

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 778**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2000 E 08019659 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2048228**

54 Título: **Células progenitoras hepáticas humanas**

30 Prioridad:

**19.01.1999 US 116331 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.05.2016**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT  
CHAPEL HILL (100.0%)  
Office of Commercialization and Economic  
Development, 100 Europa Drive, Suite 430  
Chapel Hill NC 27517, US**

72 Inventor/es:

**REID, LOLA M.;  
KUBOTA, HIROSHI y  
MOSS, NICHOLAS**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 569 778 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**5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con una composición de células progenitoras hepáticas humanas enriquecidas aisladas mediante un método que comprende las siguientes etapas: proporcionar una suspensión de células sustancialmente única de tejido extraído de hígado adulto humano; separar de la suspensión las células que tienen un diámetro de menos de 15 micras, y seleccionar las células que expresan además alfafetoproteína, albúmina, o ambos; en donde las células progenitoras hepáticas son capaces de dar lugar a hepatocitos y células biliares. Además, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende la composición de células progenitoras hepáticas humanas enriquecidas. La invención además abarca una célula progenitora hepática aislada o una población de esta que tiene un diámetro menos de 15 micras y que expresa (i) ICAM y (ii) alfafetoproteína, albúmina o ambos, en donde la célula progenitora hepática es capaz de dar lugar a hepatocitos y células biliares. Las invenciones constituyen la base para las terapias celulares y génicas y para la creación de órganos bioartificiales.

20 **Antecedentes**

La unidad estructural y funcional primaria del hígado maduro es el acino, que en sección transversal se organiza como una rueda alrededor de dos lechos vasculares distintos: 3-7 conjuntos de tríadas portales (cada una con una vénula porta, arteriola hepática y un conducto biliar) para la periferia y con la vena central en el eje. Las células hepáticas se organizan como placas celulares alineadas en ambos lados por el endotelio fenestrado, que define una serie de sinusoides que son contiguos con la vasculatura portal y central. Los datos recientes han indicado que los Canales de Hering, pequeños conductos ubicados alrededor de cada una de las tríadas portales, producen pequeños conductos que se extienden y empalman en las placas del hígado a lo largo de la zona 1 formando un patrón similar al de una escobilla (Theise, N. 1999 Hepatology. 30:1425-1433).

Un espacio estrecho, el Espacio de Disse, separa el endotelio de los hepatocitos a lo largo de la sinusoides. Como resultado de esta organización, los hepatocitos tienen dos dominios basales, cada uno de los cuales se enfrenta a una sinusoides y un dominio apical que se define por la región de contacto entre hepatocitos adyacentes. Los dominios basales contactan la sangre, y están involucrados en la absorción y secreción de componentes plasmáticos, mientras que los dominios apicales forman canalículos biliares, especializados en la secreción de sales biliares y se asocian a través de una red de interconexión con los conductos biliares. La sangre fluye de las vénulas portales y arteriolas hepáticas a través de las sinusoides a las vénulas hepáticas terminales y la vena central.

Basado en este patrón de la microcirculación, el acino se divide en tres zonas: zona 1, la región periportal; zona 2, la región midacinar, y la zona 3, la región pericentral. El potencial proliferativo, criterio morfológico, ploidía y la mayoría de los genes específicos del hígado se correlacionan con la ubicación zonal (Gebhardt, R., y otros. 1988. FEBS Lett. 241:89-93; Gumucio, J. J. 1989, Vol. 19. Springer International, Madrid; Traber, P. y otros 1988. Gastroenterology. 95:1130-43). Los gradientes en la concentración de los componentes sanguíneos, que incluyen oxígeno, a través de los acinos, y siguiendo la dirección del flujo sanguíneo de las tríadas portales a la vena central, son responsables de algo de esta zonación, por ejemplo, la compartimentación recíproca de la glicólisis y la gluconeogénesis. Sin embargo, la zonación periportal de la proteína de unión gap conexina 26 y la zonación pericentral de glutamina sintetasa, por citar sólo dos, son insensibles a tales gradientes, son más representativas de la mayoría de los genes específicos de tejido y parece que se determina por factores intrínsecos a las células o a variables diferentes de flujo sanguíneo en el microambiente.

Adicionalmente a los hepatocitos, las células epiteliales del conducto biliar (colangiocitos), y las células endoteliales, la región entre los tractos portal y central contienen otros tipos de células, tales como las células de Ito y células de Kupffer. Estas desempeñan papeles prominentes en las afecciones patológicas del hígado, especialmente en la inflamación y la fibrosis, pero su contribución directa a las principales funciones homeostáticas del órgano normal son aparentemente pequeñas.

El hígado se desarrolla como un resultado de la convergencia de un divertículo formado desde el intestino anterior caudal y el septum transversal, parte del mesénquima esplácnico. La formación de las células hepáticas empieza después de que el epitelio endodérmico interactúa con el mesodermo cardiogénico, probablemente a través de factores de crecimiento de fibroblastos. Las células hepáticas especificadas proliferan y penetran después en el mesénquima del septum transversal con una cuerda como modelo, que forma el primordio del hígado. La interacción directa epitelio-mesénquima es crítica en estas primeras etapas de desarrollo del hígado y dicta cuáles células se convertirán en hepatocitos o colangiocitos, y el endotelio fenestrado, respectivamente. Las mutaciones en los genes específicos de mesénquima *hlx* y *jumonji* bloquean el desarrollo del hígado, lo que ilustra la importancia de las contribuciones de este tejido. Al principio de su desarrollo, el hígado consiste de agrupaciones de hepatocitos

primitivos unidos por un endotelio continuo que carece de una membrana basal y células hemopoyéticas abundantes. A medida que el endotelio se transforma para convertirse en un endotelio discontinuo, fenestrado, la vasculatura, especialmente la vasculatura portal, se desarrolla más con la producción de membranas basales. El intersticio portal puede proporcionar el desencadenante para el desarrollo de los conductos biliares y como éste rodea las vénulas portales, arteriolas hepáticas, y los conductos biliares, se forman las tríadas portales. Los hepatocitos inmaduros proliferan rápidamente y se forman placas parenquimatosas, probablemente en respuesta a los cambios en la cantidad y distribución de tales moléculas de organización de tejido como C-CAM 105, Agpl 10, E-cadherina, y conexas, coincidentes con la reubicación de la mayoría, pero no todas, de las células hemopoyéticas en la médula ósea. Los estudios recientes sugieren que algunas células progenitoras hemopoyéticas persisten en el hígado de roedor inactivo adulto, y las células madre hemopoyéticas se han aislado tanto del hígado humano como de murino adulto (Crosbie, O. M. y otros 1999. *Hepatology*. 29:1193-8). La organización física madura se logra dentro de las primeras semanas después del nacimiento en roedores y en humanos, dentro de los primeros años. La zonación metabólica se establece de acuerdo con algo de horarios diferentes para diferentes enzimas, pero se hace evidente en el período posterior al nacimiento.

### Células madre y células progenitoras comprometidas

Las células madre se han definido como células primitivas que se auto replican, que son pluripotentes, es decir, producen células hijas con más de un destino, que se pueden expandir ampliamente y pueden reconstituir un tejido o tejidos. La mayoría de la literatura sobre las células madre se deriva de la literatura sobre embriones o sobre esos tejidos hematopoyéticos, epidérmicos, o intestinales.

Más recientemente, las definiciones se han modificado para reconocer clases particulares de células madre. Las que tienen el potencial para participar en el desarrollo de todos los tipos de células, que incluyen las células germinales se denominan **células madre totipotentes** e incluyen el cigoto y las células embrionarias normales hasta la etapa de la célula 8 (la mórula). Las células madre embrionarias, llamadas también células "ES", consisten en poblaciones celulares permanentes derivadas de células normales totipotentes, en blastocitos, que se reportaron por primera vez en la década de 1980. Las líneas de células ES se pueden cultivar *in vitro* con el mantenimiento de la totipotencia. Las células ES son tumorigénicas si se introducen en huéspedes inmunocomprometidos en cualquier sitio que no sea *en útero*, formando teratocarcinomas. Sin embargo, cuando se inyectan de nuevo en blastocistos normales, son capaces de reanudar el desarrollo embrionario y participar en la formación de un ratón normal, pero quimérico. Aunque se han establecido líneas celulares ES a partir de muchas especies (ratón, rata, cerdo, etc.), sólo el sistema de ratón se ha usado rutinariamente para generar animales con nuevos fenotipos (noqueados, transgénicos) mediante la fusión de células ES modificadas a partir de blastocistos y después implantando los blastocistos en huéspedes con embarazo simulado. Las líneas de células germinales embrionarias (EG), que muestran muchas de las características de las células ES, se pueden aislar directamente *in vitro* a partir de la población de células germinales primordiales. Al igual que con las células ES, las células EG forman teratocarcinomas cuando se inyectan en ratones inmunocomprometidos y contribuyen a quimeras, que incluyen la línea germinal, cuando se inyecta en blastocistos.

**Las células madre determinadas** son células pluripotentes que han restringido su potencial genético al de un número limitado de tipos de células y tienen un amplio potencial de crecimiento. Aumentar la evidencia tal como la del campo de la telomerasa sugiere que las células madre determinadas no se autoreplican, es decir, su progenie puede tener menos potencial de crecimiento que los parentales. Las células madre determinadas dan lugar a células hijas que pierden la pluripotencia restringiendo su potencial genético a un único destino, por ejemplo, hepatocitos, y se denominan **células progenitoras comprometidas**. En el linaje hepático existen células progenitoras hepatocíticas comprometidas y células progenitoras biliares comprometidas.

Experimentos recientes muy publicados han informado que los cultivos de células ES humanas se pueden establecer a partir de embriones humanos. Se ha sugerido que estas células ES humanas se pueden inyectar en los tejidos con la esperanza de que serán capaces de reconstituir órganos y tejidos dañados. Dados los hallazgos de que las células ES y EG forman tumores cuando se inyectan en sitios distintos *en el útero* (ver anteriormente), el plan de inocular células ES humanas en pacientes es poco realista y con la grave posibilidad de crear tumores en los pacientes. Para superar este callejón sin salida, algunos grupos están buscando el plan de diferenciar las células ES en condiciones microambientales definidas para convertir células madre determinadas que se pueden inocular después con seguridad a los pacientes. Por ejemplo, existe alguna medida de éxito en la generación de células progenitoras hemopoyéticas. Sin embargo, se mantiene la preocupación que las células ES residuales en el cultivo podrían plantear el riesgo de tumorigénesis, si los cultivos se inoculan en un paciente. En resumen, hasta que la investigación en la biología de desarrollo revele los innumerables controles que dictan los destinos de las células durante la embriogénesis, las células ES permanecerán como una herramienta experimental con pocas esperanzas para los programas clínicos en las terapias celulares o génicas. La única opción realista para los programas clínicos en las terapias celulares y génicas es usar células madre determinadas en las que el potencial genético se restringe a un número limitado de tipos de células. Por el contrario, las células ES pueden sustentar la gran promesa de los

órganos bioartificiales para los tipos de tejidos (*por ejemplo*, células hemopoyéticas) que se producen por las células ES en afecciones conocidas.

#### **Controversia alrededor de las células madre del hígado**

5 La presencia de células madre en hígado normal adulto es el tema de gran controversia en el campo de la biología de las células hepáticas. Más abajo se resumen los diversos modelos que prevalecen compitiendo en el campo. El texto en cursiva indica la idea clave de los diferentes modelos.

10 Algunos expertos en el campo consideran que **las células madre hepáticas existen sólo en el tejido embrionario**, que no existen células madre en hígados adultos, y que todas las células maduras hepáticas participan igualmente en los procesos regenerativos del hígado (Farber, E. 1992. En *The Role of Cell Types in Hepatocarcinogenesis*. S. A. E, editor. Academic Press, Nueva York.). El modelo de Farber considera todas las células del parénquima maduras que sean fenotípicamente co-iguales y que la conocida heterogeneidad de potencial de crecimiento y expresión génica en el hígado se debe sólo al microambiente. Farber propone que en afecciones oncogénicas, las células del parénquima adultas se retrodiferencian y convierten en células tumorales. Este modelo dominó el campo de la carcinogénesis hepática durante décadas y todavía tiene impacto en los estudios de regeneración del hígado.

20 Otros expertos creen que **todas las células hepáticas son células madres** (Kennedy, S. y otros 1995. *Hepatology*. 22:160-8; Michalopoulos, G. K. y otros 1997, *Science*. 276:60-6.). Estos investigadores creen que todas las células del parénquima son co-iguales, son muy plásticas y con la expresión génica dictada sólo por el microambiente. Bajo condiciones oncogénicas adecuadas, se plantea como hipótesis que las células del parénquima maduras se vuelven células madre que pueden convertirse posteriormente en células tumorales.

25 El **modelo de célula madre silente** se basa en los estudios de Wilson y Leduc (Wilson, J. W. y otros 1958. *J. Pathol. Bacteriol.* 76:441-449.). Al igual que en el campo hemopoyético, este concepto ganó la mayor credibilidad por parte de amplios estudios de carcinogénesis hepática (Marceau, N. 1994. *Gut*. 35:294-6.). Estos investigadores creen que las células progenitoras, que incluyen las células progenitoras bipotenciales, pueden persistir en el tejido adulto pero proponen que son vestigios raros o remanentes de poblaciones celulares del desarrollo embrionario. Asumen que las células progenitoras no juegan ningún papel en el funcionamiento normal o regenerativo del hígado sino sólo en estados de enfermedad (Overturf K, y otros 1999. *American Journal of Pathology*. 155:2135-2143.). Es decir, se supone que sean "silentes", similar a las células satélite en el músculo. Estas células se han descrito como "células ovales" a causa de la forma distintiva del núcleo de la célula. Son pequeñas (~9 µm) y expresan un perfil antigénico característico en la superficie celular. Se suponen que todas las células hepáticas maduras sean co-iguales con respecto al crecimiento y expresión génica y que todos los aspectos de heterogeneidad de la expresión génica se dicten sólo por el microambiente celular. Los defensores del modelo de célula madre silente rechazan energicamente cualquier idea de movimiento de las células del parénquima desde ubicaciones periportales a pericentrales. Se piensa que la importancia de las células madre y otras células progenitoras hepáticas es relevante sólo para los estados de enfermedad, especialmente la carcinogénesis. Así, estos investigadores han centrado sus esfuerzos en las células progenitoras candidatas en los animales tratados con varios insultos oncogénicos. Estos estudios muestran que las "células ovales" no forman un cuerpo reconocible de células que proliferan rápidamente en afecciones regenerativas o en afecciones de lesiones leves o moderadas. Un número significativo de poblaciones de células ovales proliferantes sólo se observan después de las lesiones del hígado bastante severas, (Grisham, J. W. y otros 1997. En *Stem Cells*. C. S. Potter, editor. Academic Press, Londres. 233-282.).

45 Un modelo basado en **la corriente de células hepáticas** (Arber, N. y otros 1988. *Liver*. 8:80-7; Zajicek, G. y otros 1991. *Liver*. 11:347-51.) ha sido criticado fuertemente e ignorado en gran medida (Jirtle, R. L. 1995. *Liver Regeneration and Carcinogenesis: Molecular and Cellular Mechanisms*. Academic Press, Nueva York.). Esta propuesta postula que un compartimiento de células madre en cada una de las tríadas portales produce células del parénquima adultas que "corren" hacia la vena central. El proceso de corriente pone a las células hijas en contacto con microambientes distintos lo que resulta en cambios en el fenotipo de las células. Una vez más, se plantea como hipótesis que el microambiente es el determinante crítico del fenotipo. Una gran parte de los investigadores se han opuesto a este modelo sugiriendo que es incongruente con los estudios que no muestran movimiento de las células del donante marcadas reintroducidas en el hígado (Kennedy, S. y otros 1995. *Hepatology*. 22:160-8.). Sin embargo, incluso en estudios que han proporcionado la evidencia más definitiva que contrarresta el modelo de corriente, no se sabe si la posición del microambiente o el linaje influye en la expresión de los marcadores usados en las células del donante. Además, es probable que la hipótesis del flujo hepático se vuelva a revisar después de los recientes hallazgos de Theise y asociados (Theise, N. 1999. *Hepatology*. 30:1425-1433.) de que los Canales de Herring, siempre sospechosos de estar relacionados con las células progenitoras hepáticas, extienden los conductos a lo largo de la placa del hígado, al menos en la zona 1.

60 Reid y asociados han defendido que el hígado es **una célula madre y el sistema de linaje madurativo** (Sigal, S. H. y otros 1992. *Am J Physiol*. 263:G139-48.). Proponen que los tejidos se organizan como linajes madurativos alimentados, como un resorte, mediante células madre o poblaciones de células progenitoras tempranas (Brill, S. y otros 1993. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 204:261-9.). El tejido se define como

que va de "células jóvenes, a edad madura, a viejas". El proceso madurativo se acompaña de cambios dependientes de la posición del linaje en el tamaño celular, morfología, perfiles antigénicos, potencial de crecimiento y expresión génica. Se plantea como hipótesis que estos cambios se deben a una combinación de cambios celulares autónomos, independientes del microambiente y de cambios microambientales inducidos; el microambiente comprende los nutrientes, intercambio de gases (oxígeno, CO<sub>2</sub>), pH, hormonas, interacciones célula-célula y química de la matriz extracelular.

**Tabla 1**

Zonas	1	2	3
<b>Ploidía</b>	Células diploides	Células tetraploides	Mezcla de célula tetraploides y octaploides
<b>Tamaño promedio</b>	7-20 μ	20-30 μ	30-50 μ
<b>Crecimiento</b>	Máximo	Producto intermedio	Despreciable
<b>Matriz extracelular</b>	Un gradiente en la química de la matriz se ubica en el espacio de Disse y consiste en colágeno de tipo IV mezclado con laminina y proteoglicanos de sulfato de heparina en el área periportal y convierte a colágenos fibrilares, fibronectina y proteoglicanos de heparina en el área pericentral.		
<b>Expresión génica</b>	Temprana	Producto intermedio	Tardía

Se plantea como hipótesis que el crecimiento es máximo en las células madre y células progenitoras tempranas y que disminuye con la progresión a través del linaje. Este modelo tiene en cuenta que la mayoría de las células en el tejido del hígado adulto son poliploides, la mayoría tetraploide u octaploide, menos de un tercio de las células son diploides. Los datos recientes apoyan el concepto de que la mayor parte del potencial regenerativo en un tejido se deriva de la población de células diploides y de que las células más viejas contribuyen a la regeneración aumentando la masa celular por medio de respuestas hipertróficas asociadas con poliploidía. (Sigal, S. H. y otros 1999. American Journal of Physiology. 276:G1260-72.). Por lo tanto, estos investigadores defienden que las mejores esperanzas para el crecimiento celular, ya sea en las terapias celulares o génicas o en órganos bioartificiales son con la población de células diploide del tejido.

La célula madre y el modelo de linaje madurativo contradicen otros modelos de desarrollo de células hepáticas al sugerir que la malignidad del hígado es muy frecuentemente un resultado de un insulto oncogénico indirecto, en vez de uno directo. Se proponen insultos oncogénicos para destruir a la mayoría de las células hepáticas, especialmente las células maduras en el linaje, lo que resulta en una inducción drástica de una respuesta regenerativa. La expansión resultante de las células progenitoras aumenta el riesgo de eventos mutacionales secundarios en las células que crecen rápidamente, las células progenitoras, que pueden resultar en la malignidad. Así, la hipótesis más antigua de que en el cáncer bloquea la diferenciación o que los cánceres se deben a insultos oncogénicos que se dirigen las células madre se aceptan como correctas pero con la modificación presentada anteriormente.

El aumento de la aceptación de un modelo de linaje madurativo se basa ahora en los datos de que el hígado está repleto de características indicativas de un proceso de diferenciación apoptótico o terminal (Sigal, S. H. 1995. Differentiation. 59:35-42.) y los hallazgos que sólo ciertas subpoblaciones de células hepáticas presentes en hígados adultos son capaces de amplia división celular (Overturf K, y otros 1999. American Journal of Pathology. 155:2135-2143; Tateno, C. y otros 2000. Hepatology. 31:65-74.). En este modelo las células progenitoras y una subpoblación de células adultas (se supone que sea la subpoblación diploide) son capaces de reconstituir el tejido hepático cuando se reinyecta *in vivo*, y son capaces de crecimiento amplio que incluyen el crecimiento clonal.

La patente de los Estados Unidos núm. 5.559.022 de Naughton describe el aislamiento de las células hepáticas y la purificación adicional mediante el uso de centrifugación en gradiente. Sin embargo, la población de células aisladas es la "población de células del parénquima acidófilo", que no son las células progenitoras hepáticas de esta invención tal como se reivindica.

**Aplicabilidad preclínica y clínica de las células progenitoras hepáticas**

Existe un fuerte interés clínico y comercial para aislar e identificar células progenitoras inmaduras del hígado debido al impacto que tal población de células puede tener para tratar enfermedades hepáticas. Cada año en los Estados Unidos, existen aproximadamente 250,000 personas hospitalizadas por fallo del hígado. Los trasplantes de hígado son curativos para algunas formas de insuficiencia hepática y aproximadamente 4100 trasplantes se realizan al año

5 en Estados Unidos. Uno de los factores limitantes en el trasplante de hígado es la disponibilidad de hígados de donantes, especialmente dada la restricción de que los hígados de donantes para el trasplante de órganos deben originarse de pacientes que han sufrido muerte cerebral pero no paro cardíaco. Los hígados de donantes cadavéricos no han tenido éxito, aunque los esfuerzos recientes para usar tales donantes han apoyado la posibilidad de usarlos si se obtiene el hígado dentro de una hora de la muerte.

10 El trasplante de células en el hígado es un tratamiento alternativo atractivo para la mayoría de las enfermedades del hígado. Los procedimientos quirúrgicos para el trasplante celular son menores con respecto a los necesarios para el trasplante de órgano completo y, por lo tanto, se puede usar para pacientes con varios riesgos quirúrgicos tales como la edad o enfermedad. El uso de células hepáticas humanas es superior a las células hepáticas derivadas de otros mamíferos porque los patógenos potenciales, si los hay, son de origen humano y podrían ser mejor toleradas por los pacientes y se podrían tamizar fácilmente antes de su uso.

15 Los intentos para llevar a cabo el trasplante de células hepáticas han hecho uso de células hepáticas maduras sin fraccionar y han mostrado alguna medida de eficacia (Fox, I. J. y otros 1998. New England Journal of Medicine. 338:1422-1426.). Sin embargo, los éxitos requieren la inyección de grandes números de células (10-20 billones), puesto que las células no crecen *in vivo*. Además, la introducción de números sustanciales de células hepáticas maduras grandes (diámetro celular promedio de 30-50  $\mu$ ) es complicado por su tendencia a formar grandes agregados tras la inyección, lo que resulta en émbolos potencialmente fatales. Además, estas células provocan una respuesta inmunológica de rechazo marcada que obliga a los pacientes a mantenerse bajo fármacos inmunosupresores para el resto de sus vidas. Por último, las células maduras del hígado no se han criopreservado con éxito y se requiere una logística complicada para coordinar la disponibilidad de tejido del hígado adecuado, la preparación de suspensiones de células y la entrega inmediata de las células para las terapias clínicas.

25 **Avances en el aislamiento de células progenitoras hepáticas**

30 Se conoce que el aislamiento de células progenitoras hepáticas a partir del hígado es una tarea extremadamente difícil debido a la escasez de marcadores que seleccionan positivamente las células hepáticas. Los únicos anticuerpos disponibles para candidatos de células progenitoras hepáticas son los anticuerpos monoclonales que se preparan contra subpoblaciones de células progenitoras hepáticas (células ovas) inducidas para proliferar después de la exposición a los insultos oncogénicos. Estos anticuerpos, sin embargo, reaccionan de forma cruzada con los antígenos presentes en las células hemopoyéticas.

35 En el pasado se realizaron intentos para obtener la población de células progenitoras hepáticas, sugeridas para ser la población más versátil para terapia celular y génica del hígado. Las patentes de estados Unidos núms. 5.576.207; 5.789.246 otorgadas a Reid y otros utilizan marcadores de superficie celular y citometría de flujo con dispersión lateral para proporcionar una subpoblación definida en el hígado. Se han aislado subpoblaciones de células hepáticas de rata mediante la extracción de células de linaje comprometidas seguido por la selección de precursores hepáticos inmaduros que se detectaron como células agranular que contienen marcadores de células OC.3 positivas (marcador antigénico de célula oval), AFP-positivo, albúmina-positivo, y CK19-negativo (citoqueratina 19). Las subpoblaciones de hígado de rata anteriores demuestran características particulares importantes en el aislamiento y la identificación de células progenitoras hepáticas enriquecidas a partir de hígado de roedores.

45 El aislamiento de células progenitoras hepáticas a partir de hígado humano adulto, como se describe en la presente descripción, es novedoso e inesperado debido en parte a la controversia con respecto a la simple presencia de células progenitoras hepáticas en el adulto en donde se asume que las células progenitoras hepáticas humanas no están presentes o son un remanente fisiológicamente silente de la embriogénesis. Por lo tanto, no se han realizado intentos por aislarlas o estudiarlas, excepto en estados de enfermedad.

50 A modo de contraste, dentro del hígado en desarrollo la presencia de las proteínas citoplasmáticas alfafetoproteína (AFP) y albúmina se reconoce como un fuerte indicador positivo de células progenitoras. En las primeras etapas del desarrollo del hígado estas células son capaces de producir descendencia lo que introduce ambos linajes biliares y hepatocitos. Si estas células hijas se comprometen con el linaje biliar cesa la expresión de alfafetoproteína. Sin embargo, la expresión de alfafetoproteína persiste en el linaje de hepatocitos hasta el período perinatal cuando se suprime, quedando la expresión de albúmina como una de las características principales del hepatocito adulto.

55 Sin embargo, ya que la alfafetoproteína es una proteína intracelular y solamente se puede visualizar después de la fijación y permeabilización de la célula, es inadecuada como marcador para la identificación de células progenitoras hepáticas viables.

60 **Breve descripción de la invención**

La presente invención se relaciona con una composición de células progenitoras hepáticas humanas enriquecidas aisladas mediante un método que comprende las siguientes etapas: proporcionar una suspensión de células

sustancialmente única de tejido extraído de hígado adulto humano; separar de la suspensión las células que tienen un diámetro de menos de 15 micras, y seleccionar las células que expresan además alfafetoproteína, albúmina, o ambos; en donde las células progenitoras hepáticas son capaces de dar lugar a hepatocitos y células biliares. La alfafetoproteína y albúmina pueden ser de longitud completa o una variante. El proceso de separación puede comprender una separación por tamaño de la célula, densidad de flotación, o ambos. La separación puede basarse también en la velocidad de sedimentación, el radio hidrodinámico y la sedimentación a la densidad de equilibrio. Como alternativa, la separación puede ser por adherencia relativa de los marcadores de superficie a los componentes de unión, por ejemplo, anticuerpos o lectinas. Las células progenitoras aisladas pueden ser diploides y son de menos de aproximadamente 15 micrómetros de diámetro. Además, las células progenitoras o su progenie pueden sintetizar macromoléculas características de las células progenitoras, que incluyen, pero no se limitan a, alfafetoproteína y albúmina. Preferentemente, la alfafetoproteína incluye la secuencia del péptido que codifica el exón 1 (aFP). Así, la alfafetoproteína se transcribe a partir de un ARNm mayor que 2 Kb de tamaño, un ARNm aFP de longitud completa. Del mismo modo, la albúmina incluye preferentemente la secuencia del péptido que codifica el exón1 (ALB). Así, la albúmina se transcribe a partir de un ARNm de longitud completa.

