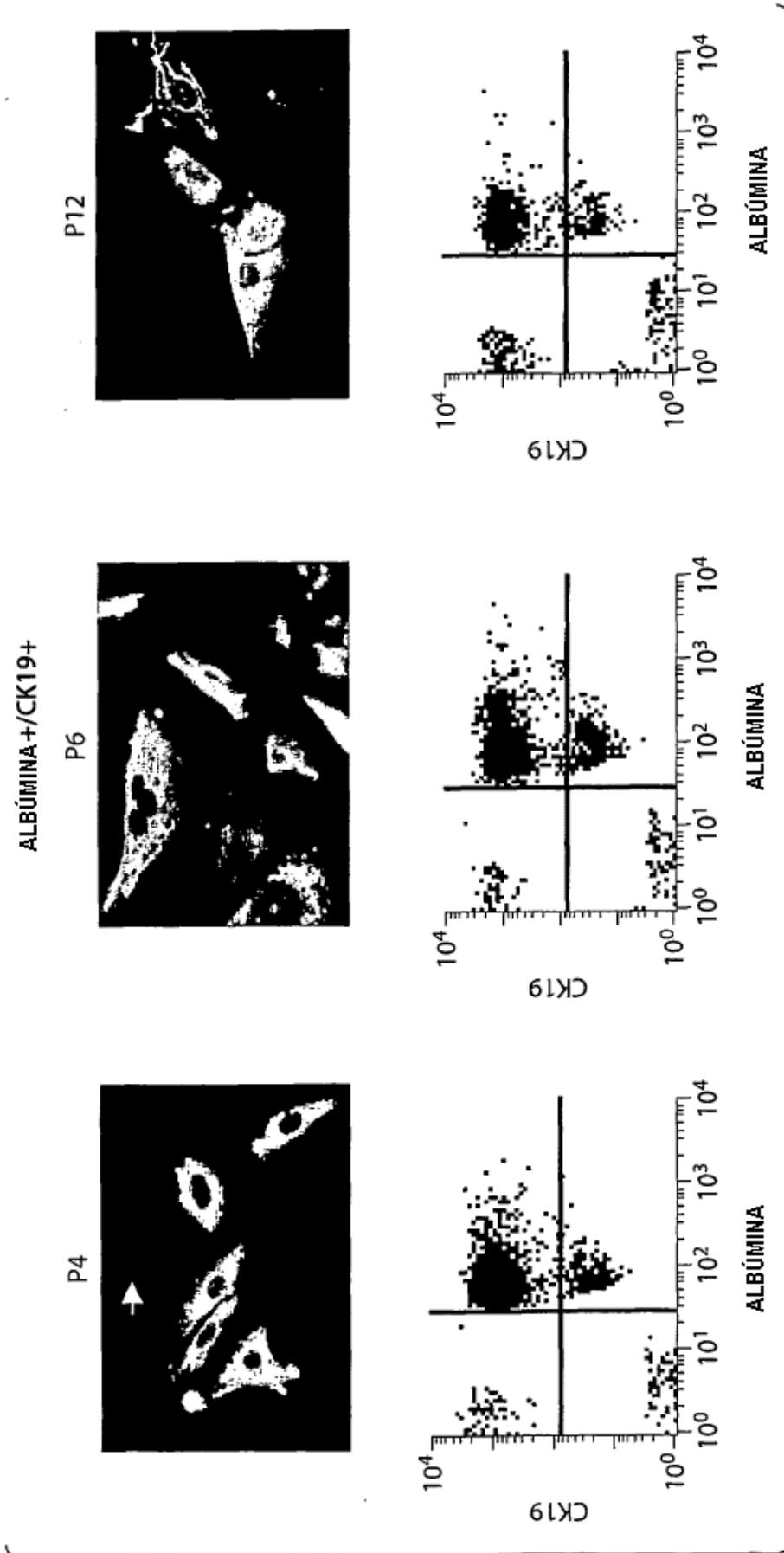


Fig. 1C

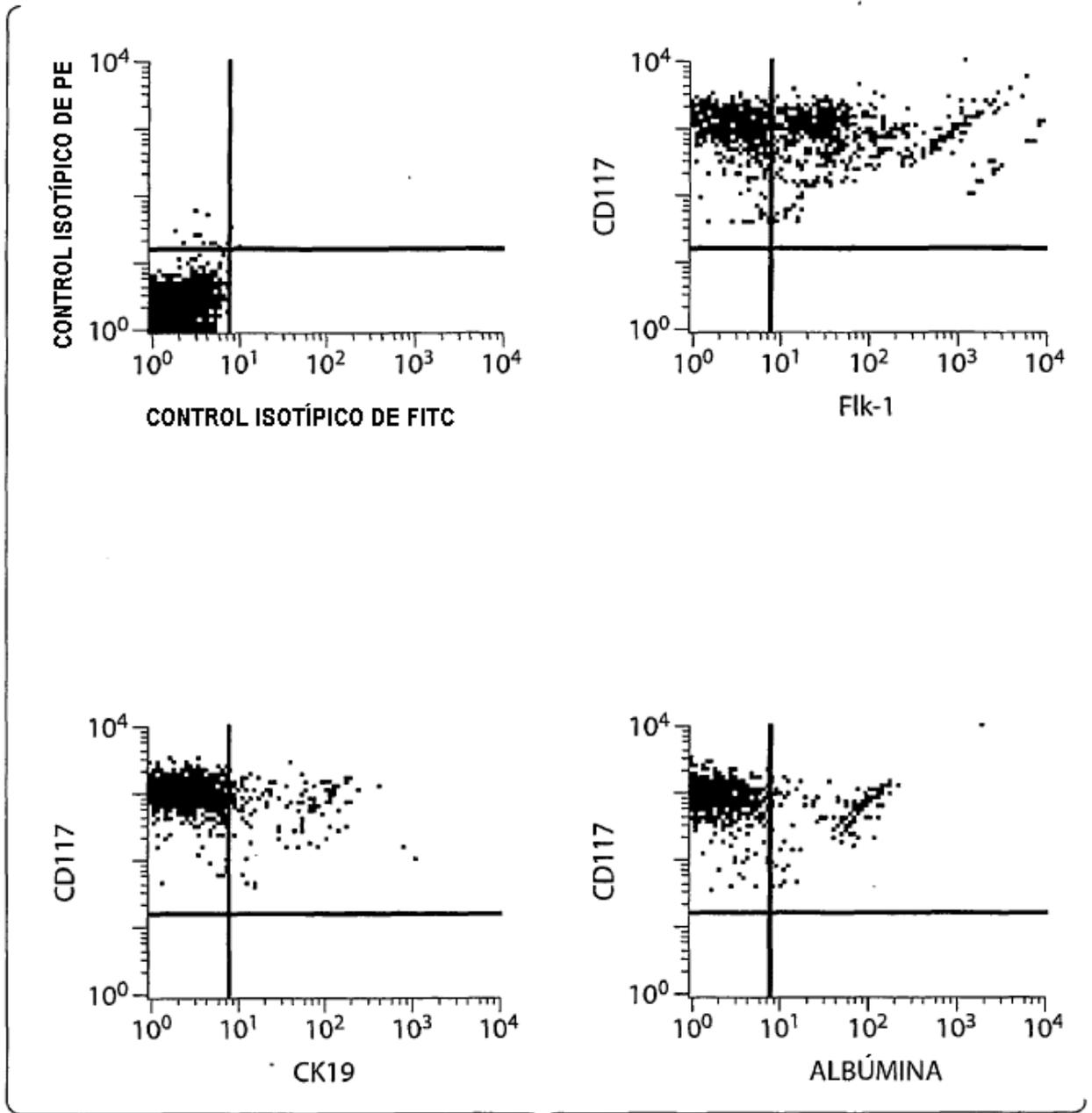


Fig. 1D

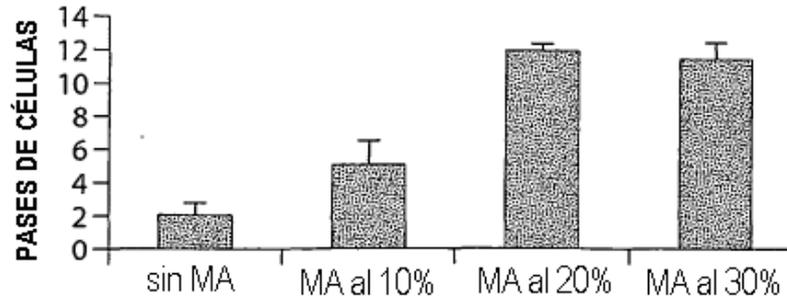


Fig. 2A

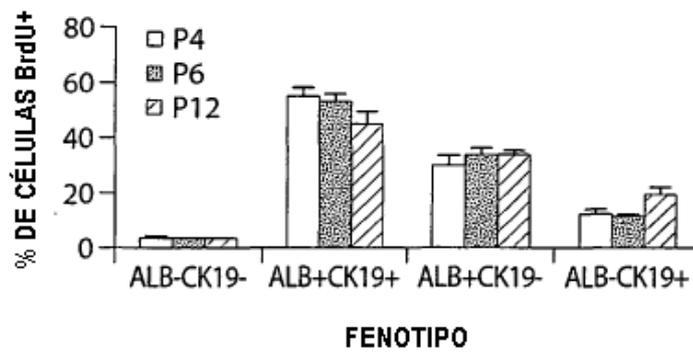


Fig. 2B

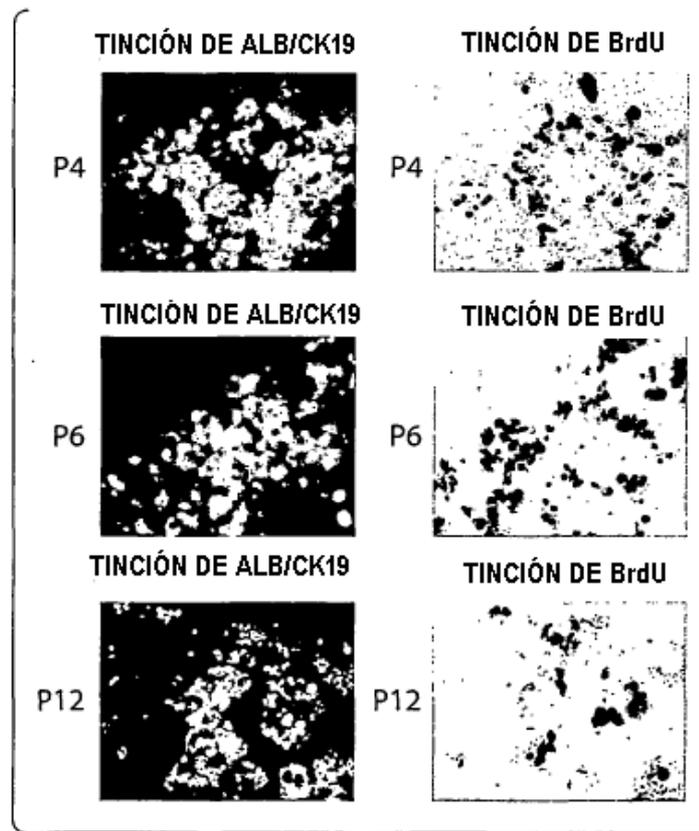


Fig. 2C



Fig. 3A

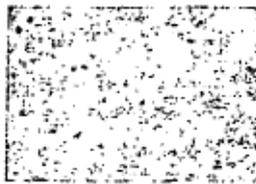


Fig. 3B

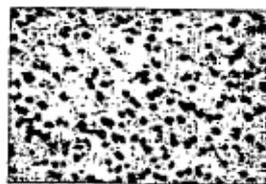


Fig. 3C



Fig. 3D

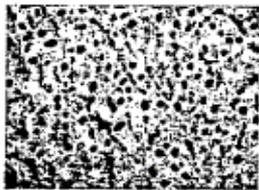


Fig. 3E



Fig. 3F



Fig. 3G

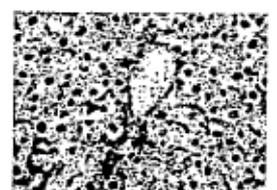


Fig. 3H

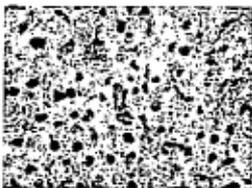


Fig. 3I



Fig. 3J



Fig. 3K



Fig. 3L



Fig. 3M

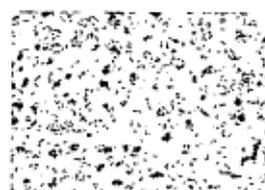


Fig. 3N

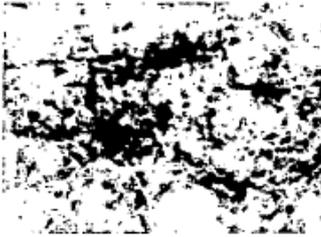


Fig. 4A



Fig. 4B

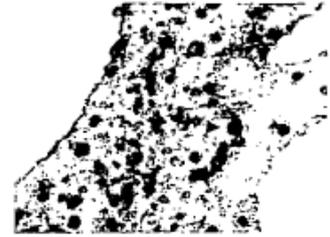


Fig. 4C

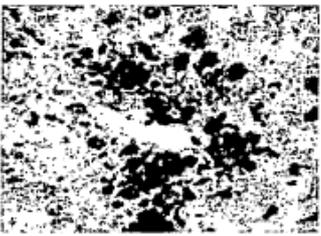


Fig. 4D



Fig. 4E

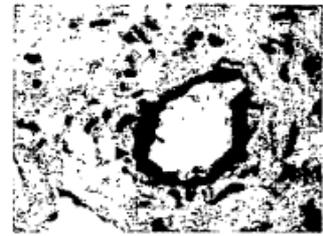


Fig. 4F



Fig. 4G

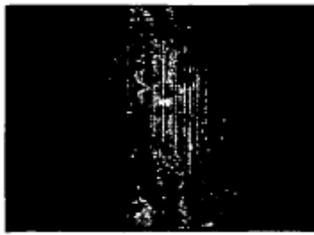


Fig. 4H

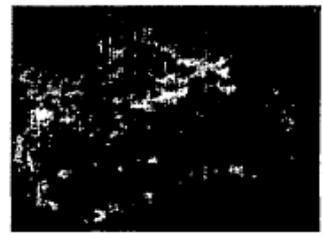


Fig. 4I

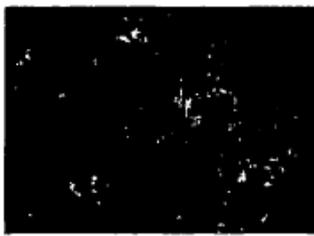


Fig. 4J

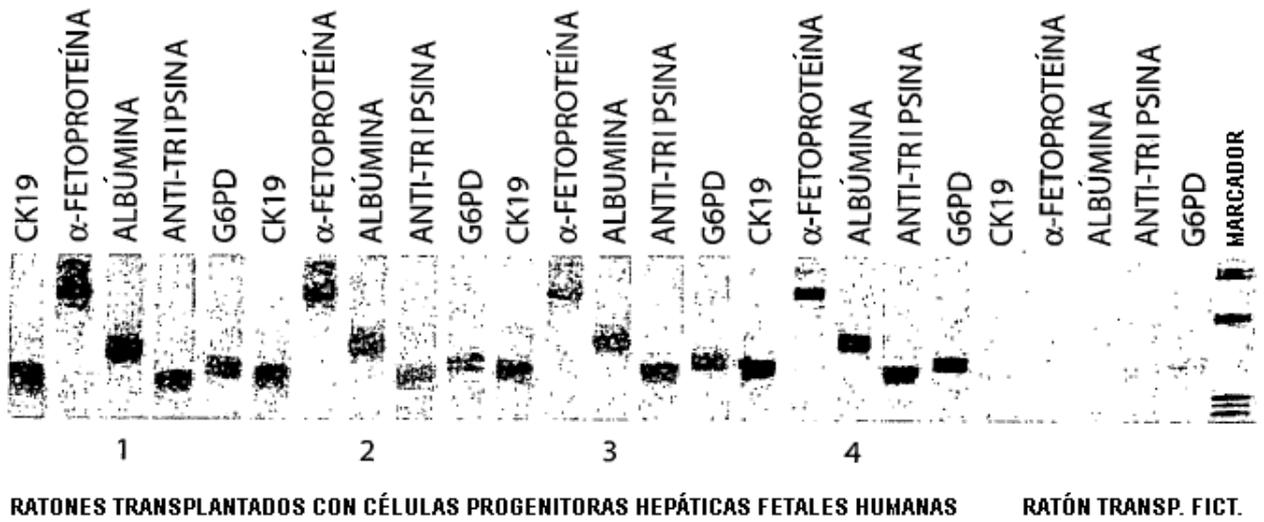


Fig. 4K

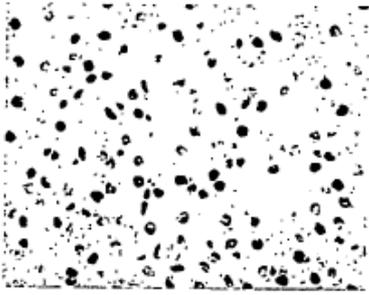


Fig. 5A

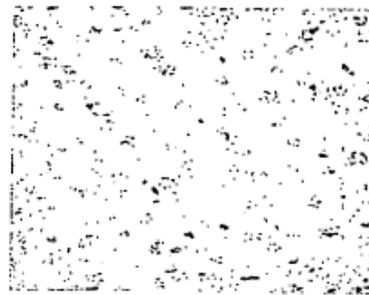


Fig. 5B

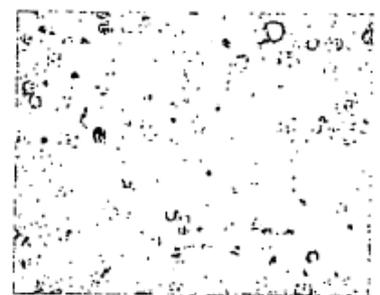


Fig. 5C