Además, en la presente descripción se describe un método de aislamiento, crioconservación, y uso de células progenitoras hepáticas humanas que incluye procesar tejido de hígado humano para proporcionar una suspensión de células sustancialmente única que incluye células progenitoras y no progenitoras de uno o más linajes celulares encontrados en el hígado humano; someter la suspensión a una etapa de reducción de volumen, que reduce sustancialmente el número de células no progenitoras en la suspensión, para proporcionar una suspensión de citorreducción enriquecida en células progenitoras que exhibe uno o más marcadores asociados con al menos uno de los linajes celulares; opcionalmente seleccionar de la suspensión de citorreducción esas células, donde ellas mismas, su progenie o las formas más maduras de estas expresan al menos un marcador asociado con al menos un linaje celular de hígado; opcionalmente, suspender las células en condiciones óptimas para la crioconservación; y opcionalmente usarla para la producción de factores de crecimiento y para la terapia en pacientes. Preferentemente, se seleccionan las células progenitoras hepáticas que expresan proteínas citoplasmáticas tales como alfafetoproteína. Las etapas de procesamiento o de citorreducción de esta invención incluyen preferentemente una centrifugación en gradiente de densidad o elutriación centrífuga de la suspensión de células hepáticas para separar las células de acuerdo con su densidad de flotación y/o tamaño, que se asocian con una o más fracciones de gradiente con una densidad de flotación inferior y/o tamaño más pequeño. El método de gradiente de densidad puede incluir centrifugación zonal y centrifugación de flujo continuo.

La selección negativa de las células no progenitoras incluye preferentemente células hepáticas maduras, hematopoyéticas, y mesenquimales mediante el uso de marcadores asociados con las células hepáticas maduras, tales como conexina, marcadores asociados con células hemopoyéticas, tales como glicoforina A y CD45, y/o marcadores asociados con células mesenquimales maduras, tales como retinoides y el factor de von Willebrand.

Los inventores han encontrado que el uso de las células progenitoras hepáticas puede superar muchas de las deficiencias asociadas con el uso de células hepáticas maduras, haciéndolas células ideales para el uso en terapias celulares y génicas y para órganos bioartificiales. Las células son pequeñas (7-15  $\mu$ ), por lo tanto se minimiza la formación de émbolos grandes. Además, las células tienen crecimiento extensivo potencial lo que significa que se necesitan menos células para la reconstitución de tejido del hígado en un paciente. Por último, las células progenitoras tienen marcadores antigénicos mínimos que podrían provocar el rechazo inmunológico lo que proporciona la esperanza de que podría ser necesario poco o ningún fármaco inmunosupresor. La terapia con células hepáticas involucra el tratamiento extracorpóreo o trasplante de células hepáticas. Las células, incluyendo preferentemente las células progenitoras, se suministran en cualquier forma, que incluye por vía parenteral y por vía intraperitoneal. Es necesaria una cantidad eficaz de células, preferentemente entre 10<sup>3</sup> y 10<sup>10</sup> células. Con mayor preferencia se trasplantan entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>8</sup> células, óptimamente aproximadamente 10<sup>6</sup> células.

Las células progenitoras hepáticas son extremadamente útiles para la producción de factores de crecimiento y otras proteínas. Estos factores se asocian con su propio crecimiento o el de otras células progenitoras en el hígado (por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas o mesenquimales) y los factores asociados con las primeras etapas de la dedicación de células progenitoras hepáticas a un linaje particular. Estos nuevos factores de crecimiento se pueden usar para tratar la enfermedad del hígado o para controlar los cánceres que son transformantes de las células progenitoras hepáticas. Además, las células progenitoras hepáticas son objetivos importantes para la terapia génica, en donde las células progenitoras hepáticas transformadas genéticamente o normales insertadas promueven la salud del individuo en quien se trasplantan tales células progenitoras hepáticas.

El método descrito en la presente descripción permite la determinación de perfiles antigénicos únicos en la superficie celular que se correlacionan con la expresión de alfafetoproteína dentro de la célula. La caracterización de las células que contienen alfafetoproteína de esta manera permite el enriquecimiento posterior de las células progenitoras hepáticas viables por la metodología de citometría de flujo a partir de suspensiones de células individuales preparadas a partir de hígados completos o lóbulos de hígado. Además, el aislamiento e identificación de células progenitoras hepáticas humanas como se describe en la presente descripción se obtuvieron a través de la

aplicación de una combinación de métodos únicos, marcadores y parámetros que los presentes inventores usaron por primera vez para lograr la población de células únicas de esta invención.

En la presente descripción se enseñan, además, células progenitoras de células hepáticas de origen hepático, hematopoyético, o mesenquimal. Estos linajes celulares, su progenie o sus formas más maduras se seleccionan mediante marcadores antigénicos seleccionados del grupo que consiste en CD14, CD34, CD38, CD45, CD117, ICAM, glicoforina a, y/o marcadores citoplásmicos tales como inmunoreactividad de tipo alfafetoproteína, inmunoreactividad de tipo albúmina, o ambos. La alfafetoproteína se puede derivar de un ARNm de longitud completa (mayor que 2 Kb, la forma expresada por lo general en células progenitoras hepáticas) o a partir de una forma variante (menos que 2 Kb, es decir, aproximadamente 0,5; 0,8; 1; 1,5; o 2 Kb, la forma expresada por lo general en células progenitoras hemopoyéticas). Estas células progenitoras hepáticas se pueden aislar del hígado de un feto, un recién nacido, un bebé, un niño, un joven o un adulto.

De acuerdo con un aspecto adicional de esta invención, las células progenitoras hepáticas humanas aisladas se aíslan en una forma altamente enriquecida a sustancialmente pura. Las células progenitoras hepáticas tienen la capacidad de desarrollarse en hepatocitos, células biliares o una combinación de estas; las células progenitoras hematopoyéticas tienen la capacidad de desarrollarse en macrófagos, neutrófilos, granulocitos, linfocitos, plaquetas, neutrófilos eosinófilos, basófilos o una combinación de estas. Las células progenitoras mesenquimales tienen la capacidad de desarrollarse en células endoteliales, células del estroma, células estrelladas hepáticas (células Ito), células de cartílago, células óseas o combinaciones de estas. El método enseñado en la presente descripción se puede usar para seleccionar células progenitoras mesenquimales que expresan inmunoreactividad de tipo alfafetoproteína, CD45, reactividad de tipo albúmina, CD34, osteopontina, sialoproteína ósea, colágeno (tipos I, II, III, o IV), o una combinación de estos.

En la presente descripción se enseña, además, un método para aliviar los efectos negativos de uno o más trastornos o disfunciones humanas mediante la administración a un individuo que sufre de tales efectos negativos una cantidad eficaz de células progenitoras hepáticas humanas aisladas. Las células progenitoras se pueden administrar ya sea por vía intraperitoneal, o parenteral a través de un vaso vascular, de administrar directamente en el hígado. La administración directa se puede efectuar quirúrgicamente a través de la vena porta, vena mesentérica, arteria hepática, conducto biliar hepático o combinaciones de estos. Alternativamente, las células progenitoras hepáticas se pueden administrar en un sitio ectópico del individuo, tales como el bazo o peritoneo.

Los trastornos o disfunciones humanos que se pueden aliviar por el método incluyen: hepatocolangitis, hepatomalacia, hepatomegalia, cirrosis, fibrosis, hepatitis, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica, o errores innatos del metabolismo, y cáncer de hígado tales como hepatocarcinoma o hepatoblastoma. El cáncer de hígado puede ser un sitio primario de cáncer o uno que se ha metastatizado en el hígado. El tumor metastásico se podría derivar de cualquier número de sitios primarios que incluyen, intestino, próstata, mama, riñón, páncreas, piel, cerebro, pulmón o una combinación de estos.

Se enseña además en la presente descripción un biorreactor que incluye material biológico que comprende células progenitoras aisladas a partir de hígado humano, su progenie, sus descendientes en maduración o diferenciados, o combinaciones de estos; y medios de cultivo, tales como medios basales; uno o más compartimentos que sujetan el material o los componentes biológicos que comprenden el material biológico; y opcionalmente uno o más puertos de conexión. Además el biorreactor puede, opcionalmente, además incluir: matriz extracelular, hormonas, factores de crecimiento, nutrientes o combinaciones de estos; y un fluido biológico tal como suero, plasma, o linfa.

El biorreactor se adapta para sostener dichas células progenitoras en un estado viable, funcional, y puede sostener células progenitoras hepáticas durante un periodo en el intervalo de aproximadamente una semana a aproximadamente 55 semanas. Específicamente, el biorreactor se adapta para el uso como hígado artificial, para fabricación de productos, estudios toxicológicos o estudios metabólicos, que incluyen estudios que implican la actividad del citocromo P450 u otros tipos de metabolismo de fármacos.

De acuerdo con aún otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición de células progenitoras hepáticas humanas aisladas, o una suspensión enriquecida en células progenitoras obtenidas a partir de hígado humano. La suspensión de células se proporciona en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y se puede administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento. La composición de esta invención incluye células progenitoras hepáticas que muestran uno o más marcadores asociados con al menos uno de uno o más linajes celulares encontrados en el hígado humano y están sustancialmente libres de células maduras. Más particularmente, las células progenitoras hepáticas aisladas se derivan de uno o más linajes de células hepáticas que incluyen linajes de células hepáticas, hematopoyéticas o mesenquimales y de ellos mismos, su progenie o formas más maduras de los progenitores de estos expresan al menos uno o más de marcadores antigénicos CD14, CD34, CD38, CD90, o CD117, CD45, glicoforina A, y marcadores citoplásmicos de inmunorreactividad de tipo alfafetoproteína, inmunorreactividad de tipo albúmina, o ambos. En una modalidad adicional, las células inmaduras, su progenie, o más formas maduras expresan osteopontina, sialoproteína ósea, colágeno I, colágeno III, colágeno IV, o una combinación de estos.



Además, en la presente descripción se proporciona un sistema de cultivo celular de células progenitoras hepáticas que incluye células progenitoras aisladas de hígado humano, su progenie, sus descendientes en maduración o diferenciadas, o combinaciones de estas. El sistema de cultivo celular adicionalmente incluye matriz extracelular que comprende uno o más colágenos, una o más proteínas de adhesión (lamininas, fibronectinas) y otros componentes tales como proteoglicanos (tales como proteoglicanos heparán sulfato); o un componente de matriz individual. El componente de matriz incluye fragmentos de componentes de matriz, miméticos de matriz que pueden ser materiales sintéticos y biodegradables (es decir microesferas) recubiertos con uno o más de los factores de una de las clases de matrices extracelular. El sistema de cultivo celular adicionalmente puede incluir medios basales o enriquecidos y otros nutrientes; hormonas, factores de crecimiento, y, opcionalmente, un fluido biológico tal como suero, plasma o linfa. Además, el sistema de cultivo celular puede tener uno o más compartimientos que sujetan el material biológico tales como una placa de cultivo, placa, frasco, botella de rotación, recipiente transwell u otro de ese tipo.

Los cultivos o biorreactores se pueden usar en uno o más estudios metabólicos que incluyen estudios que implican la actividad de sistemas enzimáticos de biotransformación de fase I o II, uno o más estudios de transporte que incluyen estudios que implican la expresión, regulación y actividad de los sistemas de transporte sinusoidal y canalicular hepáticos, facetas de metabolismo de los fármacos, y la actividad del citocromo P450 entre otros.

Se enseña además en la presente descripción como se proporciona un método de crioconservación de células adherentes. El método para la crioconservación de células adherentes comprende (a) proporcionar células adherentes y una matriz o un potenciador de viscosidad; (B) suspender las células en una mezcla de crioconservación que comprende medio de cultivo, un inhibidor de cristales de hielo, un factor de regulación de carbohidratos, un donador de hierro, una lipoproteína y un lípido; y (c) enfriar la suspensión por debajo del punto de congelación de las células. El punto de congelación aquí significa la temperatura a la que las células se vuelven una masa sólida, ya sea que es un líquido o vidrio sobreenfriado, una masa microcristalina o macrocristalina. Además, una mezcla para la crioconservación se describe que comprende un medio de cultivo, un inhibidor de cristales de hielo, un factor regulador de carbohidrato, un donador de hierro, una lipoproteína y un lípido. La mezcla de crioconservación puede incluir además un antioxidante, tal como ácido ascórbico, glicerol (10% v/v) o dimetilsulfóxido (DMSO, 10% v/v), los dos últimos agentes que pueden actuar como inhibidores de la formación de cristales de hielo. El factor regulador de carbohidratos puede ser insulina o factor de crecimiento de tipo insulina. El donador de hierro, lipoproteína y lípido puede ser transferrina, lipoproteína de alta densidad, y ácidos grasos libres, respectivamente. Los ácidos grasos libres son opcionalmente complejos con albúmina. La mezcla de crioconservación puede incluir colágeno, una sustancia de tipo colágeno, agarosa, metilcelulosa o gelatina, donde el colágeno puede ser colágeno I, colágeno III o colágeno IV. Los componentes de la mezcla de crioconservación se pueden preparar en Viaspan o solución de crioconservación de la Universidad de Wisconsin.

Se enseña además en la presente descripción una recolección, banco de células, catálogo o depósito biológico que tiene una pluralidad de células progenitoras hepáticas crioconservadas y/o su progenie. Los progenitores se pueden aislar mediante el método descrito anteriormente y pueden ser además las células progenitoras hepáticas aisladas por cualquier método aceptable que proporciona células progenitoras hepáticas que expresan alfafetoproteína, albúmina de longitud completa, o ambas. De manera similar, las células progenitoras pueden expresar marcadores indicativos de alfafetoproteína, albúmina de longitud completa, o ambas. El depósito puede incluir un sistema de indicación de marcadores de células. Después de la descongelación, las células del depósito se pueden usar para inocular biorreactores, para iniciar los cultivos de células, o para la terapia de los pacientes.

Además, en la presente descripción se enseña una alfafetoproteína variante que es el producto génico de un gen o ARNm que pierde el exón1, definido más abajo. La alfafetoproteína variante se asocia frecuentemente con células progenitoras hemopoyéticas y su progenie y no se asocia con células progenitoras hepáticas.

Además, en la presente descripción se enseña un conjugado de una macromolécula y un péptido que comprende entre tres y diez aminoácidos de la secuencia codificada del exón 1 de alfafetoproteína y adecuado para el uso como un antígeno. La macromolécula puede ser albúmina, hemocianina, caseína, ovoalbúmina, polilisina, por ejemplo, poli-L-lisina o poli-D-lisina, y cualquier otra macromolécula adecuada conocida en la técnica. El antígeno que se puede usar genera anticuerpos específicos para la alfafetoproteína cuya expresión es indicativo de células progenitoras hepáticas y no indicativo de células progenitoras hematopoyéticas o su progenie. Los anticuerpos se pueden producir mediante la inmunización de un animal con el antígeno en ausencia o presencia de adyuvante, o exponiendo células del bazo al antígeno seguido por fusión de las células del bazo para formar hibridomas, tal como se conoce en la técnica.

Además, en la presente descripción se describe un método para aislar células progenitoras hepáticas humanas, que comprende procesar tejido de hígado humano para proporcionar una suspensión de células sustancialmente única que comprende células progenitoras y no progenitoras de uno o más linajes celulares encontrados en el hígado humano, someter la suspensión a una etapa de citorreducción, que reduce sustancialmente el número de células no

progenitoras en la suspensión para proporcionar una suspensión citorreducida enriquecida en células progenitoras que exhiben uno o más marcadores asociados con al menos uno de uno o más linajes celulares, y seleccionar de la suspensión citorreducida esas células, que ellas mismas, su progenie, o formas más maduras de estas expresan uno o más marcadores asociados con al menos uno de uno o más linajes de células.

5

### Breve descripción de las figuras

- Figura 1. Análisis por PCR de ARNm de alfafetoproteína  
 10 Figura 2. Análisis por PCR de ARNm de albúmina  
 Figura 3. Efecto de la crioconservación en la viabilidad de las células hepáticas fetal  
 Figura 4. Panel izquierdo, Histograma de inmunofluorescencia de alfafetoproteína mediante FACS panel derecho, Histograma de inmunofluorescencia de albúmina mediante FACS  
 15 Figura 5. Porcentaje de células que expresan marcadores de superficie CD14, CD34, CD38, CD45 y Glicoforina A (GA) en suspensiones de células hepáticas sin fraccionar.  
 Figura 6. Co-expresión de marcadores de superficie celular y alfafetoproteína por células hepáticas fetal  
 Figura 7. Parte superior izquierda, porcentaje de células positivas para alfafetoproteína parte superior derecha, Porcentaje de células positivas para albúmina parte de abajo, Efecto de Fraccionamiento con Percoll en la co-expresión de alfafetoproteína y albúmina  
 20 Figura 8. Análisis FACS de una suspensión de células hepáticas fetal para la coexpresión de CD14, CD38 y alfafetoproteína.  
 Figura 9. Rendimiento de células positivas para alfafetoproteína usando la selección con CD14 y/o CD38.  
 Figura 10. Cuatro vistas de inmunofluorescencia representativa de células progenitoras hepáticas fetales teñidas para alfafetoproteína.  
 25 Figura 11. Efecto de la selección para CD14 (derecha): Vistas de contraste por interferencia diferencial (parte superior) e inmunofluorescencia (parte de abajo).  
 Figura 12A. Un aglomerado de células hepáticas mediante microscopía de contraste de fase.  
 Figura 12B. El mismo aglomerado de células hepáticas mediante Inmunofluorescencia con anticuerpos para alfafetoproteína.  
 30 Figura 12C. Una superposición de A y B.  
 Figura 13A. Células hepáticas teñidas con calceína.  
 Figura 13B. Células hepáticas teñidas con alfafetoproteína, la misma vista que el panel A.

### Descripción detallada de las modalidades preferidas

35

#### I. Definiciones

En la descripción que sigue, se usa ampliamente una serie de términos para describir la invención. Con el objetivo de proporcionar una comprensión clara y consistente de la descripción y reivindicaciones, que incluyen el alcance que debe darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

40

**Inmunoreactividad de tipo alfafetoproteína:** Cualquier reacciones inmunológicas provocadas por la alfafetoproteína. La alfafetoproteína puede ser de longitud completa o troncada, que incluyen isómeros y variantes de corte y empalme de alfafetoproteína.

45

**Células progenitoras comprometidas:** Células inmaduras que tienen un único destino, tal como células progenitoras comprometidas hepatocíticas (que dan lugar a hepatocitos) o células progenitoras comprometidas biliares (que dan lugar a los conductos biliares). El proceso de compromiso no se entiende en un nivel molecular. Más bien, se reconoce que se han producido solo empíricamente, cuando los destinos de las células se han reducido a partir de la de un predecesor.

50

**Células hepáticas:** Una subpoblación de células hepáticas que incluye hepatocitos y células biliares.

**Células del hígado:** como se usa en la presente descripción, el término "células del hígado" se refiere a todo tipo de células presentes en el hígado normal, independientemente de su origen o destino.

55

**Células madre:** Como se usa en la presente descripción, el término "células madre" se refiere a células inmaduras que pueden dar lugar a células hijas con más de un destino, es decir, son pluripotentes. Las células madre totipotentes, tales como las células madre embrionarias (células ES) o células embrionarias hasta la etapa 8 de células de un embrión de mamífero, tienen capacidad de auto-renovación (auto-mantenimiento) en el que la célula madre produce una célula hija idéntica a sí misma. Por el contrario, las células madre determinada, tales como células madre hematopoyéticas, neuronales, de piel o hepáticas, son pluripotentes y tienen una amplia capacidad de crecimiento pero tienen la capacidad de auto-renovación cuestionable. En el caso de las células madre totipotentes, algunas células hijas son idénticas a las parentales, y algunas se "comprometen" a destino(s) específico(s) limitando

60

su potencial genético a ese que es menos que el de los parentales. En el caso de las células madre determinadas, algunas células hijas conservan la pluripotencia y algunas la pierden, comprometiéndose a un único destino, específico.

5 **Células progenitoras hepáticas:** Estas células dan lugar a hepatocitos y células biliares. Las células progenitoras hepáticas incluyen tres subpoblaciones: "células madre hepáticas", "células progenitoras hepatocíticas comprometidas", y células progenitoras biliares comprometidas, siendo las dos últimas células inmaduras que son descendientes de la célula madre hepática y que tienen un único destino, ya sea hepatocitos o células biliares, pero no ambos.

10 **Células madre hepáticas:** Una subpoblación de células progenitoras hepáticas.

15 **Células progenitoras del hígado:** Una población de células del hígado, que incluyen células progenitoras hepáticas, células progenitoras hematopoyéticas y células progenitoras mesenquimales.

15 **Hemopoyesis:** que rinde glóbulos con destinos celulares de linfocitos (B y T), plaquetas, macrófagos, neutrófilos y granulocitos.

20 **Mesengénesis:** que rinde derivados mesenquimales con destinos celulares de endotelio, adipocitos, células del estroma, cartílago, e incluso hueso (los dos últimos se producen en el hígado sólo bajo condiciones de enfermedad).

25 **Terapia Celular:** Como se usa en la presente descripción, el término "terapia celular" se refiere a la transferencia *in vivo* o *ex vivo* de poblaciones de células definidas usadas como un material autólogo o alogénico y trasplantadas a, o en las proximidades de, células objetivo específico de un paciente. Las células se pueden trasplantar en cualquier medio adecuado, potador o diluyentes, o cualquier tipo de sistemas de suministro de fármacos que incluyen, microportadores, perlas, microsomas, microesferas, vesículas, etcétera.

30 **Terapia génica:** Como se usa en la presente descripción, el término "terapia génica" se refiere a la transferencia *in vivo* o *ex vivo* de material genético definido a células objetivo específicas de un paciente, alterando de ese modo el genotipo y, en la mayoría de las situaciones, alterando el fenotipo de las células objetivo para el último propósito de prevenir o alterar un estado de enfermedad particular. Esto puede incluir modificar la célula objetivo *ex vivo* e introducir las células en el paciente. Como alternativa, un vector se puede dirigir a las células progenitoras hepáticas *in vivo* para suministrar el material genético exógeno y transfectar las células progenitoras. Además, las células progenitoras genéticamente modificadas se pueden usar en un biorreactor como terapia para pacientes o como fuente de productos biológicos. Como esta definición indica, la premisa subyacente es que estos procedimientos genéticos terapéuticos se diseñan para, en última instancia prevenir, tratar o alterar una afección patológica abierta o encubierta. En la mayoría de las situaciones, el objetivo final terapéutico de los procedimientos de terapia génica es alterar el fenotipo de la población de células objetivo específica.

40 **CD:** "Agregado de diferenciación" o "determinante común", como se usa en la presente descripción se refiere a moléculas de superficie celular reconocidas por los anticuerpos monoclonales. La expresión de algunos CD son específicos para células de un linaje o vía madurativa particular, y la expresión de otros varía de acuerdo con el estado de activación, posición o diferenciación de las mismas células.

45 Cuando los términos "uno", "un" o "una" se usan en esta descripción, significan "al menos uno" o "uno o más", a menos que se indique de cualquier otra forma.

## II. alfafetoproteína y albúmina como marcadores de diagnóstico para linajes hepáticos.

50 alfafetoproteína (AFP) y albúmina, ambas proteínas citoplasmáticas, son marcadores especialmente fiables para los linajes hepáticos. La expresión de estas proteínas es la base para la identificación de las subpoblaciones hepáticas de otros tipos de células en el hígado.

55 Las líneas celulares de leucemia humana y linfocitos T normales después de la estimulación *in vitro* pueden además expresar AFP. Los datos, sin embargo, no se abordan si el ARNm de AFP en las líneas celulares de leucemia y linfocitos T activados son una forma idéntica al auténtico ARNm de AFP en las células hepáticas. Se ha de determinar si o no la expresión de ARNm de AFP o albúmina se puede medir mediante los ensayos de proteínas de rutina, tales como inmunofluorescencia, transferencias de Western, etc., debido a que RT-PCR es la técnica más sensible conocida para identificar moldes de ARN particulares.

60 Antes de los estudios descritos en la presente, nadie había investigado en detalle las formas de ARNm de AFP o albúmina en células hematopoyéticas en humanos. Esta invención demuestra la expresión de las formas variantes de AFP y albúmina en las células hematopoyéticas.

La **Figura 1** ilustra el análisis de las células hepáticas y no hepáticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores para varios exones del ARNm de la alfafetoproteína. El análisis PCR revela AFP truncada en células hemopoyéticas. Se realizó RT-PCT usando la combinación de iniciadores de hAFP1, hAFP2, hAFP3 y hAFP4. M = marcadores de peso molecular, carriles 1-3=Hep3B; carriles 10-12=fibroblastos STO; carriles 13-15=sin ARN. Tenga en cuenta que, existe una banda compartida, una isoforma AFP truncada, en los carriles 2, 4 y 8. Existe una isoforma AFP variante única para las células hepáticas observado en los carriles 1 y 4. Las especies AFP completas se observan en los carriles 3 y 6. Los inventores han diseñado nueve iniciadores de PCR para caracterizar las formas variantes de ARNm de hAFP, como se ejemplifica en el Ejemplo 1. La secuencia de codificación de AFP se extiende desde el exón 1 al exón 14. Todas las combinaciones de iniciadores distintos del exón 1 de ARNm de AFP amplifican la parte del ARNm de AFP en una línea celular de eritroleucemia humana, K562, mientras que todas las combinaciones detectaron ARNm de AFP en las líneas de células hepáticas humanas HepG2 y Hep3B. Esto demuestra que las formas variantes de ARNm de AFP contienen desde el exón 2 al exón 14, tal como se expresa en K562, pero no cubren la secuencia codificante completa de AFP. El resultado sugiere que sólo los iniciadores útiles para identificar células hepáticas son aquellos que detectan la parte del exón 1 de AFP, cuya expresión se restringe más demostrablemente en cierto modo específico de tejido. El hecho de que el exón 1 es único para subpoblaciones de células progenitoras hepáticas permite a uno mismo usarlo como sonda para identificar tipos de células progenitoras hepáticas contra hemopoyéticas.