Fig. 5D

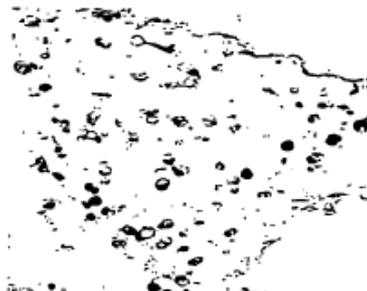


Fig. 5E

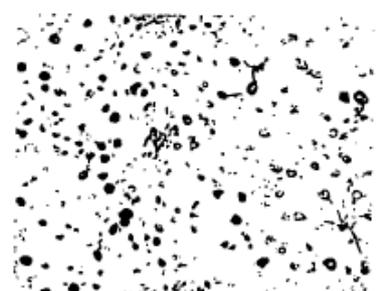


Fig. 5F

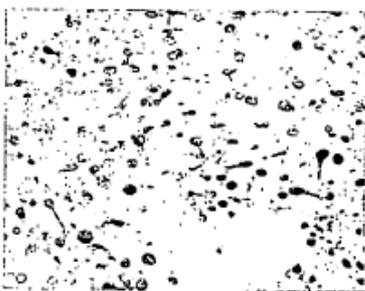


Fig. 5G

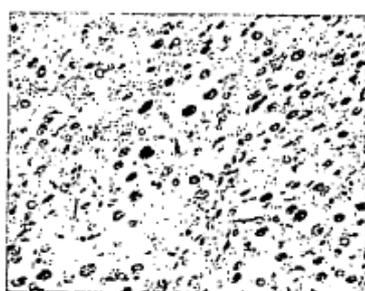


Fig. 5H

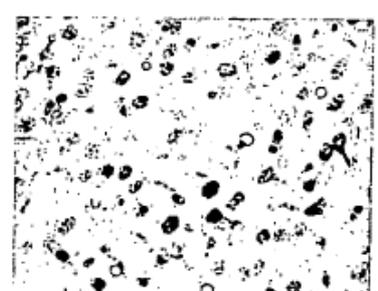


Fig. 5I

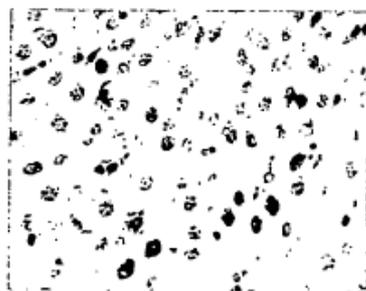


Fig. 5J

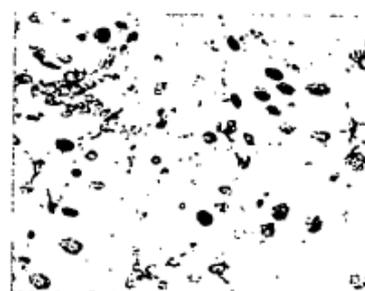


Fig. 5K

DETECCIÓN DE FVIII HUMANO EN RATONES DE HÍGADO DAÑADO TRANSPLANTADOS CON CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS HUMANAS

RATONES	Nº DE RATONES	DETECCIÓN DE FVIII HUMANO ng/ml
C57/BL ATÍMICOS NORMALES	10	19 ± 2,6
LESIÓN HEPÁTICA + HEPATECTOMÍA DE CÉLULAS NO HUMANAS	8	15 ± 3,9
LESIÓN HEPÁTICA + HEPATECTOMÍA +HGF/CÉLULAS ESTROMÁTICAS	8/8	20 ± 5,1 / 35 ± 10,2
LESIÓN HEPÁTICA + HEPATECTOMÍA +HPC	10	66 ± 15
LESIÓN HEPÁTICA + HEPATECTOMÍA + HGF + CÉLULAS ESTROMÁTICAS + HPC	15	121 ± 36

FIG. 6

EXPRESIÓN DE MARCADORES HEMATOPOYÉTICOS, HEPÁTICOS Y PANCREÁTICOS EN HÍGADOS FETAL Y ADULTO

ANTICUERPOS DE	% DE CÉLULAS DE HF DE 9 SEM	% DE CÉLULAS DE HF DE 18 SEM	% DE CÉLULAS DE HÍGADO ADULTO
CD117	0,9 ± 0,2	15 ± 1,5	0,003 ± 0,001
CD90	0,5 ± 0,3	12 ± 5,5	0,002 ± 0,001
CD34	2 ± 0,3	30 ± 7,5	0,04 ± 0,01
CD123	1 ± 0,05	12 ± 5,6	0,03 ± 0,02
CD133	0,3 ± 0,04	16 ± 7,0	0,002 ± 0,001