Puesto que una forma truncada de AFP se encuentra en algunas subpoblaciones de células hemopoyéticas, la albúmina además se analiza tanto en las células hepáticas como hemopoyéticas. Los iniciadores para la albúmina se desarrollan de una manera análoga a la de AFP (ver anteriormente) y se usan para evaluar la expresión de albúmina en líneas celulares hepáticas contra hemopoyéticas. Como para AFP, una forma truncada se encuentra en K562, la línea de células hematopoyéticas, y un transcripto que se detecta mediante el iniciador por el exón 12-14

Esta invención describe el diseño y la preparación de iniciadores específicos de RT-PCR para determinar el patrón de expresión de formas variantes ARNm de AFP y albúmina en poblaciones de células hepática contra hemopoyéticas. La invención como se describe en la presente demuestra que las formas variantes tanto de ARNm de AFP como albúmina se puede encontrar en células progenitoras hemopoyéticas. Significa que cuando se usan tales ensayos sensibles, los criterios adicionales, tales como el uso de una sonda de exón 1 para AFP, se deben usar para definir poblaciones de células hepáticas de las hemopoyéticas.

La **Figura 2** ilustra el análisis de las células hepáticas y no hepáticas mediante PCR para varios exones de albúmina. Puesto que una forma truncada de ARNm de AFP se encuentra en algunas subpoblaciones de células hemopoyéticas, la albúmina además se analiza tanto en células hepáticas como hematopoyéticas. Los iniciadores para la albúmina se desarrollan de una manera análoga a la de AFP (ver anteriormente) y se usan para evaluar la expresión de albúmina en líneas celulares hepáticas contra hematopoyéticas. Como para AFP, una forma truncada se encuentra en K562, la línea de células hematopoyéticas, y un transcripto se detecta mediante el iniciador por el exón 12-14.

Los estudios de desarrollo del hígado demuestran que el hígado fetal es tanto un órgano hepatopoiético como hematopoyético durante el desarrollo intrauterino. Durante varias etapas del desarrollo del hígado, el hígado fetal contiene grandes números de células hematopoyéticas, especialmente del linaje eritroide. Además, existe una concidencia creciente de que los sistemas hepatopoiético y hematopoyético están estrechamente relacionados entre sí y existe la posibilidad de que esta interrelación incluye la expresión conjunta de AFP y albúmina, o tal vez isotipos de esta proteína. El hecho que el exón 1 de AFP es único para subpoblaciones de células progenitoras hepáticas permite a uno mismo identificar subpoblaciones específicas de células progenitoras hepáticas de esta invención.

Aunque los análisis de PCR revelan que las células progenitoras hemopoyéticas pueden expresar tanto especies de ARNm de AFP como de albúmina, los niveles de expresión de ARNm son muy pequeños. Claramente, cuando se miden AFP y albúmina mediante análisis de citometría de flujo, no se puede encontrar AFP o albúmina detectable en K562. Aunque tanto AFP como albúmina son guías críticas en la identificación de células hepáticas, AFP es especialmente diagnóstico de las células progenitoras hepáticas después de su purificación mediante citometría de flujo debido a su intensa expresión en las células progenitoras hepáticas. AFP se adopta además para estimar la pureza de células progenitoras hepáticas después de cualquier tipo de estrategia de fraccionamiento.

### III. Procesamiento de Células Progenitoras Hepáticas Humanas

Los inventores han establecido métodos que producen de manera óptima células progenitoras hepáticas humanas disociadas a partir de hígados fetales o de adultos. El aislamiento de células hepáticas maduras por lo general implica disociación enzimática y mecánica del tejido en suspensiones de células individuales seguido por fraccionamiento con centrifugación en gradiente de densidad, elutriación centrífuga, protocolos de digestión enzimática diferenciales (es decir, células estrelladas hepáticas), y/o con la selección usando cultivo celular (revisado en Freshney, *"Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique"* 1983, Alan R Liss, Inc. NY). La

centrifugación en gradiente de densidad se usa rutinariamente por la mayoría de los investigadores para eliminar lo que asumen que sea células muertas y desecho descartando todas las fracciones y conservando solo el sedimento final.

- 5 Considerando que todos los demás investigadores usan el sedimento final después del fraccionamiento en gradiente de densidad, el protocolo descrito en la presente es único en que hace uso de las fracciones superiores de un gradiente de densidad y excluye el sedimento. La nueva variación con la centrifugación en gradiente de densidad, como se describe en la presente, es que el sedimento se desecha y se mantienen las células con una densidad de flotación inferior (es decir, recolección de células en o cerca de la parte superior del gradiente). Los inventores han encontrado que las más jóvenes (es decir, diploides) y las células más robustas tras la crioconservación están presentes en la parte superior de o dentro del gradiente de densidad de Percoll, en lugar de en el sedimento.

#### IV. Citorreducción

- 15 La citorreducción es un proceso para el enriquecimiento de células progenitoras hepáticas. Las células progenitoras pueden ser de cualquiera de varios linajes, que incluyen hepático, hemopoyético y mesenquimatoso. Como el hígado tiene una variedad de células maduras, que pueden ser tetraploides o poliploides, es útil eliminar algunas o todas, las células maduras para preparar una población enriquecida de células progenitoras. Es ventajoso pero no esencial llevar a cabo la etapa de citorreducción a 4 °C.

- 20 Después de la preparación de una suspensión de células única de células hepáticas, las células se separan en múltiples fracciones de acuerdo con el tamaño celular, la densidad de flotación, o una combinación de ambos. De acuerdo con la invención, las células progenitoras hepáticas tienen menos de 15 micras de diámetro. Cualquier método de separación que separa tales células pequeñas de las células más grandes y de los desechos celulares es adecuado, que incluyen velocidad de sedimentación en medio de cultivo (que puede ser medio basal o medio enriquecido), sedimentación en gradiente, cromatografía usando perlas de separación de tamaño de poro grande, entre otros. El material de gradiente puede ser sílice recubierta con polivinilpirrolidona (Percoll), sacarosa reticulada (Ficoll), dextrano o cualquiera conocido por aquellos en la técnica, y preparar para ser isotónico para evitar la lisis celular, en, por ejemplo, solución salina regulada con fosfato o medio basal de Eagle (BME). La suspensión de células disociadas se aplica típicamente a la parte superior de una capa del material del gradiente y se somete a un campo centrífugo, mientras se mantiene a 4 °C. Alternativamente, la suspensión de células se puede aplicar a una unidad de aféresis, tal como se usa para el aislamiento de componentes sanguíneos, es decir plasmaféresis. Las células grandes, que incluyen células parenquimatosas maduras y células tetraploides se sedimentan más rápidamente que las células progenitoras pequeñas y diploides y se eliminan. El diseño del protocolo de centrifugación tiene en cuenta la sensibilidad de las células a bajas tensiones de oxígeno y minimiza el tiempo para el enriquecimiento celular. La suspensión celular puede enriquecerse de células progenitoras hepáticas mediante estos métodos. Además, la etapa de citorreducción puede comprender elutriación centrífuga, pasos de selección basado en proteínas de adhesión de la superficie celular, cromatografía de afinidad o procesamiento por lotes, etiquetado con marcadores fluorescentes, centrifugación zonal, centrifugación de flujo continuo, clasificación magnética después de la incubación con perlas magnéticas, *por ejemplo* perlas magnéticas unidas a anticuerpos, o combinaciones de estos métodos. La centrifugación en gradiente de densidad puede ser un gradiente discontinuo o un gradiente continuo. La fracción de Percoll es adecuada para el uso inmediato, crioconservación, establecimiento en cultivo, o enriquecimiento adicional. El enriquecimiento adicional se puede realizar mediante selección por pasos, selección por afinidad, clasificación por FACS o cualquiera de las técnicas conocidas en la materia y descritos anteriormente. La selección negativa se logra mediante eliminación de las células que expresan los marcadores de CD45, glicoforina A, u otros marcadores tal como se menciona más abajo. La selección positiva se logra mediante la selección de células que expresan CD14, CD34, CD38, ICAM u otros marcadores indicativos de la expresión de alfafetoproteína de longitud completa, albúmina, o ambos.

- 50 En otra modalidad de citorreducción, las células no progenitoras se eliminan selectivamente por lisis selectiva. Las células rojas se lisan mediante una breve exposición de la suspensión de células a una disolución isotónica de cloruro de amonio, seguido por dilución con medio de cultivo y centrifugación para eliminar las células rojas "fantasmas" y hemoglobina libre. De manera similar, las células no progenitoras se lisan selectivamente e hidrolíticamente por congelación usando la mezcla de crioconservación descrita más abajo. Los diversos métodos de citorreducción eliminan las células poliploides, células que expresan los marcadores asociados con células hemopoyéticas maduras, células que expresan marcadores asociados con células hepáticas maduras, células que expresan marcadores asociados con células mesenquimatosas maduras y combinaciones de estas células.

#### V. Crioconservación de células progenitoras hepáticas humanas y su progenie

- 60 Las metodologías de crioconservación de esta invención son únicas y distintas de los métodos usados en la técnica anterior. Las principales distinciones son el uso de diferentes tampones y la crioconservación de una población de células progenitoras hepáticas que es baja en densidad y, así, flotante en la centrifugación en gradiente. Las células progenitoras hepáticas son pequeñas de tamaño y diploides.

La criopreservación exitosa de las células maduras de hígado humano es altamente deseable pero nunca se ha logrado en la técnica. Por lo general, la criopreservación exitosa se define como la capacidad para congelar las células a temperaturas del nitrógeno líquido (-160-180 °C) y después al descongelarlos, observar viabilidades de >75% y con la capacidad de adjuntar en placas de cultivo. Usando métodos más antiguos, los hepatocitos maduros de origen de roedor o humano tienen viabilidades de 30-40% sin capacidad de unirse después de la congelación bajo las condiciones anteriores (por ejemplo, ver Toledo-Pereya, y *otros.*, Patente de los Estados Unidos núm. 4.242.883; Fahy y *otros.*, Patente de los Estados Unidos núm. 5.217.860; Mullon y *otros.*, Patente de los Estados Unidos núm. 5.795.711; y Fahy y *otros.*, Patente de los Estados Unidos núm. 5.472.876). Estas patentes describen una muy escasa viabilidad (<50%) de las células, están principalmente relacionadas con cultivos celulares (sin células individuales en la suspensión de células) y requieren una exposición prolongada de las células con el tampón antes de la congelación.

La **Figura 3** ilustra la excelente viabilidad de células hepáticas criogénicamente almacenadas como consecuencia con el método de la invención. Los datos se expresan como el cambio porcentual de la viabilidad medida en el momento de procesamiento contra el tiempo de descongelación. Estos datos indican que la criopreservación no afectó significativamente la viabilidad de las células. No hubo ningún cambio significativo de la viabilidad durante un periodo que se extiende a 550 días en almacenamiento. La metodología de criopreservación especial de esta invención incluye el uso de un nuevo tampón, una nueva población de células, y, opcionalmente, embebiendo las células en formas de matriz extracelular. Esta metodología por primera vez logra una viabilidad después de la descongelación que no es diferente de la viabilidad medida antes de la congelación, inmediatamente después de la dispersión celular. Las viabilidades reales son variables debido a la condición del tejido tras la llegada y los efectos de la preparación de la suspensión de células usando disociación enzimática y mecánica, y, en los presentes estudios, promedió 77% para las células hepáticas fetal. Las metodologías de criopreservación resultaron en ninguna pérdida significativa de la viabilidad por el proceso de congelación y en células que podrían conectar y expandir *ex vivo* después de la descongelación.

#### VI. Inmunoselección de células progenitoras hepáticas humanas

Se describe en la presente un método para aislar células progenitoras a partir de hígado humano que comprende proporcionar una suspensión de células sustancialmente única de tejido de hígado humano, y el sometimiento de la suspensión a una inmunoselección positiva o negativa. El método de inmunoselección puede comprender seleccionar a partir de la suspensión esas células, que a su vez, su progenie, o formas más maduras de estas expresan al menos un marcador asociado con al menos uno de los linajes celulares. Estos linajes celulares pueden ser hemopoyéticos, mesenquimales, hepáticos, o alguna combinación de estos linajes celulares. La etapa de selección celular puede incluir eliminar las células que expresan glicoforina A, CD45, un marcador específico de células hepáticas adulto, conexina 32, o combinaciones de éstos. Además, el método de selección puede incluir eliminar células poliploides, células que expresan marcadores asociados con células hemopoyéticas maduras, células que expresan marcadores asociados con células hepáticas maduras, células que expresan marcadores asociados con células mesenquimatosas maduras, o combinaciones de estas. La selección de células puede comprender seleccionar células que expresan CD 14, CD34, CD38, ICAM, o combinaciones de estas. Además, el método puede identificar y seleccionar células hemopoyéticas maduras que expresan glicoforina A, CD45, o una combinación de estas. Además, el método de selección puede seleccionar células mesenquimatosas maduras que expresan retinoides, Factor von Willebrand, Factor VIII, o combinaciones de estas.

El método de inmunoselección puede llevarse a cabo en conjunto con citorreducción basándose en el tamaño celular, la densidad de flotación, o una combinación de estos. El método de selección puede seleccionar células que expresan al menos un marcador asociado con al menos un linaje celular, que puede ser hemopoyético, hepático o mesenquimatoso. La selección de células, su progenie, o formas más maduras de estas pueden expresar al menos un marcador asociado con al menos un linaje de células hepáticas. Ese linaje puede ser células parenquimatosas o hepatocitos, o células biliares. Los marcadores expresados por las células pueden ser CD14, CD34, CD38, CD117, ICAM, o combinaciones de estos.

#### VI. Marcadores Celulares y Citometría de Flujo

Usando nuestra actual definición de células progenitoras hepáticas como poblaciones de células inmaduras que expresan alfafetoproteína con o sin expresión de albúmina, se han evaluado marcadores que seleccionarán específicamente estas células usando tecnologías de inmunoselección. Un sorprendente descubrimiento ha sido que muchos de los marcadores (*es decir* CD34) que son los mismos clásicos de células progenitoras hematopoyéticas, además identifican las subpoblaciones de células progenitoras hepáticas. Así, las clases de un solo color para CD34 resultaron en un enriquecimiento significativo (al menos 9 veces) para las células que expresan AFP. Sin embargo, no todas estas células AFP positivas se pueden verificar que sean las células progenitoras hepáticas. Basado en el porcentaje que son positivas para albúmina, se estima que el 80-90% de las células son células progenitoras

hepáticas, y las demás son o bien células progenitoras hepáticas demasiado inmaduras para expresar todavía albúmina o posiblemente subpoblaciones hematopoyéticas que expresan alfafetoproteína.

5 Se describe en la presente una estrategia de clasificación de citometría de flujo única. Usando la combinación de  
 10 expresión de AFP y albúmina como dos características únicas definitorias de células progenitoras hepáticas, hemos  
 15 identificado marcadores antigénicos y otros parámetros de citometría de flujo que definen las células progenitoras  
 20 hepáticas. Las estrategias de clasificación hasta la fecha implican clases para células pequeñas ( $< 15 \mu$  por medidas  
 de dispersión hacia adelante), que son diploides (usando fluorescencia del colorante Hoechst 33342), son  
 agranulares mediante dispersión lateral, son negativas para ciertos antígenos hematopoyéticos (es decir, glicoforina  
 A, el antígeno de glóbulos rojos y CD45) seguido por marcadores positivos compartidos entre subpoblaciones de  
 células hepáticas y subpoblaciones de células hemopoyéticas (es decir, CD14 y/o CD38). En los experimentos  
 descritos en la presente, los inventores identifican las células progenitoras hepáticas mediante clasificación de las  
 células que fuertemente expresan alfafetoproteína, débilmente expresan albúmina y expresan CD14, CD34, CD38,  
 CD117, o una combinación de estas. Además, se describe en la presente la evidencia de que las células  
 hemopoyéticas además expresan AFP, aunque una forma truncada. Los inventores describen una nueva población  
 celular y el proceso de aislamiento, la identificación, cultivo, y un método para usar tal población celular. El éxito en  
 el aislamiento, identificación, y el cultivo de la población celular particular de la invención se logra en parte a través  
 de métodos avanzados de aislamiento, citorreducción por afinidad, clasificación de células activadas por  
 fluorescencia a alta velocidad, mayor velocidad y precisión, y técnicas de crioconservación y cultivo modificadas.

25 Los solicitantes demuestran estrategias y métodos de clasificación por citometría de flujo para purificar células  
 progenitoras hepáticas a partir de suspensiones de células recién aisladas y/o a partir de células hepáticas  
 crioconservadas descongeladas. Estos métodos implican 1) teñir las células con varios anticuerpos marcados con  
 fluorosonda para marcadores de superficie celular específicos y 2) usar una combinación de estrategias de  
 clasificación negativas y positivas en las tecnologías de citometría de flujo multiparamétricos. Los métodos para la  
 purificación de las etapas de linaje específicas a partir de poblaciones de células hepáticas humanas se pueden usar  
 con hígados de donante de cualquier edad, ya que los marcadores parecen ser específico a la posición del linaje.

30 Los métodos mejorados para marcar las células, y un citómetro de flujo mejorado de manera espectacular (citómetro  
 de flujo "un MoFlo" de Cytomation que clasifica las células a 40.000 células/segundo y realiza 8 clases de color)  
 sobre el que se usó en el pasado (de Becton Dickenson FACSTAR PLUS que clasifica las células en 2000-6000  
 células/segundo y realiza 2-4 clases de color); ayuda en el éxito en el aislamiento y la identificación de esta nueva  
 población celular.

35 La **Figura 4** ilustra una clase de FACS univariante. La suspensión de células se prepara para el análisis de  
 inmunofluorescencia de alfafetoproteína (AFP) usando anticuerpos conjugados con el colorante rojo, Cy5, y para  
 albúmina usando anticuerpos conjugados con el colorante azul (AMCA). Treinta mil células se tamizan por  
 fluorescencia roja (AFP) y azul (albúmina). Los resultados muestran un grupo claro de células positivas para cada  
 40 proteína. El análisis adicional muestra que aproximadamente 80% de las poblaciones positivas de cada proteína se  
 representan por las mismas células (es decir, la co-expresión de las dos proteínas). La expresión de AFP e  
 inmunorreactividad de tipo albúmina se define bien en las suspensiones celulares, con un grupo claro de células que  
 muestran una clara diferenciación a partir de la señal de fondo. La alfafetoproteína se expresa en  $6,9 \pm 0,86\%$  de  
 células en suspensiones de células sin fraccionar y la albúmina se presenta en  $7,7 \pm 1,1\%$ . Entre las células AFP  
 45 positivas  $75,6 \pm 4,9\%$  co-expresan albúmina mientras que el  $80 \pm 5,5\%$  de células albúmina positivas además  
 expresan AFP. Así, aproximadamente el 25% de las células que expresan alfafetoproteína no expresan albúmina y  
 el 20% de las células que expresan albúmina no expresan alfafetoproteína.

50 Las proporciones de las células que portan los marcadores de superficie principio usados en este trabajo se  
 muestran para suspensiones de células completas (es decir, que incluyen glóbulos rojos) en la **Tabla 2** (GA =  
 glicoforina A, un marcador de superficie en los glóbulos rojos)

**Tabla 2: Porcentaje de Células CD Positivas en Suspensión de células hepáticas original y el porcentaje de estos que son positivas para AFP**

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
<b>Sin fraccionar</b>					
% en la población	3,7 ± 0,8 (8)	2,8 ± 0,5	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,5	36,8±5
% AFP positivo	81,7± 2,2	72,6 ± 4,6	57,6 ± 4,6	22,2 ± 4,4	2,3 ± 0,6

La **Figura 5** ilustra el porcentaje de células que expresan marcadores de superficie CD14, CD34, CD38, CD45 y glicoforina A (GA) en suspensiones de células hepáticas sin fraccionar. Tenga en cuenta que los datos de GA se representan en el eje derecho para preservar la escala. La Figura 6 ilustra el porcentaje de células en la suspensión de células original que expresan alfafetoproteína y otros marcadores antigénicos. Media  $\pm$  SEM de porcentaje de células positivas para alfafetoproteína (AFP) y marcadores de superficie celular específicos (CD14, 34, 38, 45 y glicoforina A). Claramente, las células glicoforina A (GA) positivas (es decir, células eritroides) representan un componente principal de la masa celular pero una fracción insignificante de las células AFP positivas.

La **Figura 7** (parte superior) ilustra la co-expresión de alfafetoproteína y albúmina. La expresión de alfafetoproteína (panel izquierdo) y albúmina (panel derecho) en suspensiones de células hepáticas fetal con o sin reducción selectiva de las células rojas usando fraccionamiento con Percoll. El porcentaje de células AFP positivas que co-expresan albúmina además se aumenta a  $80,5 \pm 8,2\%$  y la proporción de células albúmina positivas que co-expresan AFP se aumenta a  $89 \pm 3,1\%$ , aunque ningún cambio es estadísticamente significativo.

La **Figura 7** (parte de abajo) ilustra el efecto de la citorreducción mediante el fraccionamiento con Percoll en la co-expresión de alfafetoproteína y albúmina. La proporción de células que expresan tanto alfafetoproteína como albúmina, se expresó como un porcentaje de células AFP o albúmina positivas. Los datos para las células con y sin reducción de células rojas se muestran usando fraccionamiento con Percoll. Así, cuando las suspensiones de células se reducen de células rojas mediante fraccionamiento con Percoll la proporción de células que expresan AFP se aumenta significativamente a  $12,9 \pm 1,9\%$  y los que expresan albúmina a  $12,1 \pm 2,3\%$ .

El resultado de este procedimiento sobre la proporción de células que portan los marcadores de superficie se muestran en la Tabla 3, junto con la proporción de cada subgrupo que muestra tinción positiva para AFP.

**Tabla 3: Porcentaje de Poblaciones CD positivas en la Suspensión de células hepáticas después de la Reducción de Células Rojas y porcentaje de éstas que son positivas para AFP**

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
<b>Células rojas reducidas</b>					
% en la población	7,4 $\pm$ 1,3	3,4 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,9	8,2 $\pm$ 0,3	27,5 $\pm$ 4,7
% AFP positivo	89,8 $\pm$ 1,3	77,1 $\pm$ 2,9	53,5 $\pm$ 1,3	32,5 $\pm$ 1,3	1,8 $\pm$ 0,9

La **Figura 8** ilustra un análisis de FACS de la suspensión de células hepáticas fetal para la co-expresión de CD14, CD38 y AFP. El diagrama de dispersión bivalente muestra la distribución de la tinción tricolor para CD14 (ordenadas) contra la tinción con FITC para CD38 (abscisas). Los puertos se crean para seleccionar agrupamientos celulares específicos de acuerdo con las señales de CD14 y CD38. Estos se usan después para mostrar la intensidad de la tinción de AFP en cada uno de estos subgrupos. Los resultados de AFP muestran que un alto nivel de enriquecimiento para AFP se produce mediante la selección de células positivas, ya sea para CD38 o CD14. La señal de AFP generada a partir de toda la suspensión celular (30.000 células) se muestra en la parte inferior izquierda. En la mayoría de los casos, la presencia de AFP en los subgrupos seleccionados mediante el marcador de superficie celular se distribuye de forma continua con una clara preponderancia de células que muestran intensidades de tinción en el intervalo positivo. Sin embargo, la distribución de células CD38 positivas con respecto a la co-expresión de AFP fue única. En las células CD38 positivas es evidente una distribución bimodal para co-expresión AFP en la que dos grupos distintos de células son evidentes, un grupo positivo para AFP, el otro negativo.

Los resultados muestran que la alfafetoproteína (AFP) está presente en 7% de las células en suspensiones de células individuales de tejido del hígado fetal (es decir, en la suspensión de células original). El anticuerpo para glicoforina A (un antígeno en los glóbulos rojos, eritrocitos) se encuentra para identificar una subpoblación de células que no expresan AFP. Así, las células que expresan este antígeno (es decir, células eritroides) se excluyen de las células destinadas para la caracterización de células progenitoras hepáticas. El antígeno CD38 identifica una población de células que muestra una mejora significativa en la proporción de células AFP positivas (es decir, mayor de 7 veces la proporción en las muestras sin fraccionar. Ambos antígenos muestran un número de isoformas, dependiendo de si existen o no presente secciones de la molécula, codificadas por variantes de corte y empalme. Los anticuerpos son disponibles que identifican las diversas isoformas.

El marcador clásico para las células progenitoras hematopoyéticas, CD34, se encuentra que está presente en muchas células que además expresan AFP. La clasificación de células positivas para CD34 resulta en el enriquecimiento de las células AFP positivas al menos 9 veces más del que se encuentra en la suspensión de células original (67%, en las células CD34 positivas contra 7% en la suspensión de células original). Sin embargo, el anticuerpo individual más eficaz para el enriquecimiento de las células AFP positivas es CD14, que produce un



aumento mayor que 11 veces en la proporción de estas células en comparación con la población original (81% contra 7%).

5 Parecería que el rendimiento de las células AFP positivas se podría mejorar usando una combinación de marcadores de superficie. Así, el alcance de la co-expresión de AFP con combinaciones seleccionadas de marcadores de superficie se determina para establecer el grado en que se puede aumentar la selección del marcador intracelular. Los datos se expresan como la proporción de células AFP positivas que expresan marcadores de superficie (denominado el "rendimiento" de las células AFP positivas) y como la proporción de todas las células AFP positivas que aparecen en la población definida por el marcador de superficie (denominado el factor de "enriquecimiento" de células AFP positivas). Los resultados de las combinaciones de CD 14, CD34 y CD38 se muestran en la **Tabla 4** junto con los resultados de marcadores individuales para la comparación.

**Tabla 4.**

	CD14	CD34	CD38	CD14+CD38	CD14+CD34
15 Enriquecimiento	80,6±2,6	66,7±4,7	53,8±4,5	66,9±3,5	68,2±3,9
Rendimiento	39,8±2,6	26,9±4,4	22,0±2,7	50,6±2,7	52,0±5,5

20 Enriquecimiento. Porcentaje de células que expresan cualquiera (o ambos) de los marcadores de superficie que son además positivas para AFP.

Rendimiento. Porcentaje de todas las células AFP positivas que además expresan uno o ambos de la combinación de marcadores de superficie.

25 La **Figura 9** ilustra cómo la selección de CD14 y CD38 enriquece las células AFP positivas. La proporción de células AFP positivas en suspensiones celulares preparadas a partir de hígado fetal se mejora de manera espectacular seleccionando células con marcaje de superficie positivo para los marcadores CD38 y CD14.

30 La combinación de los dos marcadores produce un enriquecimiento significativamente mejor de células que contiene AFP que el obtenido con cualquiera de los dos marcadores solo.