Fli-1	10 ± 4,0	8 ± 3,0	1 ± 0,05
Fli-1	2 ± 0,2	20 ± 4	0,002 ± 0,001
Tie-2	0,1 ± 0,02	8 ± 3	0
ALBÚMINA	0	15 ± 2,4	60 ± 10
AG. HEPATOCÍTICO	0	10 ± 2,2	0,004 ± 0,001*
HEA-125	0	10 ± 2,0	6 ± 2
CK19	0	5 ± 2,4	6 ± 2
c-Met	0,02 ± 0,01	5 ± 2,3	70 ± 6
α-FETOPROTEÍNA	9 ± 0,4	26 ± 7,9	0,008 ± 0,004
CD45	4 ± 2,2	12 ± 5,3	20 ± 5
CD14	3 ± 2,0	5 ± 3,9	3 ± 0,7
Gly A	70 ± 20	50 ± 10	10 ± 5
HLA DE CLASE I	4 ± 2,4	6 ± 3	70 ± 5
HLA DE CLASE II	2 ± 1,3	2 ± 1,3	10 ± 5
NESTINA	4 ± 2,3	6 ± 2	2 ± 0,4
AMILASA	4 ± 3,5	16 ± 4	5 ± 5,6
INSULINA	0,5 ± 0,1	2 ± 1,5	0,002 ± 0,001
POLIPÉPTIDO PANCREÁTICO	4 ± 3	18 ± 3	6 ± 1
GLUCAGÓN	4 ± 2,3	15 ± 3	5 ± 3,5