35 La **Figura 10** ilustra la microscopía de fluorescencia de las células progenitoras hepáticas humanas. Las células progenitoras hepáticas representativas a partir de hígado fetal se tiñen para el contenido de AFP. Los tamaños celulares indican que ambas células progenitoras tempranas y células progenitoras hepáticas más avanzadas están presentes. La morfología de células con tinción positiva para AFP es variable y abarca todo el intervalo de tamaño y forma celular en la suspensión de células a partir de hígados fetales pero no de hígado de adulto. La mayor de las células AFP positivas, de aproximadamente 12-15  $\mu$ , es mucho más pequeña que los hepatocitos maduros, con intervalo en tamaño de 20-50  $\mu$ .

40 La **Figura 11** ilustra células representativas seleccionadas por la expresión de AFP. Las células con tinción positiva para CD14 (lado derecho) son características de los hepatoblastos. Las células con tinción negativa para los marcadores de superficie son más pequeñas y consistente en tamaño y morfología con las células progenitoras hepáticas tempranas. En todos los casos una cierta proporción de células AFP positivas no muestran expresión de cualesquiera de los anticuerpos de superficie usados en este estudio. La aparición de estas células "nulas" AFP positivas se ilustra en la Figura 11 donde se pueden comparar con la aparición de células CD14 positivas/AFP positivas clasificadas a partir de la misma suspensión. Está claro que, mientras ambos tipos de células son positivas para AFP, las células con tinción negativa para los antígenos de superficie son consistentemente más pequeñas y menos complejas que las células CD14 positivas.

50 Así, los marcadores probables para clasificar células progenitoras hepáticas son: glicoforina A<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, ICAM<sup>+</sup>, y uno o más CD14<sup>+</sup>, CD34, CD38<sup>+</sup>, CD117, diploides, agranulares (mediante dispersión lateral), menos de 15  $\mu$  (por dispersión hacia adelante). El fenotipo de estas células clasificadas es células pequeñas (< 15  $\mu$ ), con poco citoplasma (alta relación núcleo/citoplasma), albúmina<sup>+</sup> y/o AFP.

#### 55 VII. Caracterización confocal de células que expresan alfafetoproteína en hígado humano fetal y adulto.

60 La microscopía confocal se ha usado para obtener las imágenes a partir de las células fetales y adultas humanas que expresan alfafetoproteína. Esta metodología permite a uno observar la morfología y el tamaño de estas células y mostrar directamente la ubicación de proteínas intracelulares, tales como AFP y ALB, y la de marcadores de superficie de la membrana tales como CD34 y CD38.

La **Figura 12** ilustra la microscopía confocal de células que expresan alfafetoproteína, es decir, células progenitoras hepáticas en hígados humanos adultos. La figura muestra tres vistas de un campo, y que existen dos células AFP

positivas en este campo. La superposición del panel (A) y el panel (B) se muestra en el panel (C) e indica la morfología de las células AFP positivas (de color rosa, en el original) en un grupo de células hepáticas.

La **Figura 13** ilustra las células que se marcan con calceína (A) para mostrar todos los tipos de células. Fig. 13(B) consiste de las mismas células que co-expresan AFP y que muestran que solo dos células son AFP positivas. El tamaño de la célula no es un factor para la positividad AFP.

Las células que expresan AFP se encuentran tanto en hígados fetales como adultos. Los hígados fetales, como se esperaba, tienen el mayor porcentaje (6-7%), mientras que los hígados de adulto tienen un pequeño porcentaje (<1%) y con los números que disminuyen con la edad del donante. Las pocas células progenitoras hepáticas que se encuentran en los hígados de adulto se pueden enriquecer significativamente a través del proceso de fraccionamiento con Percoll para producir hasta el 2% de las células en las fracciones de Percoll 1 y 2 a partir de los hígados adultos (Tabla 5). Las células que expresan AFP se encuentran en un hígado a partir de donantes mayores de 71 años de edad.

La **Tabla 5** muestra el tamaño de la célula y la viabilidad de las fracciones aisladas de Percoll de células hepáticas adultas. Las células más pequeñas (fracciones 1-3) tienen mayor viabilidad que las células más grandes (fracción 4) después de haber sido crioconservadas bajo la misma condición de crioconservación.

Fracción de Percoll	Viabilidad (%)	Tamaño de las células (µm)	% células AFP+
Fracción 1	82	< 10	0,5-1 %
Fracción 2	84	10-15	2 %
Fracción 3	85	15-25	<0,2 %
Fracción 4	56	25-50	<0,01%

Estos resultados sugieren que los órganos de donantes útiles para las terapias celulares hepáticas, así como para el trasplante de órgano consistirán de esos de donantes jóvenes (hasta aproximadamente 45 años de edad). Además, los hígados de pacientes geriátricos (>65 años de edad) serán donantes inapropiados para las terapias celulares y, quizás, además para trasplantes de órganos enteros, especialmente para los niños, ya que tendrán poca o ninguna capacidad regenerativa de las células progenitoras hepáticas y solo la capacidad regenerativa intermedia o mínima conocida que está disponible a partir de las células maduras.

### VIII. Linaje madurativo

Por lo tanto, el hígado adulto contiene una población de células progenitoras hepáticas capaz del crecimiento y diferenciación en hepatocitos y células biliares tanto en condiciones normales y de enfermedad. Esta invención representa la proposición de que cada posición en el linaje del hígado es una etapa madurativa distinta, y que existen múltiples poblaciones de células madre en el hígado.

Sorprendentemente, el hígado embrionario, en donde los embriones humanos se excluyen de la invención, produce células progenitoras de 3 linajes madurativos separados: hepatopoyesis, con destinos celulares de hepatocitos y células biliares (conducto biliar); hemopoyesis, con destinos celulares de linfocitos (B y T), plaquetas, macrófagos, neutrófilos y granulocitos; y mesengénesis, con destinos celulares de endotelio, adipocitos, células del estroma, cartílago y aun hueso (los dos últimos se producen en el hígado solo bajo condiciones de la enfermedad).

Generalmente, las células madre son células inmaduras que pueden dar lugar a células hijas con más de un destino. Las células madre producen células hijas, algunas de las cuales son idénticas a los padres y algunas de las cuales "se comprometen" a un destino específico. El proceso de compromiso no se entiende a nivel molecular. Más bien, se reconoce que se han producido solo empíricamente, cuando los destinos de las células se han reducido a la de un predecesor. "Células progenitoras comprometidas" se definen como células inmaduras que tienen un solo destino tal como células progenitoras comprometidas hepatocíticas (dando lugar a hepatocitos) o células progenitoras comprometidas biliares (que dan lugar a los conductos biliares).

Las transiciones de la célula madre a las células adultas se producen en un proceso por etapas que rinde un linaje madurativo en el que el tamaño celular, morfología, potencial de crecimiento y expresión génica está ligada al linaje. La metáfora del envejecimiento es útil al definir el proceso. Las células "jóvenes" tienen la expresión génica temprana y el máximo potencial de crecimiento; las células tardías en el linaje tienen expresión de genes "tardía" y por lo general se limitan en su crecimiento o no crecen en absoluto. Las células tardías se pueden considerar "viejas" o en términos biológicos, apoptóticas, y se desprenden en última instancia. El proceso de linaje madurativo

resulta en una rotación natural para el tejido y permite la regeneración después de las lesiones. Los tejidos difieren en la cinética del proceso madurativo. El linaje madurativo del intestino es bastante rápido con un ciclo completo que ocurre en menos de una semana; el que ocurre de hígado es lento, y en el hígado de la rata es de aproximadamente un año.

5 Las formas de hígado de rata en la vida embrionaria en aproximadamente el día 10, se refiere como "día embrionario 10" o E10, con la invaginación del mesénquima cardíaco por el endodermo ubicado en la región del intestino medio del embrión (Zaret, K. 1998. Current Opinion in Genetics & Development. 8:526-31.). El reconocimiento temprano de las células hepáticas en los embriones se ha logrado usando estudios de hibridación *in situ* de ARNm que codifica la alfafetoproteína (AFP) ((Zaret, K. 1998. Current Opinion in Genetics & Development. 8:526-31; Zaret, K. 1999 Developmental Biology (Orlando). 209:1-10). Las células que expresan AFP se observan en la región del intestino medio del embrión cerca del mesénquima que produce el corazón en el día 9-10 en todos los hígados de rata y ratón ensayados. El hígado se vuelve visible macroscópicamente por E12 y es aproximadamente 1 mm de diámetro por E13.

15 En paralelo, la hematopoyesis se produce con las primeras células hemopoyéticas identificables que aparece por E15-E16 (en roedores) y por el 3<sup>ro</sup> a 4<sup>to</sup> mes (en humanos) y con el pico de la eritropoyesis (formación de células eritroides o glóbulos rojos) que se produce por E18 (en roedores) y por el 5<sup>to</sup>-6<sup>to</sup> mes (en humanos). En el pico de la eritropoyesis, predomina el número de los glóbulos rojos en el hígado y representan más del 70% del número de células en el hígado. El final del periodo gestacional es en el día 21 en roedores y 9 meses en los humanos. A las pocas horas del nacimiento, el número de células hematopoyéticas disminuye notablemente tal que con 2 días de vida postnatal (roedores) y dentro de una semana o dos (humano), la gran mayoría de las células hematopoyéticas desaparecieron después de haber migrado a la médula ósea. Se desconoce la causa de la migración de las células hematopoyéticas. Sin embargo, existen dos especulaciones dominantes.

25 En primer lugar, las células progenitoras hemopoyéticas prefieren condiciones relativamente anaerobias y huyen hacia la médula ósea (que es relativamente anaerobia) con los elevados niveles de oxígeno en el hígado y con la activación de los pulmones; y en segundo lugar, la pérdida de las hormonas del embarazo son la causa de la migración. Después del nacimiento, la pérdida de las células progenitoras hemopoyéticas en el hígado se asocia con una reducción dramática en el número de células progenitoras hepáticas y un aumento paralelo en el número y madurez de los hepatocitos y células biliares. La madurez total del hígado se completa en 2-3 semanas de vida posnatal (en roedores) y dentro de unos meses (seres humanos). Después, las células progenitoras hepáticas restantes se localizan en las regiones de las tríadas portales en la periferia de cada acino hepático.

35 Después de eso, la arquitectura clásica del acino hepático se establece con cada acino que se define periféricamente por seis conjuntos de tríadas portales, cada una con un conducto biliar, una arteria hepática y una vena hepática, y en el centro una vena central que conecta con la vena cava. Las láminas de células hepáticas, como los radios de una rueda, se extienden desde la periferia hacia el centro. Por convención, las láminas están divididas en tres zonas: la zona 1 está cerca de las tríadas portales; la zona 2 es midacinar; y la zona 3 está cerca de las venas centrales. Las únicas células diploides del hígado están en la zona 1; las células tetraploides están en la zona 2; y las células tetraploides, octaploides y multinucleadas están en la zona 3. El patrón es muy sugerente de un linaje madurativo que termina en un proceso apoptótico ((Sigal, S. H., S. y otros 1995. Differentiation. 59:35-42.).

#### 45 **IX. Implicaciones del concepto de linaje en estudios preclínicos y clínicos de la biología del hígado.**

Las características *in vitro* e *in vivo* del crecimiento y diferenciación de la población celular de esta invención está de acuerdo con el concepto y las implicaciones de un modelo de linaje-posición de linaje en el hígado. Por ejemplo, en un cultivo *in vitro* del parénquima, la capacidad de las células parenquimatosas para dividirse y el número de divisiones celulares se prevé que sea estrictamente dependiente de la posición de linaje. Por lo tanto, las células del parénquima periportal deben tener mayor potencial de división que las pericentrales. Esto explica el antiguo misterio de por qué los cultivos primarios de hígado, el órgano regenerativo de más renombre en el cuerpo, muestra dicha división celular limitada en cultivo.

55 Las células madre y sus homólogos transformados, los hepatomas, se predicen para expresar genes tempranos tales como alfafetoproteína y factor de crecimiento de tipo insulina tipo II, pero sin genes tardíos expresados en el linaje. En el modelo de madurez de linaje ningún hepatoma debe expresar los genes tardíos, porque la progresión total a través del linaje requiere una regulación de la diferenciación, el crecimiento y el ciclo celular sin alteraciones. Este efecto se ha observado en la población celular de la invención. Los estudios de biología molecular que comparan la expresión génica específica del hígado en tejidos embrionarios frente a adultos definen diversas clases de genes: los diagnósticos de los compartimentos (célula madre, amplificación, diferenciación); los expresados por zonas y que potencialmente cruzan los límites compartimentales; y los expresados temprano, medio o tardío en el linaje pero discretamente en unas pocas células.

Varios patrones morfológicos y de expresión génica de tumores primarios de hígado se pueden entender mediante

el estudio de la población de células de la invención. Si los tumores representan la proliferación de las células madre transformadas con diferentes capacidades de diferenciación, la expresión común de alfafetoproteína en hepatomas no es un marcador de tumor inducido sino un indicador de una población de células inmaduras expandida que normalmente expresa alfafetoproteína.

5 La población de células aisladas de esta invención tiene un gran impacto en el éxito de la terapia génica y/o celular dirigida al hígado. Esta invención, como se describe en los Ejemplos, ha identificado afecciones claves en las que las células progenitoras hepáticas de primates no humanos y humanos se pueden crioconservar con éxito.

10 Debido a la capacidad de expandirse significativamente *in vitro*, la población de células de la presente invención, similar a las células en el linaje hemopoyético, se puede usar como un "material de biopsia por perforación" para proporcionar la semilla de células para la expansión *ex vivo*. Esto eliminaría la necesidad de una resección quirúrgica invasiva mayor del hígado del paciente.

15 Una vez que las células progenitoras hepáticas humanas se establecen en cultivo, se realiza la transferencia génica. Esto se puede lograr con un número de diferentes sistemas de vectores de suministro de genes. Una consideración importante en este punto es que el éxito de la transferencia génica requiere un rápido crecimiento del cultivo, y puesto que las células progenitoras hepáticas humanas de la invención se dividen significativamente en condiciones fisiológicas normales, estas células son los candidatos ideales para la transferencia génica en el hígado. Además, las características de crecimiento de la población de células de esta invención permite el uso en una transferencia génica *ex vivo* con ciertos vectores de suministro de genes (es decir, vectores retrovirales) que requerirán proliferación celular para la inserción y expresión génica eficaz.

20 Un enfoque alternativo para la terapia génica es diseñar vectores que se orientan específicamente hacia los progenitores y después de inyectar el vector, se unen con el gen de interés, directamente en el paciente. Los vectores pueden dirigir y modificar la población de células progenitoras endógenas.

25 La población de células progenitoras de la presente invención se puede usar en una terapia autóloga o alogénica génica o celular dirigida al hígado. Claramente, el uso de células progenitoras hepáticas autólogas eliminará una preocupación significativa en relación con el rechazo de las células trasplantadas. La población de células de la presente invención es particularmente atractiva para la transferencia de células alogénicas, porque su perfil antigénico sugiere fenómenos de rechazo inmunológico mínimo. Además, otros elementos celulares, tales como glóbulos, células endoteliales, células de Kupffer, que se conocen que son altamente inmunogénicas se eliminan sustancialmente a través del proceso de purificación.

30 Una vez que las células progenitoras hepáticas autólogas o alogénicas se aíslan, purifican y cultivan, se pueden modificar genéticamente o permanecer intactos, expandir *in vitro*, y después, trasplantar de nuevo en el hospedero. Si se desea la modificación genética, después de la modificación genética y antes del trasplante, las células genéticamente modificadas se pueden expandir y/o seleccionar basándose en la incorporación y expresión de un marcador dominante seleccionable. El trasplante se puede realizar de nuevo en el compartimento hepático o un sitio ectópico o heterotópico. Para el trasplante en el compartimento hepático, se puede usar la infusión de la vena portal o inyección intraesplénica. La inyección intraesplénica puede ser la vía de administración de elección porque las células progenitoras hepáticas trasplantadas a través de una inyección intraesplénica se mueven dentro del compartimento hepático.

35 Los procedimientos médicos adicionales pueden ayudar en la eficacia del injerto hepático de las células progenitoras hepáticas trasplantadas. Los modelos animales han demostrado que en la hepatectomía parcial, la administración de factores de angiogénesis, y otros factores de crecimiento ayudan en el injerto y viabilidad de los hepatocitos trasplantados. Un enfoque alternativo es trasplantar los hepatocitos genéticamente modificados a un sitio ectópico.

40 Actualmente, los enfoques de la terapia celular con respecto al hígado han mostrado poca eficacia. Esto puede ser debido al hecho de que las células del donador que se usan son las células hepáticas predominantemente adultas y de corta duración después del aislamiento y la reinyección. Además, el uso de células adultas resulta en fuerte rechazo inmunológico. Las células progenitoras hepáticas de la presente invención ofrecen una mayor eficacia debido a su capacidad limitada para inducir fenómenos de rechazo inmunológico y debido a su extenso potencial regenerativo.

45 Con respecto a la terapia génica, los continuos esfuerzos hacen uso de "vectores inyectables dirigidos," la vía más popular para las terapias clínicas en fase de desarrollo. Estos enfoques han tenido una eficacia limitada debido tanto a problemas inmunológicos como de expresión transitoria de los vectores. Las únicas vías para la terapia génica que demostraron dignidad han sido la terapia génica *ex vivo* y se han realizado casi exclusivamente en las células progenitoras hematopoyéticas. Se predice que la terapia génica *ex vivo* con células progenitoras (o el uso de vectores inyectables de alguna manera dirigidos a las poblaciones de células progenitoras) demostrará ser más eficaz, ya que los vectores se pueden introducir *ex vivo* en subpoblaciones purificadas de las células progenitoras; seleccionar y reintroducir *in vivo* las células modificadas. Las ventajas de las células progenitoras son su enorme

potencial de expansión, su inducción, si acaso, mínima de reacciones inmunológicas, y su capacidad para diferenciarse para producir el linaje completo células de maduras.

#### X. Linajes comunes o interdependientes

5 Las metodologías mejoradas permitieron a los inventores estudiar y caracterizar más de cerca las células progenitoras hepáticas. Estos estudios especialmente, revelaron una estrecha relación entre las células progenitoras hepáticas y células progenitoras hematopoyéticas que sugieren una estrecha relación entre estos dos linajes. Claramente, estos estudios muestran que las células progenitoras de los linajes hepáticos y hemopoyéticos  
10 comparten numerosos marcadores antigénicos (CD14, CD34, CD38, CD117 o ckit, antígenos de células ovals), comparten propiedades bioquímicas (es decir, transferrinas, glutatión-S-transferasas, y una isoforma truncada de la alfafetoproteína), y tienen una amplia superposición de los requisitos de cultivo (formas de matriz extracelular y requisitos hormonales específicos) para la expansión *ex vivo*. Las células progenitoras de ambos linajes se localizan en los mismos sitios dentro del acino hepático. Finalmente, la señalización paracrina está presente a lo largo de las  
15 células de los dos linajes madurativos; es decir las señales que se producen en cada uno de los linajes regulan las células en el otro linaje. Claramente, se puede concluir que puede haber un linaje común o, al menos, linajes muy interdependientes entre las células hepáticas y hematopoyéticas.

20 Las poblaciones celulares descritas en la presente se purifican y utilizan para producir ya sea células mielo-hematopoyéticas o derivados hepáticos en dependencia de las condiciones en las que las células se aíslan y cultivan. Por lo tanto, los sistemas de biorreactor inoculados con poblaciones de células clasificadas para un conjunto de antígenos que define tanto las células progenitoras hepáticas como hematopoyéticas (por ejemplo, CD38<sup>+</sup>, ckit<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>) pueden producir las poblaciones de células con múltiples destinos. El destino depende de cómo se reintroducen *in vivo* las células o bajo qué condiciones de cultivo se colocan las células.

25 Otro aspecto importante de la población celular de la presente invención es que presentan un antígeno específico de superficie de células madre hematopoyéticas CD34. Las células CD34 positivas de la médula ósea se han usado como un marcador de selección positiva conveniente para las células madre hemopoyéticas. Sin embargo, existe aumento del número de informes que ponen en duda la especificidad del marcador antigénico CD34 de las células madre hematopoyéticas (Nakauchi H. Nature Medicine 4:1009-1010 (1998)). La evidencia experimental demuestra la existencia de células en la población CD34 negativa de médula ósea humana y sangre de cordón que pueden repoblar la médula ósea de ratones inmunodeficientes.

35 Esta invención, como se describe en la presente, describe las maneras de purificar tanto las poblaciones de células progenitoras hematopoyéticas como hepáticas que se usan posteriormente en los programas clínicos y preclínicos, utilizando la estrecha relación entre las células hepáticas y hemopoyéticas.

40 Los usos de las células progenitoras hepáticas humanas son muchos y diversos. Estos incluyen: 1) la investigación sobre células humanas; 2) la producción de vacunas o antivirales; 3) los estudios toxicológicos; 4) el desarrollo de fármacos; 5) la fabricación de proteínas (usando las células como hospederos para la producción de diversos factores específicos de los humanos); 6) las terapias celulares hepáticas; 7) terapias génicas hepáticas; 8) los hígados bioartificiales que pueden usarse en la investigación, estudios toxicológicos y antimicrobianos, fabricación proteína, o clínicamente como un sistema de asistencia al hígado. Teniendo en cuenta la posibilidad de un linaje común entre la hemopoyesis y hepatopoyesis, como se adelantó por los inventores de esta invención, las mismas células se pueden usar tanto para destinos hepáticos como hemopoyéticos dependiendo del microambiente en el  
45 que se colocan.

50 La disponibilidad de células progenitoras hepáticas humanas altamente purificadas permitirá investigar mucho más amplio sobre las células humanas, facilitará el desarrollo de formas exitosas de la terapia génica y celular del hígado, y debe permitir el desarrollo de hígados bioartificiales humanos para su uso tanto en la investigación como en los dispositivos de asistencia clínica. En la actualidad, el suministro limitado de tejidos humanos sanos excluye los programas clínicos en la terapia con células hepáticas o en hígados bioartificiales humanos.

55 Las poblaciones de células progenitoras deben tener suficiente potencial de expansión para superar, o al menos en gran medida aliviar, que el suministro sea limitado.

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

#### 60 EJEMPLO 1

Análisis de formas variantes de AFP y albúmina expresadas en células hepáticas frente a otros tipos de células.

*Líneas celulares:* Dos hepatomas humanos, Hep3B y HepG2, se mantienen en MEM de Eagle complementado con

## ES 2 569 778 T3

1 mM de piruvato sódico, 2mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 0,1 mM de solución de aminoácidos no-esenciales en MEM, 5 µg/ml de insulina y 10% de SFB. Una línea celular de eritroleucemia humana, K562 y una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratones, STO, se mantienen en DMEM/F12 complementado con 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-ME y 10% SFB.

*RT-PCR:* ARNs totales se extraen de Hep3B, HepG2 y STO mediante el método de Chomczynski y Sacchi N. Anal. Biochem 162:156-159 (1987). Los ADNc se sintetizan mediante la iniciación con oligo-dT y someten a amplificación por PCR usando conjuntos de iniciadores diseñados por los inventores y preparados para AFP o albúmina humana. Las secuencias iniciadoras son las siguientes

Para AFP:

Sec. con núm. de ident.: 1	haFP1:	5'-ACCATGAAGTGGGTGGAATC-3',
Sec. con núm. de ident.: 2	haFP2:	5'-CCTGAAGACTGTTCATCTCC-3',
Sec. con núm. de ident.: 3	haFP3:	5'-TAAACCCTGGTGTGGCCAG-3',
Sec. con núm. de ident.: 4	haFP4:	5'-ATTTAAACTCCCAAAGCAGCAC-3',
Sec. con núm. de ident.: 5	hAFPexon2:	5'-CTTCCATATTGGATTCTTACCAATG-3'.
Sec. con núm. de ident.: 6	hAFPexon3:	5'-GGTACCATATTTTTTGCCAG',
Sec. con núm. de ident.: 7	hAFPexon4:	5'-CTACCTGCCTTTCTGGAAGAAC-3',
Sec. con núm. de ident.: 8	hAFPexon5:	5'-GAGATAGCAAGAAGGCATCCC-3', y
Sec. con núm. de ident.: 9	hAFPexon6:	5'-AAAGAATTAAGAGAAAGCAGCTTG-3',

para albúmina:

Sec. con núm. de ident.: 10	hALB 1:	5'-GGCACAATGAAGTGGGTAACC-3',
Sec. con núm. de ident.: 11	hALB2:	5'-CCATAGGTTTCACGAAGAGTTG-3',
Sec. con núm. de ident.: 12	hALB3:	5'-GCCAGTAAGTGACAGAGTCAC-3',
Sec. con núm. de ident.: 13	hALB4:	5'-TTATAAGCCTAAGGCAGCTTGAC-3',

Las combinaciones de los iniciadores son como sigue:

Para AFP: hAFP1 y hAFP2,  
hAFP3 y hAFP4,  
hAFP1 y hAFP4,  
hAFPexon2 y hAFP4,  
hAFPexon3 y hAFP4,  
hAFPexon4 y hAFP4,  
hAFPexon5 y hAFP4, y  
hAFPexon6 y hAFP4.

Para albúmina: hALB 1 y hALB2,  
hALB3 y hALB4,  
hALB1 y hALB4,

El PCR se realiza en un volumen total de 50 µl consistente de 1 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris HCl, pH 8,3, y 1,25 U de polimerasa Amplitaq (Cetus Corp). Las muestras se calentaron a 94 °C durante 3 min seguido por la amplificación durante 30 ciclos de 2 min a 94 °C, 2 min a 62 °C, y 3 min a 72 °C. Después del último ciclo, una etapa de extensión final se realiza a 72 °C durante 7 min.

Después 5 µl de cada reacción de PCR se ejecuta en gel de agarosa al 2 % que contiene 5 µg/ml de bromuro de etidio en tampón Tris-acetato-EDTA.

5 *RT-PCR para AFP:* El gen AFP humano se compone de 15 exones (Gibbs y otros, Biochemistry, 26: 1332-1343). Para distinguir los transcritos truncados del ARNm de AFP completo funcional, dos porciones diferentes de la secuencia de ADNc de AFP se seleccionan como moléculas objetivo de RT-PCR. La combinación de iniciadores de hAFP1 y hAFP2 se usa para la amplificación del exón 1 que contiene el MET de iniciación para el exón 3, mientras que la de hAFP3 y hAFP4 amplifican el exón 12 al exón 14 que contiene el codón de parada. Los resultados del PCR se muestran en la Figura 1. Ambas combinaciones de iniciadores producen bandas de amplificación fuertemente detectadas en el ARN de Hep3B y HepG2 (carriles 1, 2, 4, y 5). En contraste, sólo la banda específica de la porción C-terminal se detecta por el conjunto de iniciadores de hAFP3 y hAFP4 en el ARN de K562 (carriles 7 y 8). Este resultado sugiere que la línea celular de eritroleucemia K562, sólo expresa una forma truncada de AFP sin el extremo N-terminal. En apoyo a esta hipótesis, se lleva a cabo el PCR para toda la región codificante de AFP usando los iniciadores hAFP1 y hAFP4. Como se esperaba, el PCR del ADNc de Hep3B y HepG2 muestra la banda única notable de 1,8 Kb (carriles 3 y 6), mientras que no hay banda en K562 (carril 9). Los controles son muestras sin ARN y una muestra derivada de la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratones (STO). No se muestra ninguna banda detectable.