FIG. 7

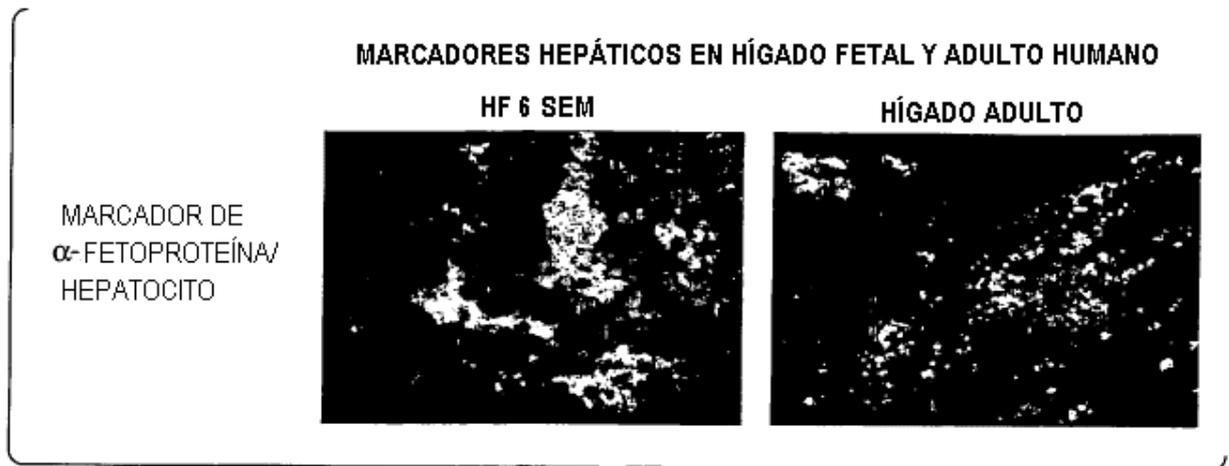


Fig. 8A

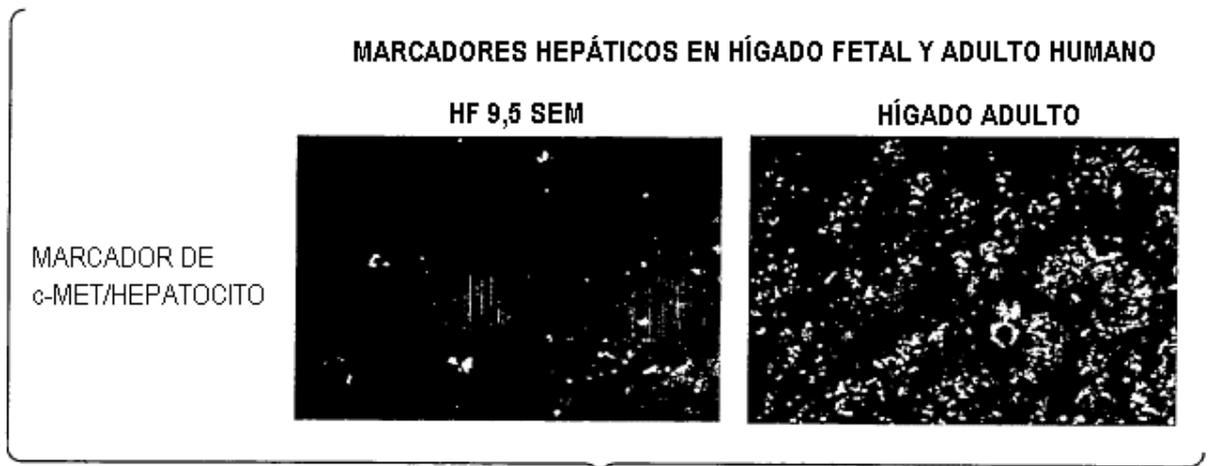


Fig. 8B

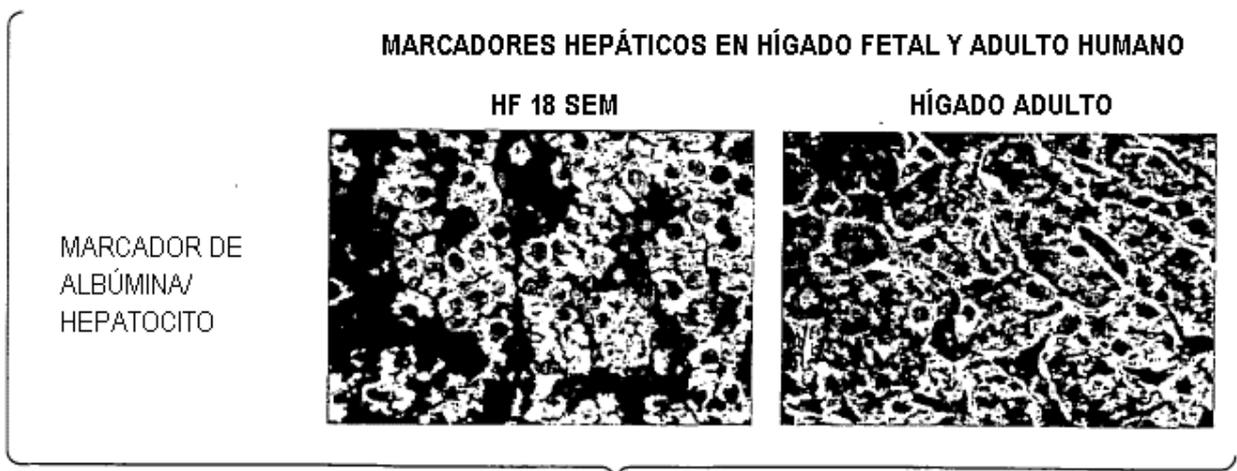


Fig. 8C

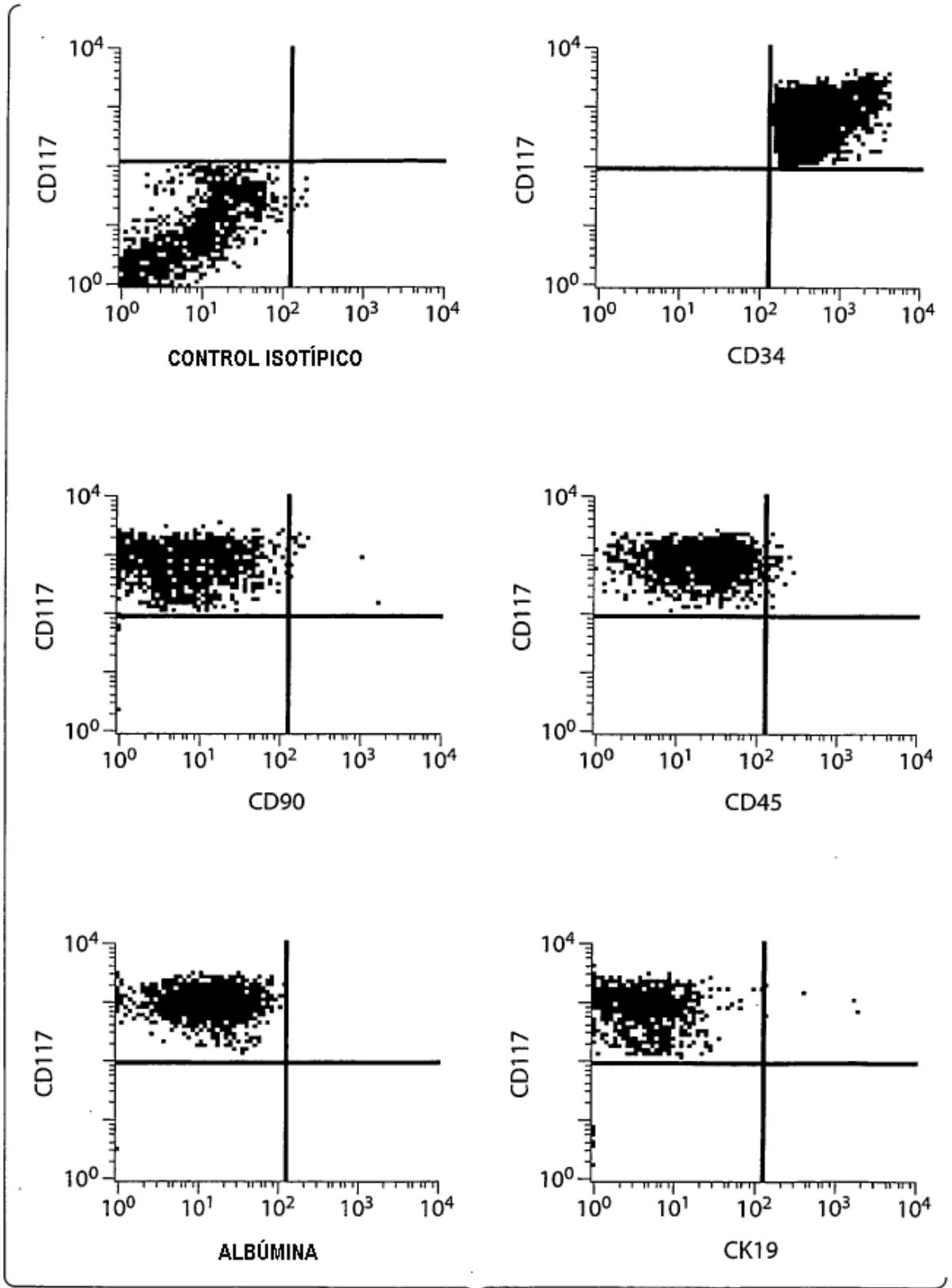
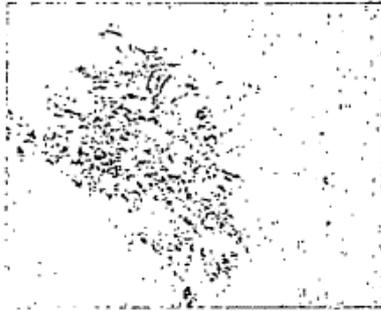