20 A continuación, se construye una serie de iniciadores 5' del exón 2 al exón 6 para observar la diferencia entre la forma auténtica y la variante del ARNm de hAFP. En la Figura 1, el resultado muestra que toda la región codificante excepto el exón 1 se comparte en la forma variante de hAFP en K562 (carril 1, 3, 5, 7, 9, y 11).

25 *RT-PCR para la albúmina:* El gen de la albúmina humana se compone de 15 exones también (Minghetti y otros, J. Biol. Chem, 261: 6747-6757). Al igual que para AFP, la combinación de iniciadores de hALB1 y hALB2 se usa para la amplificación del exón 1 que contiene el MET de iniciación para el exón 4, mientras que hALB3 y hALB4 amplifican del exón 12 al exón 14 que contiene el codón de parada. Los resultados del PCR se muestran en la Figura 17. Ambas combinaciones de iniciadores producen bandas de amplificación fuertemente detectadas en el ARN de Hep3B y HepG2 (carriles 1, 2, 4, y 5). En contraste, sólo la banda específica de la porción C-terminal se detecta por el conjunto de iniciadores de hALB3 y hALB4 en el ARN de K562 (carriles 7 y 8). El PCR para la región codificante completa de albúmina usando los iniciadores hALB1 y hALB4 no muestran ninguna banda en K562 (carril 9). Los controles son muestras sin ARN y una muestra derivada de la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratones (STO). No se muestra ninguna banda detectable.

#### 35 Los proveedores de reactivos incluyen:

Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo)  
Gibco BRL Products (Gaithersburg, MD)  
Worthington Biochemical Corporation (Frehold, Nueva Jersey)  
Dupont Pharmaceuticals (Wilmington, Delaware)  
40 Falcon-un subsidiario de Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, Nueva Jersey)

#### Los proveedores de cultivos incluyen:

Anatomical Gift Foundation (Atlanta, Georgia)  
45 Advanced Biosciences Research, ABR (San Francisco, Cal)  
Cirujanos de trasplantes locales en el Hospital UNC

### Ejemplo 2

#### 50 **Procesamiento de hígados humanos**

Hígados fetales: Los hígados fetales proceden de múltiples clínicas afiliadas con Advanced Biosciences Research (ABR), todas en California, o de la Anatomical Gift Foundation (AGF) con clínicas en el sur (es decir, Georgia, Virginia), Nordeste (Pensilvania) o el medio oeste (Kansas, Colorado). Los fetos se recolectan de las clínicas; los tejidos de los fetos se disecan y colocan en RPMI 1640 (Gibco) complementado con insulina (Sigma, 5 µg/ml), transferrina (Sigma, 5 µg/ml), selenio ( $10^{-9}$  M, y suero fetal bovino al 5% (Gibco). Las muestras se colocan después, en hielo y se envían por correo a nuestro laboratorio, un proceso que puede tardar 10-16 horas. Así, se reciben las muestras aproximadamente 24 horas después de la cirugía. Las muestras se les asigna un número con el prefijo REN, teniendo en cuenta el orden cronológico que se recibe (REN 1, 2, 3, etc.), donde REN es una abreviatura para el renacimiento.

Hígados de adultos: Los hígados de adultos provienen de la Anatomical Gift Foundation o de cirujanos locales (UNC) y consisten en tejido de hígado rechazado, explantes de receptores de trasplantes o hígados donados para trasplantes de órganos, pero rechazados después, por razones diferentes a los agentes patógenos. Los pacientes

que proporcionan tejido de explante o tejido de donante rechazado se tamizan para una matriz de enfermedades y sólo aquellos que se encuentran a salvo de estas pruebas se usan para el procesamiento celular. Después de la eliminación de los pacientes, los hígados se ponen en la solución de la Universidad de Wisconsin (también llamada Viaspan) y se envían al laboratorio en hielo. El intervalo de tiempo entre la extracción de órganos de un paciente con muerte cerebral ("tiempo de retención") y su llegada al laboratorio es extremadamente variable. Los especímenes llegan en menos de 24 horas del "tiempo de retención", el tiempo en que se retira el hígado del donador.

Hígados de cadáveres: Los hígados obtenidos postmortem dentro de al menos 30 horas de la muerte se obtienen a través de asociaciones de obtención de órganos locales (por ejemplo Carolina Organ Procurement Association o COPA). Los hígados se procesan como los hígados adultos.

La lista de elementos verificada para la seguridad del investigador es: VIH I y II, HTLV I y II, hepatitis B y C; tuberculosis. La lista para el uso clínico es: VIH I y II, HTLV I y II; hepatitis A, B, C, y G; EBV, CMV; tuberculosis, sífilis y micoplasma.

Los hígados fetales y de adultos se procesan usando una combinación de digestión enzimática y disociación mecánica, los hígados fetales se preparan principalmente mediante disociación mecánica, mientras que los hígados de adultos se disocian principalmente mediante digestión enzimática. Una descripción de cada uno se da más abajo. Ambos hígados fetales y de adultos se digieren durante distintos períodos de tiempo en un tampón enzimático que sirve para disolver las matrices extracelulares que se unen las células en un tejido. La mezcla enzimática de colagenasa usada para el aislamiento de células hepáticas es una preparación enzimática "Liberasa" de alta pureza fabricada por Boehringer-Mannheim, que consiste en una mezcla de colagenasa y elastasa purificada. Esta mezcla enzimática puede usarse en concentraciones mucho más bajas y con pocos "efectos secundarios" perjudiciales.

**Solución enzimática:** solución de colagenasa--60-70 mg/100 ml de tampón (colagenasa tipo IV de Sigma, catálogo núm. C5138 o tipo B de Worthington, catálogo núm. LS005273; ambas siendo preparaciones bacterianas enriquecidas en colagenasa pero con muchas impurezas enzimáticas) o Liberasa -- (preparación de colagenasa/elastasa purificada por Boehringer-Mannheim, catálogo 1814184) preparada en tampón P2 (ver más abajo) y usada a 0,23 mg/ml

**Solución de lavado celular:** RPMI 1640 (Gibco) complementado con de insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), mezcla de ácido graso (ver más abajo) unida en una relación molar 1:1 a albúmina sérica bovina o humana purificada.

**Mezcla de ácido graso libre:** Poblaciones de células inmaduras y células hepáticas más viejas dañadas, requieren de lípidos para mantener y sintetizar sus membranas. Aunque los hepatocitos totalmente maduros pueden sintetizar sus membranas a partir de una fuente única de ácido graso (ácido linoleico), las células parenquimatosas más jóvenes no pueden y por lo tanto requieren una mezcla de muchos ácidos grasos diferentes para manejar sus necesidades de lípidos. Se proporciona una mezcla compleja que se une después, en una relación molar 1:1 con una albúmina altamente purificada. Una descripción detallada del método para la preparación de esa preparación de ácido graso se da más abajo:

Las soluciones madre se preparan como sigue, para un total combinado de 100 mM de ácidos grasos libres:

Palmítico	31,0 <u>mM</u>	Oleico	13,4 <u>mM</u>
Palmitoleico	2,8 <u>mM</u>	Linoléico	35,6 <u>mM</u>
Esteárico	11,6 <u>mM</u>	Linoléico	5,6 <u>mM</u>

Para obtener una concentración final de 7,6 µM/L, añadir 76 µl por litro. [REF: Chessebauf y Padieu, In vitro 20 (10):780: 1984. De acuerdo con la referencia anterior se usa una mezcla de ácidos grasos libres a una concentración final de 7,6 µeq/L (=7,6 µM) en los medios de cultivo celular.]



**Preparación de los componentes individuales de ácido graso:**

Cada componente individual se disuelve en 100% de EtOH como sigue:

5	Palmítico	1 M de materia prima, soluble en EtOH caliente
	Palmitoleico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH
	Esteárico	151 mM de materia prima, soluble en EtOH calentado a 1 g/21 ml
10	Oleico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH
	Linoléico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH
	Linolénico	1 M de materia prima, fácilmente soluble en EtOH

15 Estas materias primas individuales se mezclan después para obtener la mezcla de 100 mM de FFA. Las alícuotas de los FFA individuales y la mezcla de FFA se burbujearon con nitrógeno para reducir la oxidación y aumentar la estabilidad. Las materias primas se congelan -20 °C.

20 **Tampón de perfusión P1** -- tampón de perfusión libre de calcio y magnesio (pH 7,2) con concentraciones finales como se especifica para cada uno de los siguientes componentes: 118 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 2,5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM de EDTA, 5,5 mM de glucosa, 0,5% de albúmina sérica bovina o humana (BSA), ácido ascórbico (50 µg/ml), insulina (4 µg/ml), dexametasona (1 µM).

25 **Tampón de perfusión P2** -- medio de Eagle modificado por Dulbecco o RPMI 1640 complementado con BSA al 0,5 %, ácido ascórbico (50 µg/ml), insulina (4 µg/ml) y dexametasona (1 µM).

30 **DMEM** -- medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) con glucosa, piruvato sódico y L-glutamina y complementado además con suero fetal bovino al 5%, insulina (4 µg/ml) y dexametasona (1 µM).

35 **Medio de Chee** complementado con ITS<sup>TM</sup> complemento de cultivo (5 ml/500 ml) y dexametasona (0,1 µM)

**Percoll** (Farmacia, catálogo núm. 17089102) se diluye 9:1 con 10X solución salina regulada con fosfato de Dulbecco.

***Ejemplo 3*****Estudios en tejidos de hígado fetal**

40 Los hígados fetales llegan en el tampón de transporte (descrito anteriormente) y en hielo. Se enjuagan con un "tampón de lavado de células" que consiste en RPMI 1640 (Gibco) complementado con insulina (Sigma; 5 µg/ml), transferrina (Sigma; 5 µg/ml de selenio (elementos traza por espectrometría de masas de Johnson Matthey; 10<sup>-9</sup> M), y una mezcla de ácido graso libre unida a la albúmina sérica bovina en una relación molar de 1:1. Los hígados fetales se ponen después, en un tampón de colagenasa durante 15-20 minutos y se presionan suavemente después a través de un "colector" (Sigma) con un tamiz de malla 800 para producir pequeños agregados de células; el "tampón de lavado de células" se usa para facilitar el proceso de disociación. Los agregados de células se disocian completamente después, presionándolos a través de un filtro Micron 70 (filtro celular Falcon, 70 µm de nailon, catálogo núm. 2350) usando el "tampón de lavado celular" para facilitar el proceso. Las células que pasan a través del filtro de 70 micras se mantienen separadas de las que no lo hacen. Ambas muestras se criopreservan y verifican para el porcentaje de viabilidad mediante el ensayo de exclusión usando el tinte azul tripán.

***Ejemplo 4*****Estudios en tejidos de hígado adulto**

55 Los hígados se canalizaron por la vena porta, vena cava, o por ambas, se perfundieron con tampones para eliminar la sangre; y se perfundieron con tampones que contienen colagenasas/proteasas para disociar enzimáticamente las células. Después de la digestión, que toma usualmente de 15 a 30 minutos, dependiendo del tamaño del hígado, se presiona el tejido a través de estopilla o un filtro de nailon o se barre con una peine para completar mecánicamente el proceso de disociación celular. Las células disociadas se enjuagan con un tampón que contiene suero para inactivar la colagenasa y otras enzimas usadas en el proceso de perfusión.

60 Los tampones de perfusión, P1 y P2, se colocan en un baño de agua a 37 °C. La perfusión se lleva a cabo en una caja de perfusión de tipo Miller, que se mantiene a 37 °C durante toda la perfusión. Los tampones se oxigenan

durante la perfusión. Todos los tubos en la caja se enjuagan con etanol al 70%, seguido de agua destilada y después con PI para garantizar que el aire se eliminó del sistema. El hígado se canuló usando una cánula de Teflon a partir de una aguja de calibre 16 unida a una jeringa de 60 ml para descargar tampón P1 frío a través del hígado usando diversos vasos sanguíneos disponibles en la superficie cortada del hígado para trozos grandes de hígado (100-300 gm). Para los raros casos en que un lóbulo del hígado esté disponible, los restos de la vena cava pueden canularse. Se prueban los diversos vasos sanguíneos en los trozos de hígado para aprender cual ofrecerá la perfusión óptima del tejido. Este procedimiento elimina también cualquier exceso de sangre en el hígado. El vaso sanguíneo seleccionado se canula y se sella en el lugar usando adhesivo de calidad médica ("pegamento" de calidad médica). Todos los demás vasos grandes y aberturas de superficie se sellan usando el adhesivo de calidad médica, y, si es necesario, usando bastoncillos de algodón con el adhesivo para ayudar a sellar las aberturas. Una vez que el adhesivo se ha secado, la muestra de hígado se coloca sobre una malla de nilón dentro de un recipiente de vidrio de tamaño adecuado. El tampón P1 se añade al recipiente, y el hígado se sumerge en el tampón. El recipiente que contiene el hígado se coloca dentro de la caja de perfusión, y se une el tubo de salida de la cánula. El tampón P1 se recircula durante 15 minutos iniciando a una velocidad baja de aproximadamente 24 ml/min y después, se aumentó lentamente hasta entre 58 ml/min y 90 ml/min para optimizar un régimen de flujo con una presión de retorno aceptable. Se debe verificar que no haya fugas excesivas de la perfusión del hígado. Después de 15 minutos, el tampón P1 se retira del recipiente y reemplaza con el tampón P2 que contiene la colagenasa. El tampón P2 se recircula hasta que el hígado es suficientemente digerido (evaluado por la conversión de color del hígado de marrón oscuro rojizo a marrón pálido y mediante adquisición de textura blanda del hígado). El tampón P2 se recircula durante no más de 20-25 minutos. Una vez que la perfusión ha terminado, el tampón P2 se drena del recipiente y el hígado se transfiere en el recipiente a una campana biológica.

El medio de cultivo celular (DMEM) se añade al recipiente, y la cánula y el adhesivo se retiran junto con cualquiera de las regiones no digeridas del hígado. La cápsula del hígado (cápsula de Glisson) se rompe usando pinzas y tijeras para tejido. Esto permite la liberación del tejido digerido en el medio dejando atrás el tejido conjuntivo y cualquier material no digerido. El material digerido se pone en el DMEM y se filtra después a través de una serie de filtros de diferentes tamaños. Los filtros se colocan dentro de un gran embudo para ayudar a la filtración. El material digerido se filtra primero con una sola capa de estopilla, seguido por un filtro de nilón de 400 µm, y finalmente a través de un filtro de Teflón de 70 µm. El filtrado se divide en partes iguales en tubos de centrífuga y se centrifuga a 70 g durante 4 minutos.

Después de la centrifugación, antes de la adición de Percoll, el sobrenadante se denomina como la Fracción 1 (F1). Se añaden al sedimento de células, DMEM y Percoll isotónico para dar una relación final de 3:1, respectivamente. Por ejemplo, un pequeño sedimento de células empaquetadas de 5 ml de volumen puede suspenderse en 30 ml de DMEM y 10 ml de Percoll isotónico. La muestra se centrifuga a 100 g durante 5 minutos. El sobrenadante se obtiene: la capa superior se denomina como Fracción 2 (F2). La capa media del Percoll se denomina como Fracción 3 (F3). El sedimento de células que permanece es la Fracción 4 (F4.). Las células de las diferentes fracciones se suspenden y evalúan para su viabilidad usando el ensayo de exclusión con el tinte azul tripán. Las viabilidades de estas diferentes fracciones se presentan en la Tabla 6, junto con sus viabilidades después de la crioconservación.

Las células que permanecieron unidas al árbol vascular o biliar del tejido hepático después de la perfusión del hígado se conservaron. Estas células se encuentran en la suspensión original de células obtenidas después de la perfusión enzimática, y típicamente se dejan en la parte superior de los tamices (por ejemplo, estopilla) después de atravesar las células en suspensión. Estos restos del árbol vascular y biliar se procesan de nuevo con enzimas y las células resultantes se mezclan junto con las otras células.

El fraccionamiento con Percoll se usa rutinariamente por la mayoría de los investigadores para eliminar lo que suponen que los desechos y células muertas; solamente se conserva el sedimento final. La novedosa variación a la rutina de perfusión, que se describe en la presente descripción, es que el sedimento se desechó y las células con una densidad de flotación más baja (es decir, recolección de células en la parte superior del gradiente) están siendo retenidas y se usan para estudios posteriores. Estas células son células parenquimatosas más jóvenes y tienen una mayor facilidad de congelación (ver la sección sobre la crioconservación).

### **Ejemplo 5**

**Experimentos de crioconservación.** Los hígados usados para las metodologías de crioconservación se derivaron de donantes tan jóvenes como los hígados fetales (edades gestacionales de 12 semanas a 25 semanas) y tan viejos como de 77 años de edad.

### **"Nuevo tampón para la crioconservación"**

- Viaspan (Dupont catálogo núm. 1000-46-06) complementado con suero humano al 2% (Gibco) o suero fetal bovino (Biowhittaker),

- 10% de crioconservante [dimetilsulfóxido (Sigma catálogo núm. D5879 o D8779) usado exclusivamente para células parenquimatosas maduras o dimetilsulfóxido o glicerol (Sigma catálogo núm. G6279) usado para las células progenitoras].
- El tampón se complementa además con antibióticos (penicilina a 200 U / ml; estreptomina a 100 µg/ml),
- El tampón se complementa además con hormonas y factores de crecimiento: insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), factor de crecimiento epidérmico (50 µg/ml), FGF (10 ng/ml), IGF II (10 ng/ml),
- El tampón se complementa además con lípidos: ácidos grasos libres (7,6 µM/l) unido a albúmina sérica bovina (BSA) o albúmina sérica humana (HSA) y la lipoproteína de alta densidad (10 µg/ml)
- El tampón se complementa además con elementos trazas (selenio ( $10^{-9}$  M), cobre ( $10^{-7}$  M), cinc ( $5 \times 10^{-11}$  M)) y un antioxidante, (por ejemplo, una porforina que es un mimético de la superóxido dismutasa, usado a 10 µg/ml; ácido ascórbico, usado aproximadamente a 0,1 mg/ml; o cualquier antioxidante conocido en la técnica).

La variación en la composición, como se describe en la presente descripción, es combinar los nutrientes clave, lípidos, hormonas y factores de crecimiento que se identificaron como parte de los medios definidos hormonalmente, libre de suero hecho exclusivamente para las células hepáticas. El nuevo tampón produce viabilidades de las células hepáticas para las fracciones F4 que son tan bajas como 50% (a partir de muestras muy pobres) a tan altas como 80% (para muestras buenas). Las viabilidades de las fracciones F1-F3 están regularmente por encima de 80%, se sospecha de que el hecho es debido a que estas fracciones tienen células más jóvenes con estados de ploidía y actividad metabólica más favorable para la síntesis de componentes de la matriz extracelular y/u otros factores celulares necesarios para la viabilidad y el crecimiento; así, es probable que sean más fáciles de congelar. El uso de un mimético de la superóxido dismutasa en el tampón aumentó la viabilidad de las células en un 5-10%.

**Una alternativa a lo anterior es:**

- usar un tampón modificado en el que se elimina el Viaspan y el medio basal (tal como RPMI 1640) se complementa con insulina (5 ug/ml), transferrina (5 ug/ml), ácidos grasos libres (7,6 µM/l) unido a BSA, lipoproteína de alta densidad (10 µg/ml), elementos trazas (selenio ( $10^{-9}$  M), cobre ( $10^{-7}$  M), cinc ( $5 \times 10^{-11}$  M)), y un antioxidante
- revestir las células con una forma de matriz extracelular tales como colágeno tipo IV mezclado con laminina, o colágeno tipo I o tipo III mezclado con fibronectina.

Las células hepáticas fetales, procesadas como se describió anteriormente, se suspenden en el tampón de crioconservación (descrito anteriormente), se formaron alícuotas en crioviales de 3 ml a  $5-10 \times 10^6$  células/ml y se mantuvieron bajo esa condición durante 1-2 horas. Las células se congelan después, a temperaturas de nitrógeno líquido de  $-100^{\circ}\text{C}$  a  $-180^{\circ}\text{C}$ , preferentemente de  $-160^{\circ}\text{C}$  usando un congelador de velocidad controlada computarizada (Forma Cryomed) y después se almacenan en un tanque de almacenamiento grande de nitrógeno líquido ( $-160^{\circ}\text{C}$ ) en fase de vapor. Las células sobreviven bien al proceso y no se produce ninguna pérdida significativa de viabilidad durante periodos de almacenamiento en el intervalo de 50-270 días (ver Fig. 3).

Se encontraron que las fracciones de células hepáticas adultas (F1-F4) contienen poblaciones celulares diferenciadas: F1 contiene restos, células rojas de la sangre, células estrelladas hepáticas y células hepáticas pequeñas ( $<10 \mu$ ) que son poblaciones de células progenitoras probables (de cualquiera de los linajes hepáticos o hematopoyéticos); la fracción F2, la parte superior de la solución de Percoll, contiene células hepáticas más grandes ( $10-15 \mu$ ) que son células parenquimatosas pequeñas, diploides; la fracción F3 en la parte inferior de la Percoll contiene células parenquimatosas aún más grandes ( $15-25 \mu$ ) que consisten en una mezcla de células diploides y tetraploides; y la fracción F4 (la usada por todos los demás investigadores) que consiste en células parenquimatosas más grandes ( $25-50 \mu$ ) y que son totalmente poliploides (tetraploides y octaploide). Generalmente, las células parenquimatosas en la fracción F1 -F3 tienen una viabilidad después de la congelación de 85 a 95%; las células parenquimatosas en la fracción F4 tienen una viabilidad de 50-80% después de la congelación (en dependencia de las condiciones del hígado después de su llegada). Las variables identificadas que influyen en la viabilidad de las células parenquimatosas en la fracción F4 son: 1) de edad del donante (a mayor edad del donador, peor es el pronóstico para las células); 2) el tiempo entre "tiempo de mordaza" y la entrega al laboratorio (cuanto más corto mejor); 3) el estado de salud del tejido hepático antes de la extracción (*es decir*, afección isquémica severa confiere un mal pronóstico). Estos factores son interactivos de manera que la entrega rápida de tejido de un donante de edad avanzada puede ser más atractiva que tejido de un paciente joven que ha pasado demasiado tiempo en tránsito.

**Tabla 6.** Las viabilidades promedio y eficacias de fijación de hígados fetales y adultos con crioconservación y el % de células progenitoras hepáticas (AFP+ células) en la suspensión celular.

Población celular	Crioconservación	Viabilidad después del procesamiento	Viabilidad después de la descongelación	Promedio del tamaño celular (en $\mu\text{m}$ )	Crecimiento en cultivo	% de células AFP+
Hígados fetales	Glicerina	76%	77% (es decir, 100% de recuperación)	7-15	Bueno	6-7%
Hígado de adulto, F1	Glicerina/DMSO	80%	82-85%	<10	Bueno	0,5-1%
Hígado de adulto, F2	Glicerina/DMSO	85%	84%	10-15	Bueno	2%
Hígado de adulto, F3	DMSO	85%	85%	15-25	Bueno	0,2%
Hígado de adulto, F4	DMSO	50-75%	56%	25-50	pobre	0,01%

El intervalo extremo de viabilidades de las fracciones F4 tanto después del procesamiento como después de la congelación se debe a las longitudes variables de tiempo entre el "tiempo mordaza" y la recepción de las muestras en el laboratorio y además a las diferentes afecciones del hígado (fibrótica, isquémica, etc.). Generalmente, la fracción F4 es la más sensible a los vaivenes del tratamiento de los hígados y la salud general del tejido. Sorprendentemente, las fracciones F2 y F3 fueron rutinariamente viables y fácilmente crioconservadas incluso cuando se obtienen a partir de muestras pobres de hígado. Las fracciones F1 fueron más variables, y contienen una gran cantidad de restos, gotas de grasa así como numerosas células pequeñas que incluyeron tanto células parenquimatosas pequeñas (se supone que incluye las células progenitoras hepáticas) y diversas subpoblaciones hemopoyéticas (es decir, eritrocitos).

**Tabla 7. Criopreservación: Hígado fetal**

• >200 procesados	Rendimiento
• Tejido recibido (por la edad del donador)	◆ $\sim 10^8$ células por gramo de tejido procesado
◆ 12 semanas: $\sim 1\text{ml}$ células compactadas	● Viabilidad
	◆ Procesamiento: 75-85%
◆ 16 semanas: $\sim 15\text{-}20\text{ ml}$ células compactadas=0,5-1 gm de tejido	◆ Descongelación: > 95%
	◆ Clasificación: > 90%
	◆ En cultivo: > 90%
◆ 24 semanas: $\sim 4\text{-}5\text{ gms}$	

**Tabla 8. Criopreservación: Hígado de adulto**

5	• >80 procesados	• Viabilidad (procesamiento)
	• Recibido 100-200	◆ F1: >75%
	• Gramos por hígado (de 2,5-3 kg/hígado)	◆ F2: > 90% (12-15 μ)
		◆ F3: >90% (15-25 μ)
10	• Rendimiento: 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> células por gramo de tejido	◆ F4: 75-80% (25-50 μ)
		• Viabilidad (congelación)
		◆ F1-F3: 80%
15		→ unión buena
		◆ F4: 56%
		→ unión pobre

20

**EJEMPLO 6**

**Citometría de flujo**

25 Las células se pasan en fila a través de una celda de flujo, donde están expuestas a la luz láser. El volumen aproximado de cada célula se determina por "dispersión directa", o la cantidad de luz que se refracta cuando el haz se intercepta. La luz dispersada, "dispersión lateral" de las estructuras internas celulares tales como el núcleo, cuerpos de Golgi del retículo endoplasmático, vesículas, etc., se usan para determinar la cantidad de complejidad interna (es decir, una célula activa y unas células más maduras ganan que contienen más componentes internos que una quiescente o una más joven). La información más selectiva sobre las características de células se obtiene por la unión antígenos característicos altamente específicos, a complejos de proteínas en la superficie celular. Estos anticuerpos pueden unirse covalentemente a moléculas fluorescente tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y conjugados en tándem de PE y citocromo que se excitan por los rayos láser, generando luz emitida a longitudes de onda específicas para cada fluoróforo. Se seleccionan mediante la selección de un panel de cromóforos distintivos conjugados a poblaciones celulares de anticuerpos específicos de interés.

35

Las células se analizan en base a su entrada de parámetros. Una variedad de dispositivos de recolección se usan para recolectar las células deseadas, incluyendo Eppendorf y tubos cónicos, y cualquier tamaño de placa de múltiples pocillos a una velocidad de hasta 40,000 eventos por segundo o más alto.