Fig. 9A

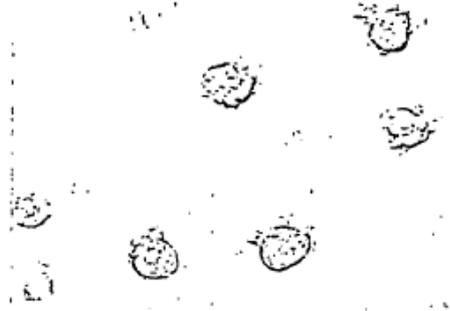
CÉLULAS CD117+/CD34+



SUPERFICIE RECUBIERTA CON COLÁGENO

Fig. 9B

CÉLULAS CD117+/CD34+



EN MATRIGEL

Fig. 9C

CÉLULAS CD117+/CD34+



Fig. 9D

CÉLULAS CD117+/CD34+



Fig. 9E

CÉLULAS CD117+/CD34+



Fig. 9F

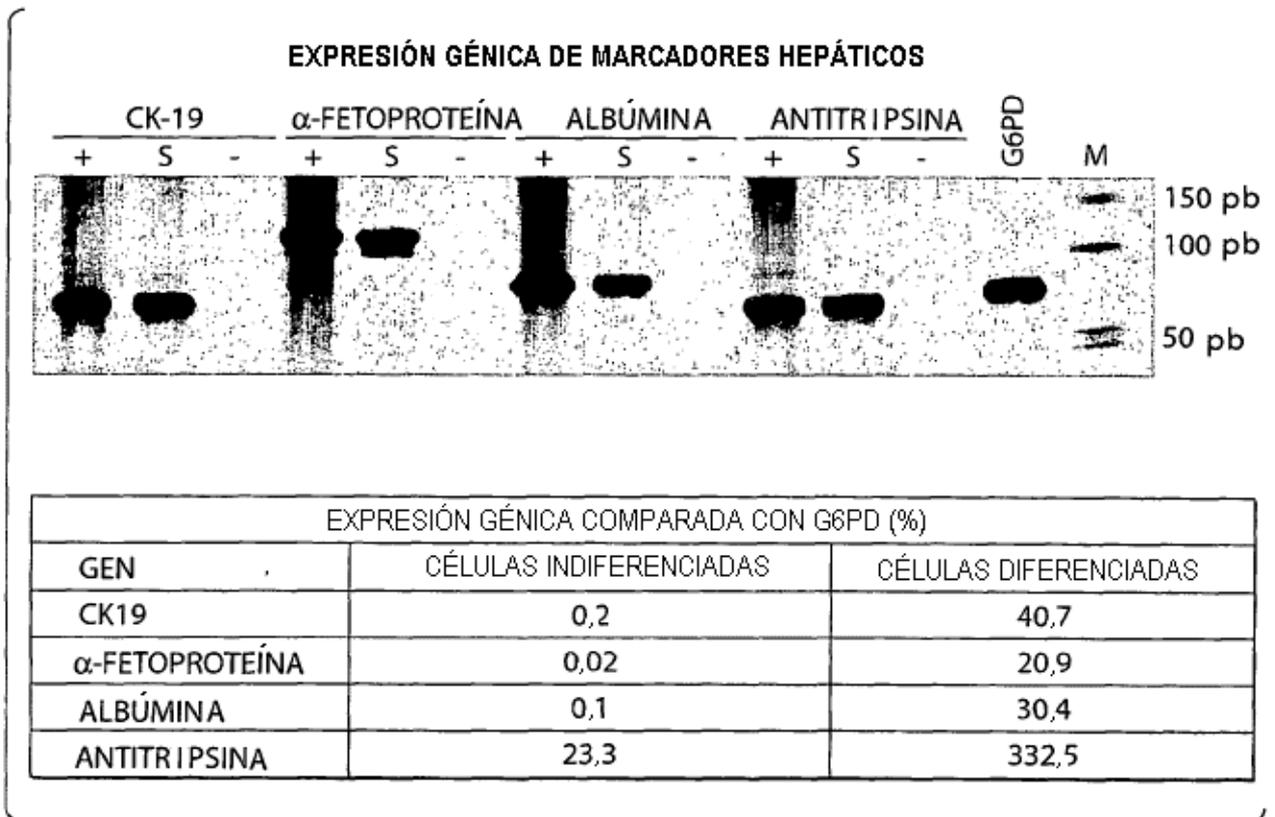


Fig. 10