40

**Anticuerpos y reactivos usados en los procedimientos de tinción**

Anticuerpo	Proveedor, Cat núm.;	Lote núm.
Anti-AFP humano en cabra	Chemicon,	AB635, C4P168
Monoclonal de ratón Thy humano X	Chemicon,	MAB1294,293CCD
Monoclonal de ratón anti-AFP humana conjugada con PE	Chromaprobe, P41020, A45P7	
Anti-cabra en conejo biotinilado	Vector Laboratories, BA-5000,J0313	
Anti-cabra en conejo biotinilado, Jackson Immunochemicals	200-152-096,25985	
Conjugado estreptavidina/AMCA, Jackson Immunochemicals,	016-150-084,40001	
Conjugado antiAMCA de oveja en burro, Jackson Immunochemicals,	713-156-4732202	
Conjugado antiCY5 de oveja en burro, Jackson Immunochemicals,	705-156-147,38756	
IgG de cabra, Jackson Immunochemicals,	005-000-002, 38837	
IgG de oveja Jackson Immunochemicals,	013-000-002, 39945	
Anti-albúmina humana en oveja, Serotec, ABP102,	210498	

60

**Monoclonal de ratón anti-humano:**

5	conjugado CD14/Tri Color	Pharmingen	
	ICAM	Pharmingen	
	conjugado CD34/FITC	Pharmingen	34374X
	conjugado CD38/PE	Pharmingen	31015X
10	conjugado CD38/FITC	Pharmingen	31014X
	conjugado glicoforina A PE	Pharmingen	32591A
	conjugado CD 45/PE	Pharmingen	31255X
15	conjugado CD 45/FITC	Pharmingen	31254X
	controles de isotipo IgGIPE	Pharmingen	33815X
	IgG2 FITC	Pharmingen	33814X
20	conjugado c_Kit PE	Caltag	MHCK04
	AFP humano X en conejo conjugado con FITC Accurate	YNRH AFPF no listado	
	Anti-AFP humano en cabra sin conjugar	AXL625	061
25	7Amino actinomicina D	Mol Probes A-1310,4981-1	
	(7AAD)		

**Soluciones principales usadas en las preparaciones celulares para citometría de flujo:**

30 BSA: albúmina de suero bovino (Pentex V)  
 PBS = solución salina regulada con fosfato;  
 SFB = suero fetal bovino;  
 AFP = alfafetoproteína

35 Medio Eagle modificado por Dulbecco con Hormonas: **HC DMEM**

500 mL de DMEM, alto contenido de glucosa sin rojo fenol  
 25 mL suero fetal bovino (SFB)  
 20 mL 5mM EGTA  
 40 de insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml)  
 Elementos traza [selenio ( $10^{-9}$  M), cobre ( $10^{-7}$  M), cinc ( $5 \times 10^{-11}$  M)]  
 Antibióticos (penicilina-100 µg/ml, estreptomycin-100 µg/ml)  
 500 mg albúmina de suero bovino (BSA) 30 mg DNasa  
 38µL mezcla de ácido graso libre unida a BSA.  
 45 Esterilizada por filtración a través de una unidad de filtración Nalgene con poros 0,2 µm

Solución salina regulada con Hanks-versión modificada: **HBSS-mod**

50 50 mL 10X HBSS  
 10 mL 1MHepes  
 Penicilina-100 µg/ml/estreptomycin-100 µg/ml  
 500mg de BSA  
 30 mg de DNasa  
 Preparar en 400 mL  
 55 pH a 7,3  
 Completar a 500 mL  
 Esterilizar con filtro a 0,2 µm

Tampón de bloqueo para inmunquímica

60 100 ml de HBSS\_mod  
 2,2 mL de gel de pez teleósteo al 45% y  
 0,8g de BSA  
 0,5mL 1% de saponina en HBSS

Medio de montaje para microscopía de inmunofluorescencia

0,5 mL 2X PBS  
 0,25g n-propilo galato  
 5,7g de glicerina

**EJEMPLO 7****Procedimientos para la preparación del tejido hepático congelado para la citometría de flujo**

Descongelar el tejido hepático congelado rápidamente a 37 °C. Cada criovial de hígado (que contiene cada uno aproximadamente 3 mL de tampón que contiene 5-10 X 10<sup>6</sup> células/mL) se lleva hasta 10 mL a una velocidad de 1 mL por min en hielo con HC-DMEM. La muestra se centrifuga a 1200 RPM durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se desecha y el sedimento de células se resuspendió en 5 mL de HC-DMEM. El lavado de las células se repite hasta que el sobrenadante se torna transparente. Después, se cuentan las células y se evalúan las viabilidades con un hemocitómetro usando el ensayo de exclusión con el tinte azul tripán. Las células se dividieron en fracciones de acuerdo con el protocolo experimental. Los tubos estándar se preparan para los datos de control que contienen entre 1 y 2 X 10<sup>6</sup> células, que generalmente se logra tomando 200 µL para cada uno a partir de una suspensión celular de 5-10 X 10<sup>6</sup>/mL. Se necesitan los siguientes tubos estándar:

1) OCS. La suspensión celular original que consiste en células control no teñidas.

2) FITC solo para ajustes de compensación. Añadir 5 µL de anti-glicoforina A marcada con FITC a 200 µL de suspensión celular. La alternativa es un cóctel de CD34, CD38 y CD45 marcado con FITC, 7 µL de cada uno en 200 µL de células.

3) PE solo para ajustes de compensación. Usar una Glicoforina-PE (2 µL para 1 mL HC\_DMED y añadir 30 µL de este a 200 µL de células).

4) 7AAD solo para compensación. Una buena señal se genera mediante la fijación de 200 µL de suspensión celular con paraformaldehído al 2 % y añadiendo después, 5 µL de 100 µM de 7AAD y 5 µL de detergente (saponina al 1 %) para un 1 mL de suspensión de estas células en HBSS-mod. Las células permeabilizadas se tiñen intensamente con 7AAD.

5) Cy5 solo para compensación, se incuban 200 µL de células fijadas (paraformaldehído al 2 %) durante 40 min en suero de cabra al 2% para marcar las superficies celulares con IgG de oveja. Las células se incuban después, con Cy5 conjugado con anti-IgG de cabra en burro (1: 800) durante 40 min.

6) AMCA sola para compensación. Como con 7AAD, se genera una señal artificialmente intensa para ajustes de compensación. 200 µL de células fijadas (paraformaldehído al 2 %) se incuban durante 40 min en suero de oveja al 2% para marcar las superficies celulares con IgG de oveja. Las células se incubaron después, con AMCA conjugado con anti-IgG de oveja en burro (1: 800) durante 90 min.

7) Controles de AMCA/Cy5. Incubar células fijadas (paraformaldehído al 2%) y permeabilizadas (saponina al 0,05%) con anti IgG de oveja en burro conjugado con AMCA y anti IgG de cabra en burro conjugado con Cy5 durante 90 min.

8) Controles del monoclonal isotipo. Se incuban las células con una IgG1 de ratón conjugada con PE y una IgG2 de ratón conjugada con FITC. Las concentraciones deben coincidir con las analíticas que se usan para marcar y clasificar los tubos.

9) Controles intracelulares de isotipo. Incubar las células fijadas (paraformaldehído al 2%) y permeabilizadas (saponina al 0,05%) con IgG de oveja e IgG de cabra no inmune durante 90 minutos como controles para los anticuerpos usados para la identificación de albúmina y alfafetoproteína. Continuar con la incubación con anti-IgG de cabra en burro conjugada con Cy5 y anti IgG de oveja en burro conjugada con AMCA durante 90 min.

Los tubos clasificados se preparan para la adquisición de poblaciones celulares seleccionadas que expresan combinaciones particulares de marcadores CD. Normalmente, estos tubos contienen 50-70 X 10<sup>6</sup> células. Las células se resuspenden en 1 ml de tampón de tinción compuesto por HC\_DMED + BSA al 1% + 500 pM de 7AAD (5 µL de 100 µM de materia prima). Entre 15 y 25 µL de cada uno de CD 34 FITC, CD38 PE, o CD 45 PE se añaden al tampón de tinción de acuerdo con los números de células (normalmente 3 µL del anticuerpo de Pharmingen por 10 X 10<sup>6</sup> células). Se añade el anticuerpo a c-Kit en una dilución de 1:60, glicoforina A se usa a una dilución de 1:500. Teñir durante 40 min sobre hielo y en la oscuridad. Después de teñir, las células se lavan dos veces con HBSS-mod y fijan con paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 min en hielo.

**EJEMPLO 8****Tinción intracelular para clasificación celular**

5 Para la tinción intracelular de células para el análisis de alfafetoproteína (AFP) mediante citometría de flujo, la suspensión de células se permeabiliza con una mezcla de saponina (Sigma S4521) al 0,05% en HBSS\_ mod durante 10 min en hielo. Las células se bloquean después, en una mezcla de HBSS\_ mod que contiene gel de pez teleosteo al 1% y BS al 0,8% y saponina al 0.005% durante 20 min, seguido de incubación con el anticuerpo de anti-AFP humana en cabra y anti-albúmina humana en oveja (ambos 1: 800 en tampón de bloqueo) durante 90 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se lavan dos veces con HBSS mod que contiene 0,01% de saponina seguido por la incubación con anti-IgG de cabra en burro conjugado con Cy5 y anti IgG de oveja en burro conjugado con AMCA durante 90 min.

15 Alternativamente, después del anticuerpo primario, las células se incubaron con anti-IgG de cabra en conejo biotinilada (1: 500 en tampón de bloqueo que contiene suero humano al 2% y 0,01% de saponina durante 90 min a temperatura ambiente en la oscuridad). Esto es seguido de 2 lavados con HBSS\_ mod que contiene saponina al 0,01% y después, la incubación con 9 µg/mL de estreptavidina/Cy5 conjugado en saponina al 0,01%/HBSS-mod durante 90 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, las células se lavan 2 veces con HBSS-mod y se resuspenden en HBSS-mod, se filtran a través de un tamiz de 50 µm para eliminar grupos de células para el análisis y clasificación en el citómetro de flujo.

25 Si se pretende la selección de células progenitoras hepáticas, la inmunoselección incluye eliminar las células que son poliploides y/o expresar marcadores asociados con células hemopoyéticas maduras del hígado tales como glicoforina A en glóbulos rojos. Además, las células que presentan CD45, que se expresa en todas las células hematopoyéticas maduras; las células que presentan marcadores asociados con células hepáticas maduras, tal como conexina 32, que se encuentra en todos los hepatocitos y células biliares; y las células que expresan marcadores asociados con células mesenquimales maduras, tales como los retinoides en células estrelladas hepáticas o Factor von Willebrand o Factor 8 en el endotelio, son todas eliminadas.

**EJEMPLO 9****Tinción inmunohistoquímica de poblaciones celulares clasificadas.**

35 Las células se tiñeron para la alfafetoproteína después del análisis y clasificación por el citómetro de flujo. Las fracciones de células clasificadas se recolectaron en HBSS-mod al 0,3% que contiene BSA al 1%. Después de retornar al laboratorio, el volumen de muestras recolectadas se ajusta para proporcionar 0,5 X10<sup>6</sup> células/mL y alícuotas de 200 µL se estira sobre portaobjetos de microscopio con un aparato Shandon Cytospin. Las preparaciones de portaobjetos se secan al aire y almacenan para su tinción posterior de alfafetoproteína y/o albúmina. La célula "disco" unida al portaobjetos de microscopio, se rodea con un dique de goma para producir un "pocillo" para la aplicación de reactivos inmunohistoquímicos. Los portaobjetos se sumergen en tampón tris ("bajo contenido de sal" 10 mM de tris con NaCl al 0,9% a pH 7,4) que contiene Triton X al 0,3% durante 10 min, seguido por 10 min en Tris solo bajo en sal.

45 Las células se bloquean después, con suero de conejo al 10% contenido en una solución de bloqueo de gel de teleosteos descrita anteriormente durante 90 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados con sal Tris de bajo contenido, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo anti-AFP humano de cabra diluido a 1:100 en tampón de bloqueo que contiene suero de conejo al 2%. Dos lavados con tampón Tris son seguidos después por una incubación de 90 min con anti-IgG de cabra en conejo biotinilada (1:200) en tampón de bloqueo a temperatura ambiente. La incubación final con el complejo estreptavidina/AMCA (9 µg/mL con tampón tris de bajo contenido de sal) se usa para localizar la inmunorreactividad de tipo AFP a través de la unión del fluorocromo AMCA con el anticuerpo en conejo biotinilado. Después de 2 lavados con tampón Tris se dejan secar las preparaciones de células antes de cubrir con un medio de montaje deslizante anti-desteñido (0,25 g galato de n-propilo en 5,7 g de glicerol con 1 ml de PBS). Cuando sea apropiado, las células se tiñen doblemente para la albúmina incluyendo un anticuerpo anti-humano en conejo conjugado con rojo Texas contra albúmina con el anticuerpo antifetoproteína primario.

60 Los portaobjetos de control se preparan por omisión del anticuerpo primario o secundario para demostrar el no marcaje de AMCA en las células en ausencia del anticuerpo anti- proteína alfa o el anticuerpo secundario biotinilado. Los portaobjetos se examinan con el microscopio de epifluorescencia usando excitación UV del tinte AMCA que emite luz en la región azul (450 nm).

**EJEMPLO 10****Terapia celular y/o génica.**



Debido a que el activador de plasminógeno de la urocinasa humana (uPA) puede activar el plasminógeno a través de las especies, se construye un vector recombinante adenoviral que expresa urocinasa humana a partir del promotor RSV-LTR, Ad-RSV-uPA con el objetivo de inducir la regeneración del hígado. Para la construcción y producción de los vectores adenovirales recombinantes, el ADNc para el uPA humano se prepara como sigue. El fragmento uPA HindIII/Asp718 de 1,326 kb que contiene la secuencia codificante de la proteína se inserta en los sitios HindIII/Asp718 del pXCJL.1 bajo el control de transcripción del promotor del Virus de Sarcoma de Rous LTR (RSV), y corriente arriba de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. El virus se prepara después de la co-transfección con pJMI7 y el vector designado Ad-RSV-uPA. La detección de Ad-RSV-uPA se lleva a cabo mediante la amplificación de placas individuales en las células 293. Tres días después de la infección, el sobrenadante se prueba para el reactivo inmunológico de uPA por ELISA y la actividad fibrinolítica mediante el ensayo en placa de fibrina demostrando la actividad catalítica de uPA producida después de la infección con Ad-RSVuPA. El virus purificado se almacena en alícuotas a -80 °C y se diluye con medios HGD MEM antes de la inyección. Los títulos virales se determinaron mediante mediciones de DO y el ensayo en placa estándar. La construcción de los vectores se lleva a cabo esencialmente como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5.980.886. Los virus se titularon en células 208F.

Ratones C57BL/6 hembra de 5 a 6 semanas (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) se alojaron en un ambiente libre de patógenos específicos. Muestras de hígado isquémico en varios periodos de tiempo se obtienen a partir de ratones sacrificados y las células progenitoras hepáticas se aislaron como se describió arriba. Para la canalización de la vena porta, los ratones receptores se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de 0,5 ml de 20 mg/ml de 2,2,2-tribromoetanol. Se realiza una incisión en la línea media abdominal y se separa la piel del peritoneo para crear de una bolsa subcutánea. El peritoneo se abre y la vena porta se expone. Un tubo de silicona (0,02" I.D., 0.037" O.D., S/P Medical Grade, Baxter, 111.) se inserta en la vena porta y se perfunde con salina heparinizada. Después de eso, la cánula se internaliza a través del peritoneo y se fija con una sutura de seda 4,0. La cánula de 3 cm de largo se liga en el extremo distal y se coloca por vía subcutánea en la bolsa previamente creada. A los ratones se les administran las células progenitoras infectadas con el virus no antes de las 24 horas. En algunos ratones la canulación de la vena porta se realiza junto con una hepatectomía 2/3. La hepatectomía parcial se lleva a cabo después. Para perfundir la vena porta, los ratones se anestesian y la piel se abre en el sitio proximal de la incisión abdominal que ya existe. La cánula se expone y se conecta a una bomba de jeringa. Para la infusión de virus, las preparaciones de adenovirus en DMEM se inyectan durante 5 a 10 min en la vena porta a través de la cánula.

Todos los análisis bioquímicos e histológicos se realizan después de la inyección de células progenitoras hepáticas infectadas con adenovirus en la vena porta a través de la cánula. El ensayo ELISA para uPA se basa en dos anticuerpos monoclonales diferentes dirigidos contra el dominio catalítico y de unión al receptor de uPA. Uno de los anticuerpos monoclonales se marca con peroxidasa. La albúmina y las proteínas totales en suero se analizan por métodos automatizados rutinarios en los laboratorios de patología clínica. Se conoce que la infusión de adenovirus en la vena porta de ratones C57BL/6 resulta en la transducción del 100% de los hepatocitos con más de 1 copia del ADN adenoviral por célula. La misma dosis de Ad-RSV-uPA produce la mortalidad del 90% que al menos en parte, se relaciona con la hemorragia. Cuando la dosis más baja de Ad-RSV-uPA se usa, la tasa de mortalidad es inferior al 5% y esta dosis se selecciona para los experimentos de regeneración hepática. La infusión de Ad-RSV-uPA produce las elevaciones transitorias de la urocinasa sérica que alcanza un valor máximo de aproximadamente 350 ng/ml (70 a 100 veces mayor que los niveles endógenos) cuatro días después, antes de fallar para las concentraciones iniciales en el día 12. El aumento de uPA se asocia además, con un aumento en las concentraciones séricas de SGPT. Después de la infusión de adenovirus, los animales se infundieron con 3H-timidina en diferentes tiempos, y se determinó la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN del hígado como un medio para cuantificar la proliferación celular. Los animales tratados con Ad-RSV-uPA tuvieron un aumento del periodo de captación de timidina que comenzó el día 3 y persistió de durante 8 días. Así, el periodo de captación de 3H-timidina hepática con el tratamiento de Ad RSV-uPA/células ovas es mucho mayor que el obtenido con la hepatectomía parcial. Los receptores de los adenovirus de control negativo muestran el máximo de captación de la 3H-timidina hepática en el día 4 que regresó a sus niveles iniciales 24 h más tarde y un aumento mínimo de la captación de 3H-timidina en el día 11. En resumen, los daños hepáticos como se midió por los niveles de SGPT y las tasas de captación de 3H-timidina elevadas se atribuye a la producción de urocinasa intrahepática lo que indica que ocurre la regeneración biosintética hepática significativa. Las células progenitoras hepáticas infundidas sin uPA son mejores que el adenovirus con el inserto de uPA.

Hallazgos microscópicos histológicos de animales tratados con adenovirus recombinantes/células progenitoras derivados de los cadáveres donantes sin latidos cardíacos indican que los ratones tratados el día 3 tuvieron un infiltrado inflamatorio moderado que contenía macrófagos y neutrófilos. Los cambios degenerativos en los hepatocitos incluyeron vacuolización, y núcleos picnóticos y pobremente mitóticos. Hay evidencia de la recuperación hepática ocho a 10 días después de la administración de Ad-RSV-uPA/células ovas que incluyen la presencia de la regeneración multifocal, tamaño heterogéneo de los núcleos y una reacción inflamatoria muy disminuida con pocos hepatocitos que se degeneran. De tres a cuatro semanas, el infiltrado resuelto y el hígado parece normal.

En total, estos estudios demuestran que la expresión de la urocinasa en conjunto con las células progenitoras hepáticas indujeron la significativa regeneración de las células parenquimatosas hepáticas.

## 5 **EJEMPLO 11**

### **Citoreducción por centrifugación con Percoll**

10 Este ejemplo proporciona métodos para el enriquecimiento de las células progenitoras hepáticas, incluyendo las células madre hepáticas, células progenitoras no comprometidas y células progenitoras comprometidas. Las variaciones de estas técnicas se conocen por aquellos con experiencia en la técnica e igualmente son adecuadas siempre que estén de acuerdo con la finalidad de citoreducir las suspensiones de células hepáticas para proporcionar una población enriquecida de células progenitoras.

15 Una suspensión celular sustancialmente única de células hepáticas en medio de cultivo, por ejemplo, el medio basal de Eagle (BME), se aplica a la parte superior de una capa de 15% de Percoll preparado en BME. Usando una centrífuga Sorvall RT7 y rotor de 14 cm, u otra combinación de centrífuga de rotor equivalente, se centrifugan los gradientes de 600 a 1200 rpm, preferentemente de 750 a 1000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recolectó y se centrifugo de nuevo, pero de 1200 a 2000 rpm, preferentemente de aproximadamente 1500 rpm. La fracción de sobrenadante se enriquece en células progenitoras y el sedimento (Fracción F3) contiene células capaces de al menos un ciclo celular. Las células sobrenadantes se recolectan por separado y se centrifugan de nuevo, en 2000 a 20 rpm, preferentemente de aproximadamente 2500 rpm. En esta última centrifugación, las células progenitoras sedimentan frecuentemente en las regiones superiores del Percoll, dejando residuos celulares en los niveles superiores, y el sedimento tiene células capaces de varios ciclos de mitosis. La fracción de Percoll es adecuada para su uso inmediato, crioconservación, establecimiento en cultivo, o enriquecimiento adicional. El enriquecimiento puede realizarse mediante tamizaje, selección por afinidad, clasificación de FACS o cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica y descritas anteriormente. La selección negativa se logra mediante la eliminación de las células que expresan marcadores para CD45, glicoforina A, u otros marcadores como se menciona más abajo. La selección positiva se logra mediante la selección de células que expresan CD14, CD34, CD 38, ICAM u otro marcador indicativo de expresión de longitud completa de alfafetoproteína, albúmina, o ambos.

## **EJEMPLO 12**

### **Preparación de células progenitoras por elutriación**

35 Este ejemplo proporciona las etapas para un aislamiento de células progenitoras hepáticas comprometidas y no comprometidas. Si bien varias técnicas se conocen en la técnica, una de las modalidades preferidas se describe en detalle con la comprensión de que otras técnicas de preparación igualmente adecuadas siempre que estén de acuerdo con las finalidades deseadas. Para ejemplos de técnicas preferidas, no limitativas ver, por ejemplo las patentes de Estados Unidos núms. 5.807.686, 5.916.743, 5.672.346, 5.681.559, 5.665.557, 5.672.346, y 5.663.051 incorporadas en la presente descripción a modo de referencia.

45 Células pluripotentes o hepáticas comprometidas, pequeñas de hígado se pueden aislar preliminarmente usando Percoll, u otros gradientes de densidad adecuados tal como Histopaque, y después centrifugar, lavar dos veces con medios y resuspender en 10 ml de medios de elutriación. Para la elutriación contracorriente, la células mononucleares pequeñas lavadas se inyectaron a través de un agente de acoplamiento en el sitio de muestreo en la corriente de entrada de una centrífuga Beckman J6M equipada con un rotor JE-5 y la cámara estándar. Sin embargo, se puede usar cualquiera de una serie de centrífugas comerciales de flujo continuo y elutriadores que emplean preferentemente insertos plásticos desechables que incluyen el medio de la cámara para facilitar la separación basada en la densidad, tales como los "modelos de Fenwal CS 3000" y "Autopheresis C" comercializados por Baxter International Inc, de Deerfield, IL; o Spectra Apherisis v 7/6, comercializado por Cobe manufacturing de Lakewood, CO. La selección de los Instrumentos depende de una persona con experiencia en la técnica. Una bomba peristáltica (Cole Palmer Instruments, Chicago, IL) proporciona el flujo continuo del medio de elutriación, que es solución salina normal al 0,9% con 100 mg/dl de D-glucosa, 0,3 Mm de ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA) y 50 mg/dl de albúmina sérica bovina con pH ajustado a 7,2. El medio se esteriliza antes de su uso. Las células se suministran a un régimen de flujo total de 15 ml/min, velocidad de rotor de 900 g y a temperatura ambiente. Después que se recolectan 100 ml de eluato, el régimen de flujo se aumenta a 25 ml/min. Con la velocidad del rotor mantenida constante, los regímenes de flujo se aumentan secuencialmente a 29 ml/min, 33 ml/min y 37 ml/min, recolectándose 200 ml de con cada incremento. Las células que permanecen en la cámara se capturan girando el rotor y descargando la cámara con 100 ml de medios de elutriación. Cada fracción de células se lava y se centrifuga a 300 g durante 10 minutos. Las fracciones adecuadas se recolectan, se determina la viabilidad por exclusión del colorante con azul tripán y las recuperaciones celulares se determinan con el contador celular (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

Alternativamente las células hepáticas no se separan por separación mediante gradiente de densidad y se suspenden en solución salina regulada con fosfato (PBS), pH 7,4, que contiene suero fetal de ternero al 5 %, EDTA al 0,01 porcentaje en peso/vol., y 1,0 g/l de D-glucosa, y se inyectan en un sistema de elutriación centrípeta contracorriente Beckman a 10 °C a una velocidad de rotor de 1,950 rpm usando un rotor JA-17 y la cámara de separación estándar (Beckman Instruments) y las muestras se eluyen a regímenes de flujo entre 12 y 14 ml/min.

Las células obtenidas en las fracciones adecuadas tienen generalmente diámetros celulares en un intervalo de 5 a 15 micras, preferentemente 8,0 a 9,4 micras; la mayoría de las células tuvieron diámetros que se encuentran en el intervalo de 8,3 a 9,2 micras. Estos diámetros se miden de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica. Si es necesario, se lleva a cabo la selección adicional ya sea positiva o negativa, basada en marcadores de celulares.

Una variedad de otros anticuerpos conocidos por los expertos en la técnica se puede usar solo o en conjunto con los marcadores de progenitores hepáticos. La elección dependerá del tipo de célula deseada para aislar o enriquecer, e incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos específicos para los antígenos hematopoyéticos y linfoides tales como, anti-CD2, anti-CD2R, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5 y anti-CD8 específico para células T; anti-CD6 específico para un subconjunto de células T y un subconjunto de células B; anti-CD7 específico para el subconjunto de células T mayores; anti-CD12, anti-CD19 y anti-CD20, anti-CD72, anti-CDw78, específico para células B; anti-CD13 y anti-CD14 específico para monocitos; anti-CD16 y anti-CD56 específico para células citolíticas; anti-CD41 para plaquetas; anti-CD1a, CD1b y CD1c específicos para timocitos corticales y células de Langerhans; anti-CD9 específica para las células pre-B, monocitos & plaquetas; anti-CD10 específico para células progenitoras linfoides, C-All y granulocitos; anti-CD 11a específico para leucocitos; anti-CD11b específico para granulocitos, monocitos y células citolíticas; anti-CD11c específico para monocitos, granulocitos, células citolíticas y leucemia de células peludas; anti-CD 15 específico para granulocitos; anti-CDw17 específico para granulocitos, monocitos y plaquetas; anti-CD18 específico para leucocitos; anti-CD21 específico para células B maduras; anti-CD22 específico para células B citoplasmáticas y células B maduras; anti-CD23 específico para células B activadas; anti-CD24 específico para células B y granulocitos; anti-CD25 y anti-CD26 específico para células T y B activadas y macrófagos activados; anti-CD27 y anti-CD28 específico para el subconjunto de células T mayores; anti-CD30 específico para células T y B activadas y células de Sternberg Reed; anti-CD31 específico para plaquetas, monocitos/macrófagos, granulocitos y células B; anti-CDw32 específico para macrófagos, granulocitos, células B y eosinófilos; anti-CD33 específico para monocitos, células progenitoras mieloides y leucemias mieloides; anti-CD34 específico para células precursoras hematopoyéticas; anti-CD35 específico para granulocitos, monocitos, células B, algunas células NK, y eritrocitos; anti-CD36 específico para monocitos/macrófagos y plaquetas; anti-CD37 específico para células B maduras; anti-CD38 específico para células plasmáticas, timocitos y células T activadas; anti-CD39 específico para células B maduras; anti-CD40 específico para células B y carcinoma; anti-CD42 y 42b específico para plaquetas y megacariocitos; anti-CD43 específico para leucocitos excepto células B circulantes; anti-CD44 específico para leucocitos y glóbulos rojos; anti-CD45 específico para leucocitos; anti-CD45RO específico para células T, subconjunto de células B, monocitos y macrófagos; anti-CD45RA específico para células B, monocitos y subconjunto de células T; anti-CD45RB específico para células B, subconjunto de células T, monocitos macrófagos y granulocitos; anti-CD46, CD55, CD58 y CD59 específico para células hematopoyéticas y no-hematopoyéticas; anti-CD47 específico para todos los tipos de células; anti-CD48 específico para leucocitos y neutrófilos; anti-CDw49b específico para plaquetas, células T activadas y cultivadas a largo plazo; anti-CDw49d específico para monocitos, células T y células B; anti-CDw49f específico para plaquetas y megacariocitos; anti-CDw50 y CDw52 específico para leucocitos; anti-CD51 específico para plaquetas; anti-CD53 específico para leucocitos incluyendo las células plasmáticas normales y neoplásicas; anti-CD54 específico para células endoteliales; anti-CDw60 específico para el subconjunto de células T y plaquetas; anti-CD61 específico para plaquetas & megacariocitos; anti-CD62 específico para plaquetas activadas; anti-CD63 específico para plaquetas activadas, monocitos/macrófagos; anti-CD64 específico para monocitos (interferón .gamma regulado negativamente); anti-CDw65 específico para granulocitos y reactividad heterogénea con monocitos; anti-CD66 & 67 específico para granulocitos; anti-CD68 específico para monocitos y macrófagos; anti-CD69 específico para células T y B activadas, macrófagos activados, y células citolíticas; anti-CDw70 específico para células T y B activadas, células de Sternberg-Reed, y linfoma anaplásico de células grandes; anti-CD71 específico para células T y B activadas, macrófagos, células proliferativas; anti-CD73 específico para el subconjunto de células B y subconjunto de células T; anti-CD74 específico para células B y monocitos/macrófagos; anti-CDw75 específico para células B maduras; anti-CD76 específico para células B maduras y subconjunto de células T; anti-CD77 específico para células B centro-folicular; anticuerpos para citocinas y factores de crecimiento (por ejemplo IL1-IL13, EGF, IGF I y II, TGF-.alfa. y .beta., TNF-.alfa. y .beta., FGF, NGF, C1F, IFN-.alfa. y .beta., CSF's); antígenos virales (por ejemplo, proteínas de la envoltura del virus de la hepatitis B o proteínas de la envoltura del VIH), hormonas, antígenos o marcadores celulares o asociados a tumor, moléculas de adhesión, moléculas de hemostasis y células endoteliales. Otros marcadores y procedimientos de enriquecimiento son igualmente adecuados en la patente de Estados Unidos núm. 5.840.502 incorporada como referencia.

### **EJEMPLO 13**

#### **Biorreactor**

Un biorreactor de alto rendimiento (HPBR) se emplea para cultivar células progenitoras de hepatocitos humanos y su progenie. Este proceso proporcionará un gran número de células útiles para fines médicos adicionales o el biorreactor por sí mismo sirve como unidad de producción para proteínas secretadas por la célula biológicamente útiles y factores que pueden incluir, pero sin limitarse al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de tipo insulina I y II (IGF-I y II), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformador de tipo a y tipo b (TGF-a y TGF-beta), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento del sarcoma (SGF), factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de liberación de la prolactina y hormona de crecimiento (GHRF) y diversos factores de crecimiento hemopoyéticos tales como interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, etc., factor de diferenciación eritroide (EDF) o proteína de liberación de la hormona folículo-estimulante (FRP), inhibina, factor de proliferación de células madre (SCPF) y fragmentos activos, subunidades, derivados y combinaciones de estas proteínas entre muchas otras conocidas en la técnica. Generalmente, como se usa en la presente descripción, estos factores celulares se refieren a una proteína secretada que se selecciona del grupo que consiste en una citocina, una linfocina, una interleucina, un factor estimulante de colonias, una hormona, un factor quimiotáctico, un factor anti-quimiotáctico, un factor de coagulación, una proteína trombolítica, una proteína del complemento, una enzima, una inmunoglobulina y un antígeno. Entre tales proteínas biológicamente activas una persona con experiencia en la técnica puede seleccionar el Factor VIII, Factor IX, Factor VII, eritropoyetina, alfa-1-antitripsina, calcitonina, hormona del crecimiento, insulina, lipoproteína de baja densidad, apolipoproteína E, receptor de IL-2 y sus antagonistas, superóxido dismutasa, modificadores de la respuesta inmune, hormona paratiroidea, los interferones (IFN alfa, beta o gamma), factores de crecimiento nervioso, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias, interleucinas (IL) 1 a 15, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), adenosina desaminasa, factores de crecimiento de tipo insulina (IGF -1 y IGF-2), ligando promotor de megacariocitos (MPL), trombopoyetina o combinación de estos.

Sin limitarse a este protocolo particular de cultivo de células en un bioreactor, otros procedimientos bien conocidos en la técnica son igualmente adecuados y puede adoptarse fácilmente a partir de las patentes de Estados Unidos publicadas núms. 6.001.585; 5.998.184; 5.846.817; 5.622.857; 5.571.720; 5.563.068; 5.512.474; 5.443.985; 5.342.781; 5.330.915; 5.320.963; 5.202.254; 4.833.083; y 4.760.028 incorporadas en la presente descripción a modo de referencia.

El presente dispositivo contiene 450 fibras de celulosa de 10 kd y 540 fibras de polipropileno y los detalles sobre otros parámetros se encuentran por ejemplo en la patente de Estados Unidos núm. 5.622.857 que se incorpora a la presente descripción en forma de referencia. Las células se aislaron como se describió anteriormente. Todos los materiales necesarios se obtienen o bien de Sigma Chemical Co. o Life Technologies. El medio de fijación para el medio de cultivo a largo plazo es el siguiente: RPMI 1640 (500 mL); 50 mL de SFB (10%); 4 mM de L-glutamina; 1x de penicilina/estreptomina; gentamicina; 15 mM de HEPES; 10 mU/mL de insulina; 10 mU/mL de transferrina; selenio. El sistema HPBR se lava con el medio durante un día antes de aplicarse el medio de fijación. 500 mg de microportadores Cytodex 3 prehinchados se inoculan en el espacio anular interno del HPBR. Las fibras oxidantes alojan los microportadores y les impidieron la distribución en todo el ECS. Las células progenitoras hepáticas humanas viables se inoculan también en el espacio anular interior, y el dispositivo se balanceó y giró manualmente para lograr un mezclado uniforme de células y microportadores. Suponiendo que las células progenitoras y la progenie tienen entre 10-20 µm de diámetro, la relación de inóculo célula para microportadores es aproximadamente 500. La viscosidad aparente de las células y los microportadores aumenta rápidamente, lo que indica que las uniones célula a microportadores y célula-a-célula se realizan rápida y normalmente. A 2-3 minutos del mezclado, un gel discreto de células y microportadores se forma en el espacio anular interior. Después de una incubación durante la noche a 37 °C en el medio de fijación (en una posición estacionaria), el medio se cambió a medio de cultivo a largo plazo (2 L). Estos volúmenes no son limitantes de ninguna manera ya que una persona con experiencia en la técnica puede escalar fácilmente la producción hasta el nivel deseado. Los hepatocitos se cultivan durante 5 semanas, con medio fresco aplican al sistema semanalmente. La función metabólica de las células se controla mediante el análisis de muestras diarias. Después de 5 semanas, >90 % de la recuperación de células viables y microportadores se alcanza mediante el procedimiento siguiente: colagenasa 0,1 % en PBS mezclado con 0,44 mL (0,23 M) de EDTA se usa para descargar el ECS y el HPBR se incuba durante 10 minutos; el contenido del ECS se expulsa con aire estéril desde un cilindro de la jeringa; este proceso se repite con medio de cultivo a largo plazo y los materiales se recolectan, se lavan y se separan.

El HPBR es igualmente adecuado para el cultivo y la transformación genética de células (por ejemplo, expresión génica de HGF). El siguiente es un protocolo no viral genético para células dependientes del anclaje (por ejemplo, SW 480 P3; núm. ATCC CCL228), que puede modificarse y optimizarse adecuadamente a partir de los procedimientos publicados usando pocillos y placas de cultivo, por aquellos con experiencia en la técnica. La fibra media con propiedades de 10 kD se prefieren en el HPBR. El biorreactor funciona de la misma manera que se

describió arriba. Los microportadores Cytodex 1 (Farmacia, comercializado por Sigma Chemical Co.) se usan ampliamente para cultivar células dependientes de anclaje. Un amplio intervalo de densidades de células se puede inocular en el ECS del HPBR, en el intervalo desde:  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^{15}$  células o superior según se desee. La relación de inóculo célula a microportadores recomendada está en el intervalo de aproximadamente 10, aunque una persona con experiencia en la técnica puede modificarlo según se desee. El dispositivo se hace girar suavemente durante todo el experimento a aproximadamente 10 cpm (o mayor). Después de cultivar las células durante aproximadamente un día (o más, dependiendo de la célula específica), se logra la confluencia óptima para obtener la transfección eficiente. La relación de inóculo célula a microportadores se ajusta para impactar positivamente en este marco de tiempo en la eficacia terapéutica y económica. En el día de la transfección, se prepara la solución de ADN del plásmido (por ejemplo, pCMV), y la solución de lípido catiónico (por ejemplo, reactivo LIPOFECTIN, Life Technologies). Estos reactivos deben estar libres de suero, aunque el proceso global requiera la presencia de suero. Cantidades apropiadas de la mezcla de ADN y soluciones de lípidos se inyectan después a la mezcla en el ECS del dispositivo. Después de aproximadamente unas pocas horas (o incluso varias) de la transfección, continuar el uso de suero, si es adecuado, y continuar para cultivar las células como antes durante aproximadamente unos pocos días. Períodos más largos pueden usarse al expandir las células transformadas permanentemente. Cosechar las células de una manera similar a la descrita anteriormente.

#### **EJEMPLO 14**

##### **20 Hígado artificial**

Como una extensión de ejemplo anterior una persona con experiencia en la técnica puede adoptar fácilmente el biorreactor como sistema de soporte hepático extracorpóreo. El xenotrasplante (el trasplante de órganos entre especies) puede ayudar a aliviar la escasez de hígados de donantes usando órganos de animales. Un peligro potencial del trasplante de órganos animales en los seres humanos, sin embargo, es que los virus que infectan a los animales donantes pueden infectar a los receptores. Como los receptores de trasplantes de órganos pueden ingerir fármacos para suprimir el sistema inmunológico y prevenir el rechazo de órganos, pueden ser incapaces de luchar contra el virus animal que infecta. En un escenario aún más alarmante, el virus del animal puede mutar en el huésped infectado en una forma que puede infectar a contactos humanos con sistemas inmunitarios normales. Como resultado, puede surgir un nuevo virus humano patogénico. Una especie animal favorita para el trasplante de órganos humanos es el cerdo y también los primates. Sin embargo, es claro que si está disponible el hígado artificial basado en células humanas, éste se puede preferir a los hígados de animales.

Después del tiempo deseado se obtienen en cultivo hepatocitos maduros y/o células biliares derivadas de una población enriquecida en células progenitoras hepáticas. Se obtienen a diario de 2 a 5 billones de células de alta viabilidad (superior al 80%). Generalmente, el medio de cultivo usado es el medio Waymouth complementado con hormona. Para acomodar de 2 a 5 mil millones de células, el biorreactor se escala hasta dos recipientes de contención, cada uno con un diámetro interno de 40 mm y una altura de 100 mm. En esta situación particular, se usan perlas de vidrio de aproximadamente 2 mm de diámetro y un volumen total de 250 ml por recipiente de contención. El medio se suministra a un régimen de reciclado de 360 ml/min. La alta viabilidad de los hepatocitos se evidencia por la tasa de consumo estable de oxígeno. El biorreactor se une después a un receptor humano cuyo hígado se elimina por la cirugía debido a una insuficiencia hepática total. Del mismo modo, el biorreactor se une a un sujeto humano con un hígado disfuncional. Un experto en la técnica conocerá los procedimientos para fijar el biorreactor como sistema de soporte hepático extracorpóreo o conocerá medios alternativos conocidos en la técnica tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 6.008.049; 5.981.211; 5.976.870; 5.891.713; 5.827.729; 5.643.794; 5.622.857; 5.605.835; y 5.270.192 incorporadas en la presente descripción a modo de referencia. A partir de tales referencias resulta evidente que las células hepáticas de un donante artificial no se limitan necesariamente a especies humanas y el uso de especies cruzadas de tales células ahora es posible. Por ejemplo, las células hepáticas de cerdos o primates son igualmente adecuadas para uso humano. Es igualmente evidente que los métodos y composiciones de la presente invención permiten la preparación de células hepáticas humanas para su uso en terapia celular o la terapia hepática extracorpórea, con todas las ventajas que conlleva la misma.

La sangre de la arteria femoral izquierda se dirige en un hemoconcentrador Minntech. Una cánula elecath periférica 12 se inserta en la arteria femoral y se conecta de un tubo de PVC de 1/4" al hemoconcentrador. El hemoconcentrador separó la sangre en una fracción de ultrafiltrado libre de células, y una fracción de células sanguíneas. La fracción de glóbulos rojos se devuelve a la vena femoral a través de un tubo similar. El ultrafiltrado salió del hemoconcentrador por medio de un tubo de PVC de 1/4" y entró en el sistema biorreactor de hepatocito con el régimen de flujo ajustado a 40 ml/min usando una bomba de rodillo. Después de la perfusión a través del biorreactor, el ultrafiltrado se devuelve al paciente a través de la vena yugular izquierda. Para demostrar la provisión de metabolismo hepático extracorpóreo, dos productos químicos diferentes que se sabe que se metabolizan por el hígado, la 7-etoxicumarina y la lidocaína, se administran en el ultrafiltrado a la entrada del biorreactor. Los metabolitos respectivos, 7-OH-cumarina y monoetilglicinaxilidida (MEGX), se miden en las salidas de los biorreactores antes de que el ultrafiltrado se devuelva al paciente. Se observa un metabolismo significativo de la 7-

etoxicumarina y la lidocaína. Por tanto, los resultados demuestran la aplicación del biorreactor como sistema de soporte, proporcionando metabolismo hepático extracorpóreo. La separación de las células sanguíneas del plasma minimiza la reacción inmunológica del receptor de los hepatocitos extraños. Por lo tanto, las células progenitoras hepáticas y su progenie son útiles en el biorreactor para proporcionar soporte hepático extracorpóreo.

5

**EJEMPLO 15****Péptidos codificados por el exón 1 y uso como antígenos**

10 Los péptidos cortos correspondientes al exón 1 de la alfafetoproteína se usan para distinguir de manera inequívoca la alfafetoproteína en varios linajes celulares mediante la evaluación de la expresión con anticuerpos específicos. La secuencia del péptido codificado por exón 1 es:

Sec. con núm. de ident. 14 MKWVESIFLIFLLNFTESTRHRNEYGI

15 Estos aminoácidos también pueden representarse por una cadena alfabética como ABCDEFGHIJKLMNOPRSTUVWXYZ de manera que la letra A de esta cadena comienza desde la posición M, K, W, V, E, S, I, F, L, I, F, L, L, o N del péptido. Los péptidos de la secuencia codificada por exón 1 y entre cuatro y doce residuos de aminoácidos de longitud se conjugan con una macromolécula para producir un antígeno. El péptido está opcionalmente ligado a la macromolécula por un espaciador de dos a ocho átomos de carbono de longitud. La macromolécula es albúmina, hemocianina, caseína, ovoalbúmina o polilisina. Los péptidos adecuados incluyen los péptidos en la tabla y análogos con al menos 80% de homología o aminoácidos sustitutos estándar. El siguiente es el ejemplo que construye una persona con experiencia en la técnica para obtener la secuencia peptídica deseada y la longitud de acuerdo a las necesidades específicas:

25 A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,

A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,

A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,

A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K,

A--B--C--D--E--F--G--H--I--J,

30 A--B--C--D--E--F--G--H--I,

A--B--C--D--E--F--G--H,

A--B--C--D--E--F--G,

A--B--C--D--E--F--G,

A--B--C--D--E--F,

35 A--B--C--D--E,

A--B--C--D,

B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,

B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,

B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,

40 B--C--D--E--F--G--H--I--J--K,

B--C--D--E--F--G--H--I--J,

B--C--D--E--F--G--H--I,

B--C--D--E--F--G--H,

B--C--D--E--F--G,

45 B--C--D--E--F,

B--C--D--E,

C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,

C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,

C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,

50 C--D--E--F--G--H--I--J,

C--D--E--F--G--H--I,

C--D--E--F--G--H,

C--D--E--F,

D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,

55 D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,

D--E--F--G--H--I--J--K--L,

D--E--F--G--H--I--J--K,

D--E--F--G--H--I--J,

D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,

60 D--E--F--G--H--I,

D--E--F--G,

E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,

E--F--G--H--I--J--K--L--M,

E--F--G--H--I--J--K--L,

- E--F--G--H--I--J--K,  
 E--F--G--H--I--J,  
 E--F--G--H--I,  
 E--F--G--H,  
 5 F--G--H--I--J--K--L--M--N,  
 F--G--H--I--J--K--L--M,  
 F--G--H--I--J--K--L,  
 F--G--H--I--J--K,  
 F--G--H--I--J,  
 10 F--G--H--I,  
 G--H--I--J--K--L--M--N,  
 G--H--I--J--K--L--M,  
 G--H--I--J--K--L,  
 G--H--I--J--K,  
 15 G--H--I--J,  
 H--I--J--K--L--M--N,  
 H--I--J--K--L--M,  
 H--I--J--K--L,  
 H--I--J--K,  
 20 I--J--K--L--M--N,  
 I--J--K--L--M,  
 I--J--K--L,  
 J--K--L--M--N,  
 J--K--L--M,  
 25 K--L--M--N y similares.  
 donde cualquiera de A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M o N, puede ser aminoácidos no polares (hidrófobos)  
 tal como glicina Gly G  
 alanina Ala A  
 valina Val V  
 30 leucina Leu L  
 isoleucina Ile I  
 metionina Met M  
 fenilalanina Phe F  
 triptófano Trp W  
 35 prolina Pro P  
 o polar (hidrófilo)  
 serina Ser S  
 treonina Thr T  
 cisteína Cys C  
 40 tirosina Tyr Y  
 asparaginas Asn N  
 glutamina Gln Q  
 o eléctricamente cargado (negativo)  
 ácido aspártico Asp D  
 45 ácido glutámico Glu E  
 o eléctricamente cargado (positivo)  
 lisina Lys K  
 arginina Arg R  
 histidina His H  
 50 o ausente. La cadena puede estar compuesta por sustitutos de aminoácidos aceptables o sales de estos. Las  
 sustituciones de aminoácidos más frecuentes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn,  
 Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, y vice versa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>	THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL	
<120>	Células progenitoras hepáticas humanas	
<130>	U 342EP1	
<140>	EP08019659	
<141>	2000-01-19	
<150>	US 60/116,331	
<151>	1999-01-19	
<160>	14	
<170>	PatentIn versión 3.3	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	1	
	accatgaagt ggtggaatc	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
	cctgaagact gtccatctcc	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	3	
	taaaccctgg tggtggccag	20
<210>	4	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	4	
	atttaaactc ccaagcagc ac	22
<210>	5	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	5	
	cttccatatt ggattcttac caatg	25
<210>	6	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	



<400> 6 ggctaccata ttttttgccc ag	22
<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 7 ctacctgcct ttctggaaga ac	22
<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 8 gagatagcaa gaaggcatcc c	21
<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 9 aaagaattaa gagaaagcag cttg	24
<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 10 ggcacaatga agtgggtaac c	21
<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 11 ccataggttt cacgaagagt tg	22
<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 12 gccagtaagt gacagagtca c	21
<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 13 ttataagcct aaggcagctt gac	23
<210> 14	

<211> 28  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Lys Trp Val Glu Ser Ile Phe Leu Ile Phe Leu Leu Asn Phe Thr  
1 5 10 15

Glu Ser Arg Thr Leu His Arg Asn Glu Tyr Gly Ile  
20 25

REIVINDICACIONES

1. Una composición de células progenitoras hepáticas humanas enriquecidas aisladas mediante un método que comprende las siguientes etapas:  
 5 (a) proporcionar una suspensión de células sustancialmente única de tejido extraído de hígado adulto humano; y  
 (b) separar de la suspensión las células que tienen un diámetro de menos de 15 micras, y  
 (c) seleccionar las células que expresan además alfafetoproteína, albúmina, o ambas;  
 en donde las células progenitoras hepáticas son capaces de generar hepatocitos y células biliares.  
 10
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende células hepáticas humanas diploides.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de selección comprende elutriación  
 15 centrífuga, centrifugación en gradiente de densidad, tamizaje, cromatografía de afinidad, etiquetado con marcadores fluorescentes, flujo de líquido contracorriente, centrifugación de flujo continuo, centrifugación zonal, uso de perlas magnéticas, o combinaciones de estos.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además la lisis selectiva  
 20 de células maduras.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células progenitoras hepáticas humanas tienen un diámetro entre 5 y 15 micras.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células progenitoras hepáticas humanas  
 25 tienen un diámetro entre 8 y 9,4 micras.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las células progenitoras hepáticas humanas que tienen un diámetro menor que 15 micras y expresan (i) ICAM y (ii) alfafetoproteína, albúmina, o  
 30 ambas.
8. La composición de la reivindicación 7 en la que las células progenitoras hepáticas humanas expresan CD14, CD34, CD38, CD117, ICAM o combinaciones de estos.
9. La composición de la reivindicación 7 en la que las células progenitoras hepáticas humanas albergan el ácido  
 35 nucleico exógeno.
10. La composición de la reivindicación 9 en la que el ácido nucleico exógeno codifica al menos un polipéptido de interés.
- 40 11. La composición de la reivindicación 9 en la que el ácido nucleico exógeno promueve la expresión de al menos un polipéptido de interés.
12. Una composición farmacéutica que comprende la composición de la reivindicación 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.  
 45
13. Una población de células progenitoras hepáticas humanas aisladas que tienen un diámetro de menos de 15 micras y que expresan (i) ICAM y (ii) alfafetoproteína, albúmina, o ambas, en donde las células progenitoras hepáticas son capaces de generar hepatocitos y células biliares.
- 50 14. Una célula progenitora hepática humana aislada que tiene un diámetro inferior a 15 micras y que expresan (i) ICAM y (ii) alfafetoproteína, albúmina, o ambas, en donde la célula progenitora hepática es capaz de generar hepatocitos y células biliares.

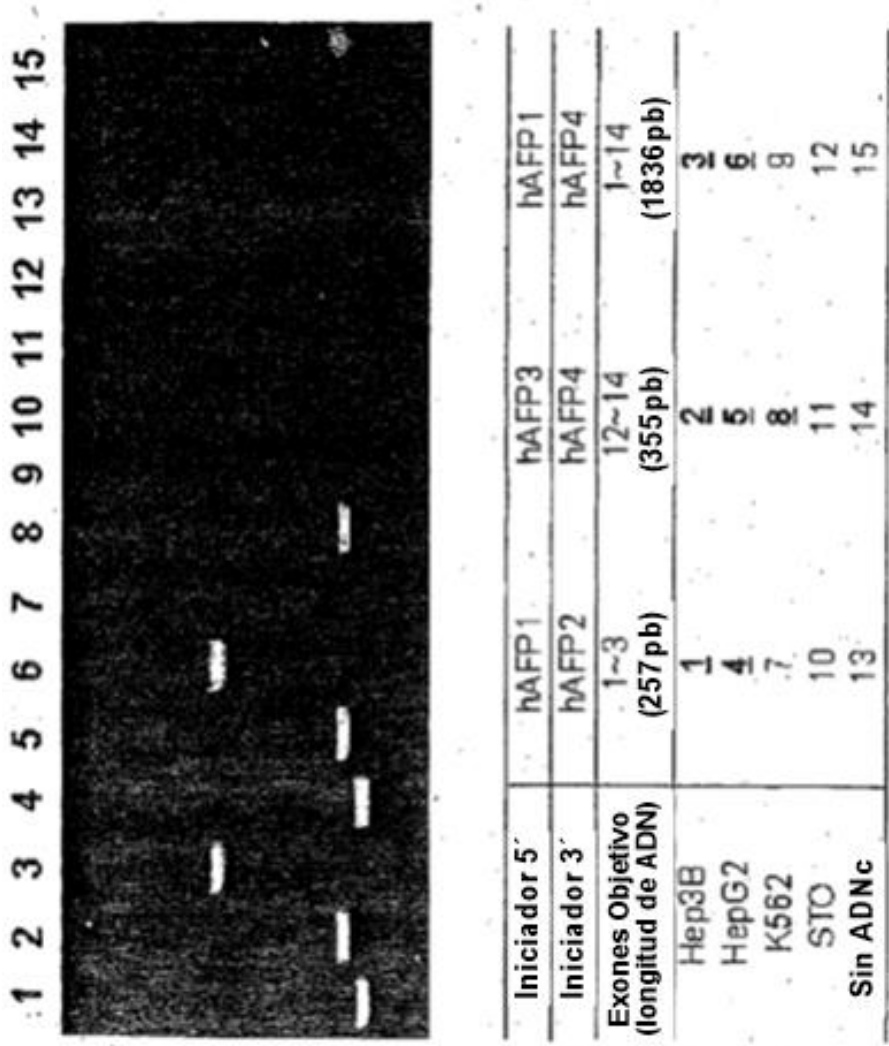
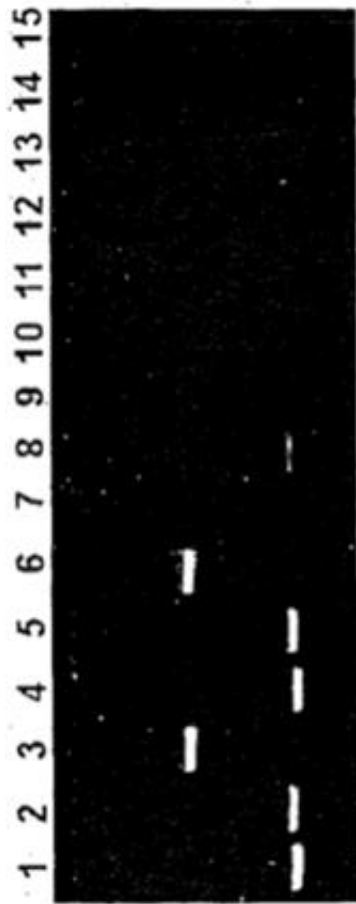


Figura 1



Iniciador 5'	hALB1	hALB3	hALB1
Iniciador 3'	hALB2	hALB4	hALB4
Exones Objetivo (longitud de ADN)	1-4 (333pb)	12-14 (358pb)	1-14 (1836pb)
HepG2	1	2	3
Hep3B	4	5	6
K562	7	8	9
STO	10	11	12
Sin ADNc	13	14	15

Figura 2

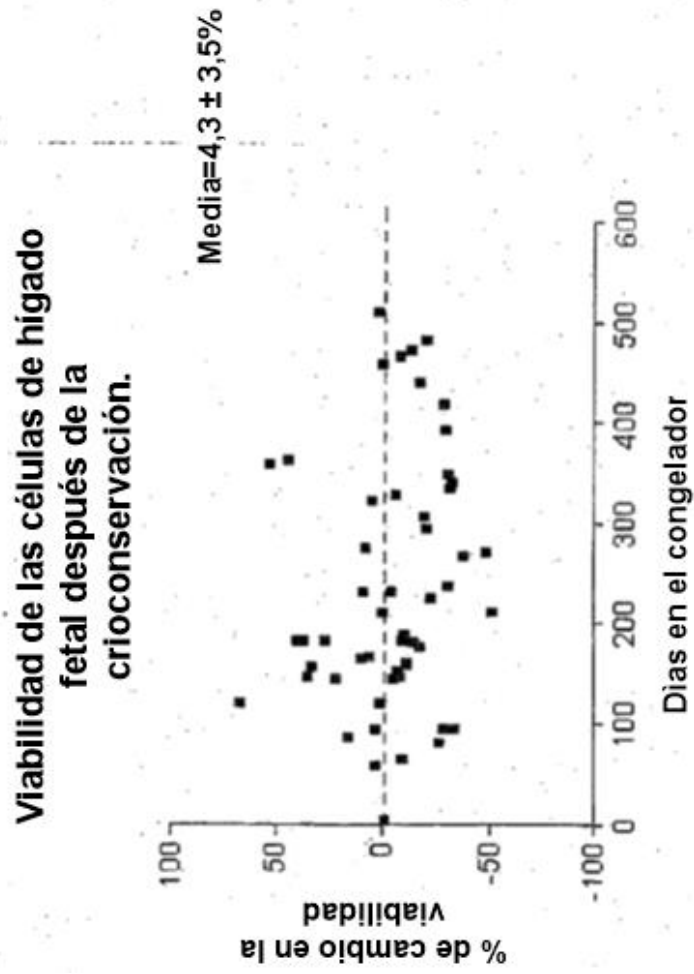


Figura 3

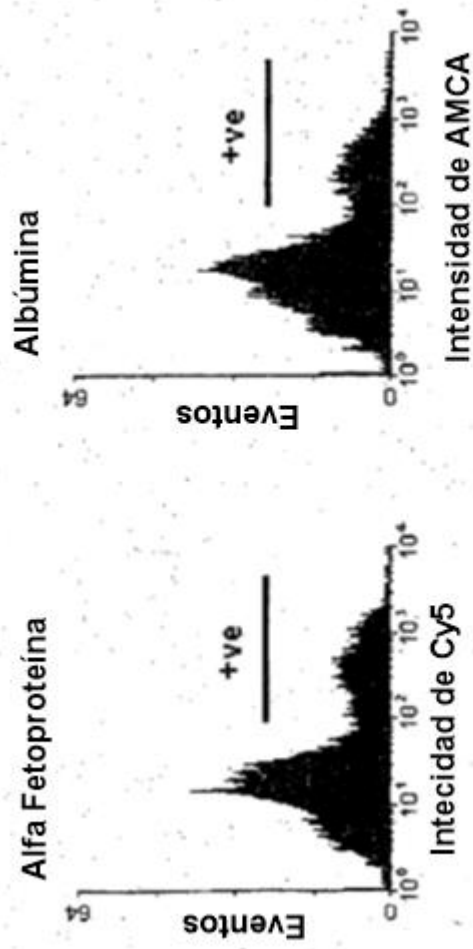


Figura 4

**Expresión de marcadores de superficie en la suspensión de células hepáticas**

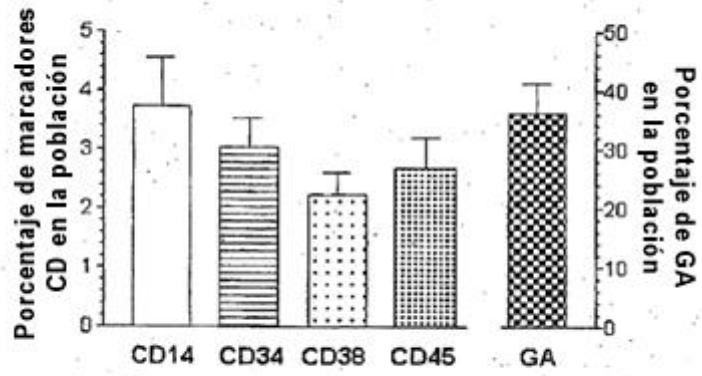


Figura 5



Co-expresión de antígenos de la superficie celular y  $\alpha$ -fetoproteína por las células de hígado fetal.

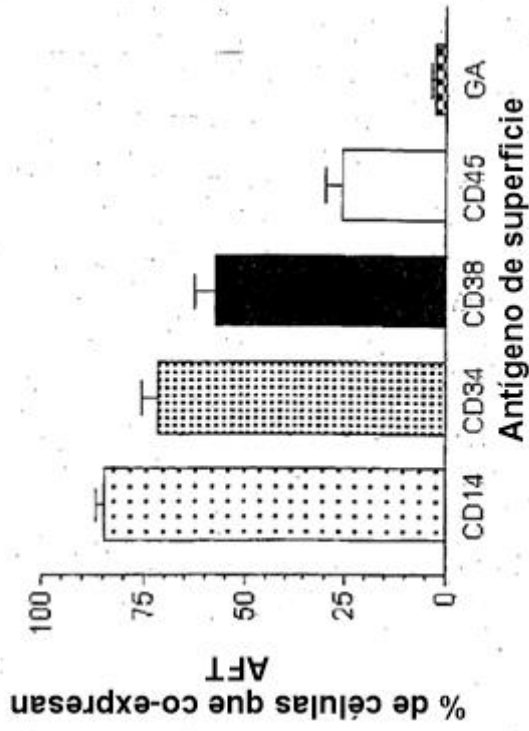


Figura 6

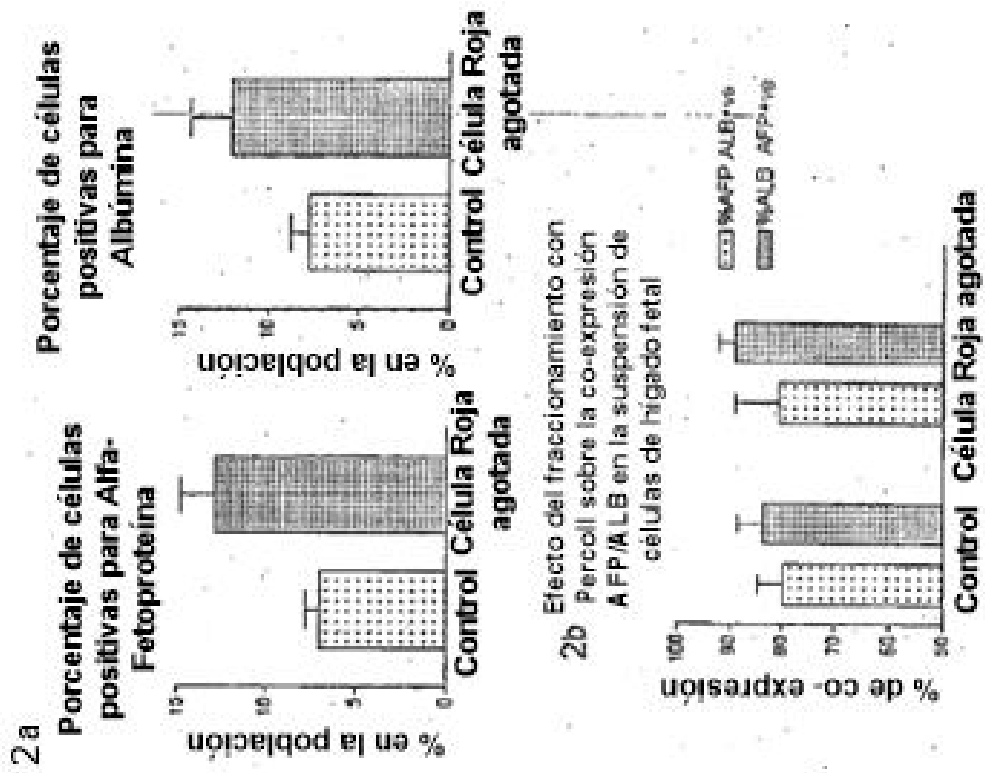


Figura 7

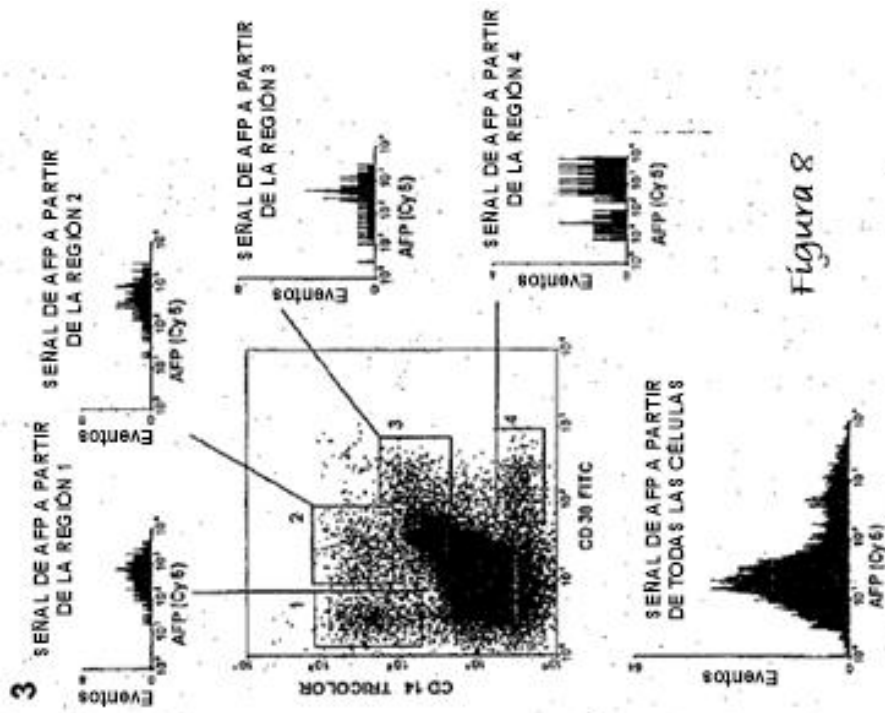


Figura 8

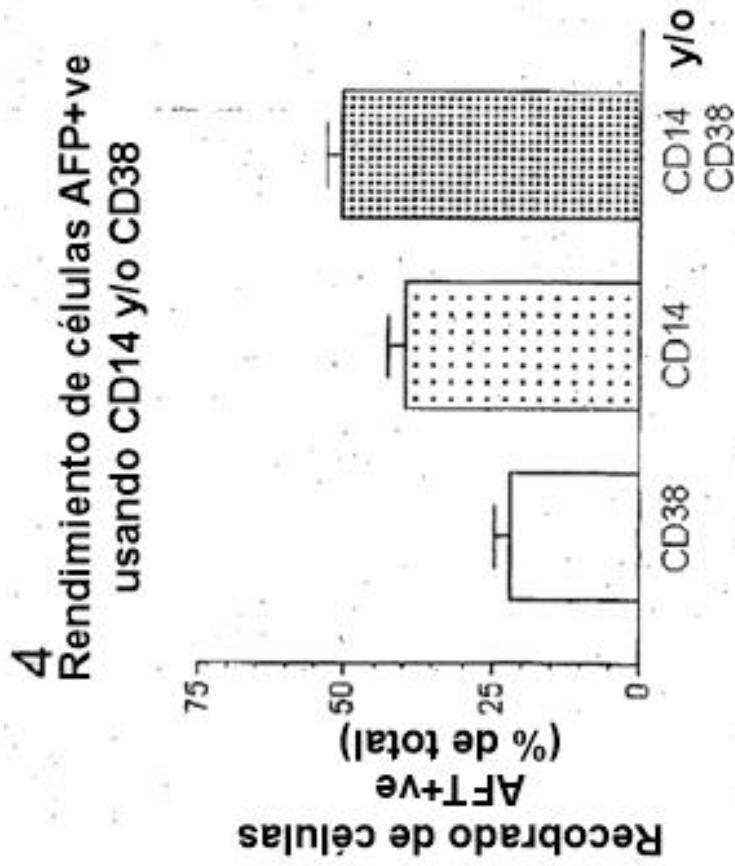


Figura 9

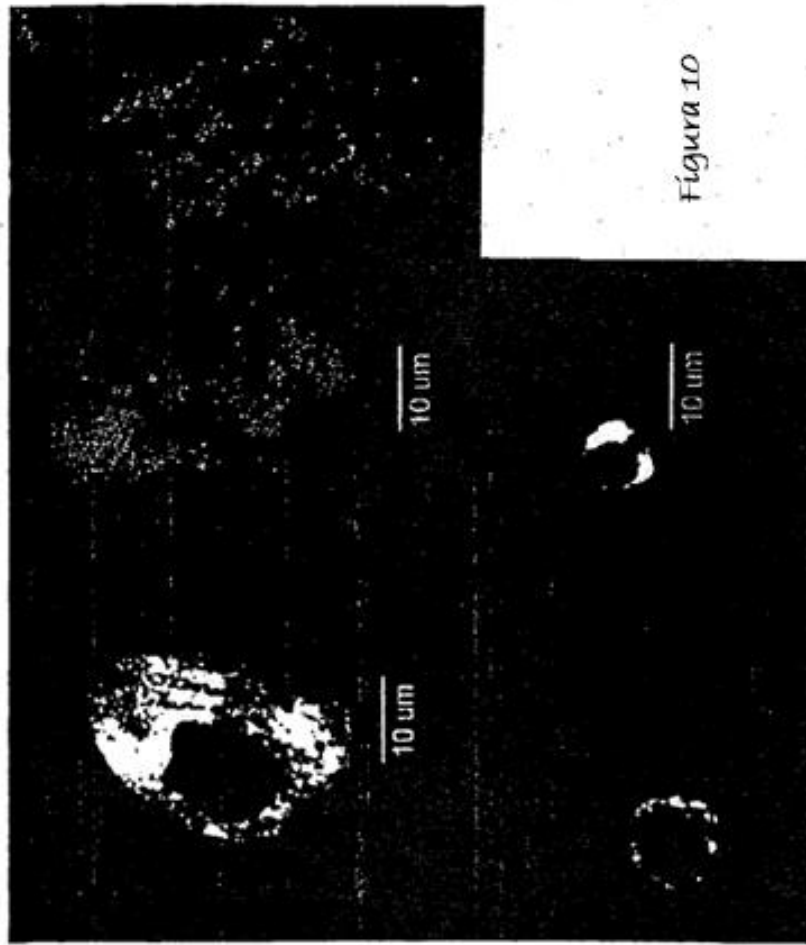
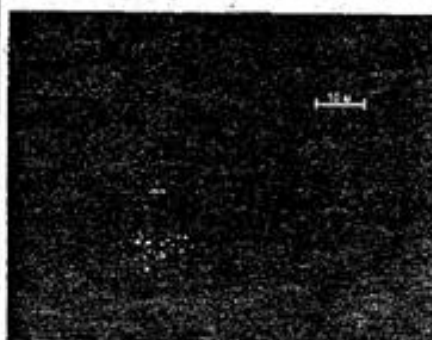
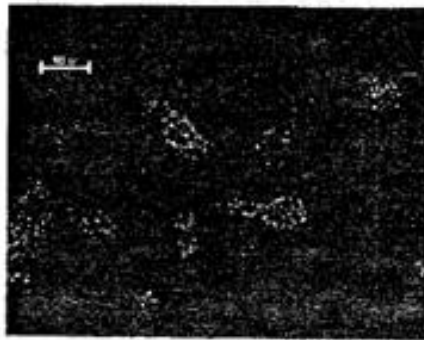
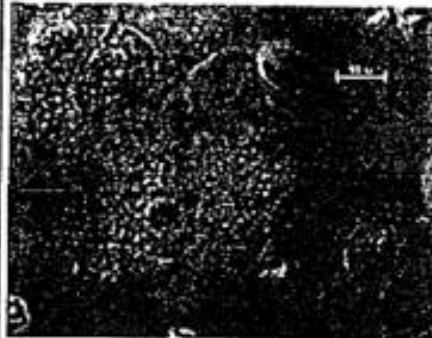


Figura 10

**Negativo para antígeno  
de superficie**



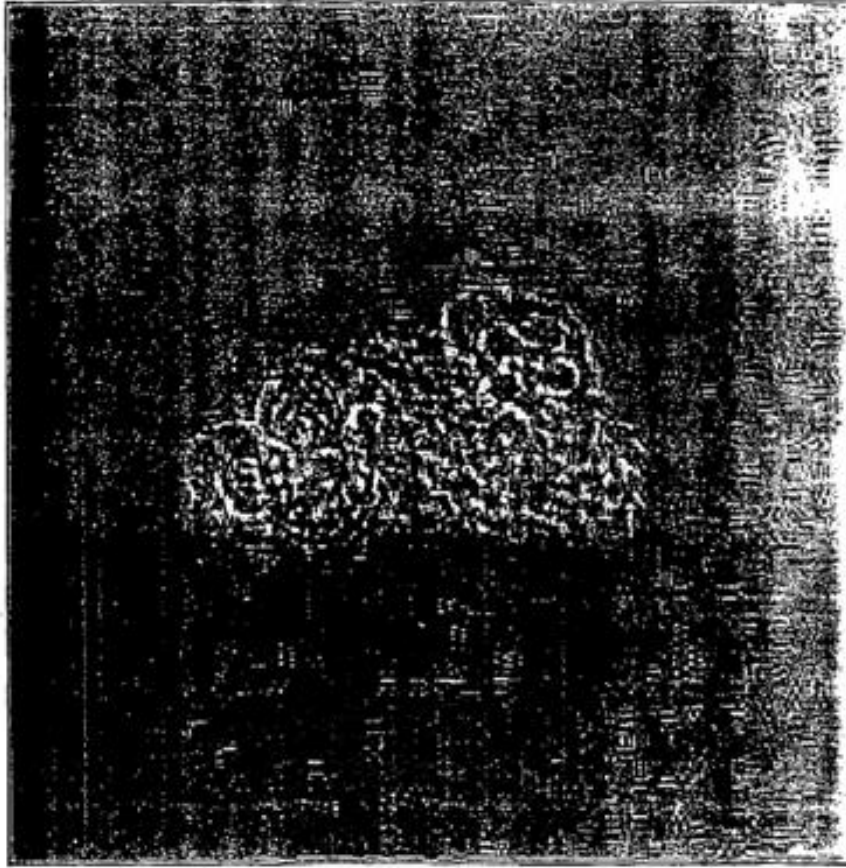
**Positivo para CD14**



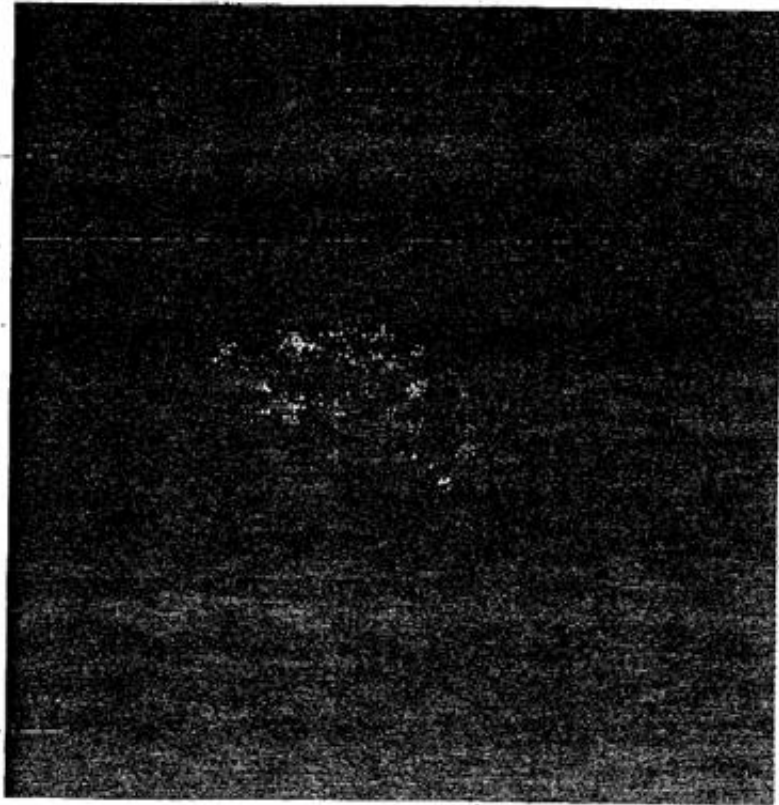
**Superior: imagen DIC de las células**

**Inferior: Inmunofluorescencia de AFP**

*Figura 11*

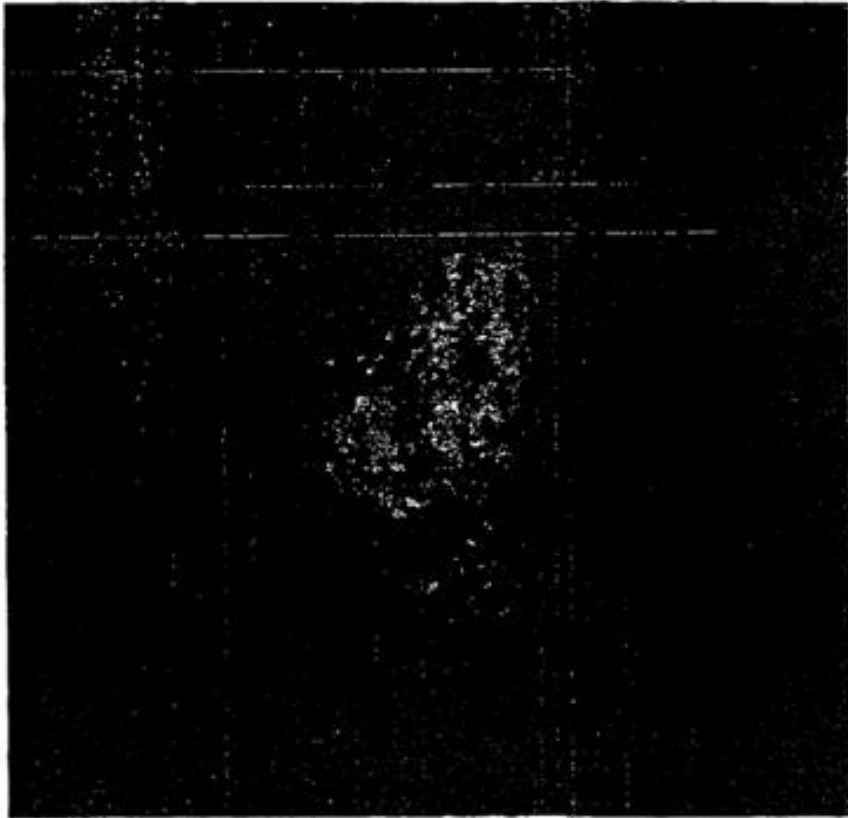


*Figura 12a*



*Figura 12b*





*Figura 12c*

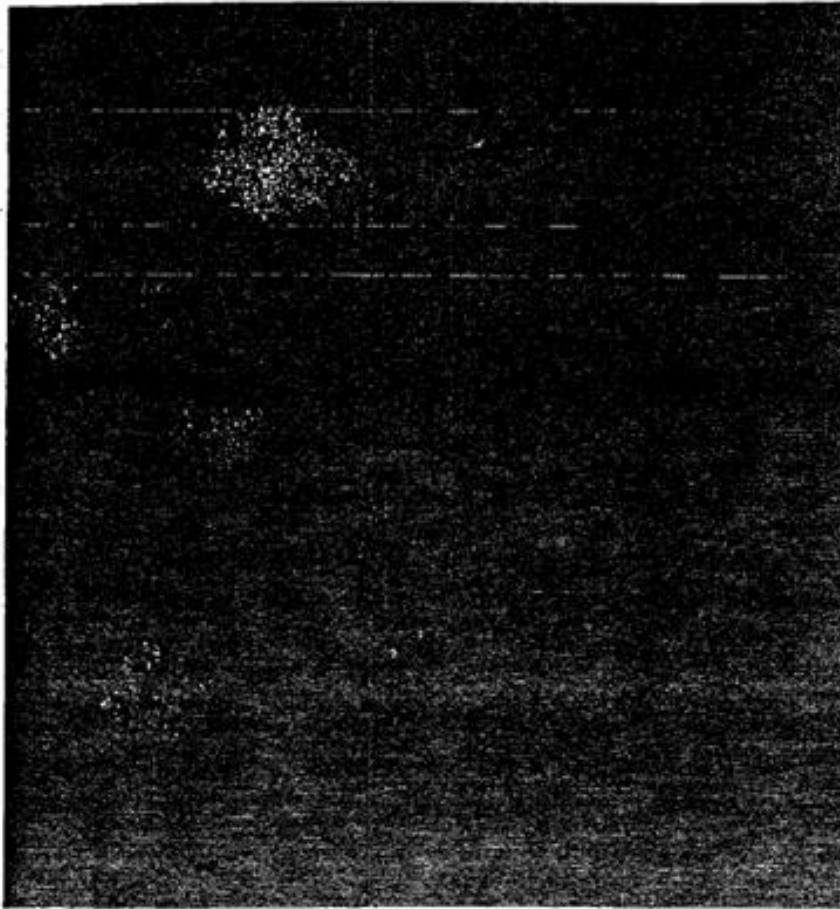


Figura 13a

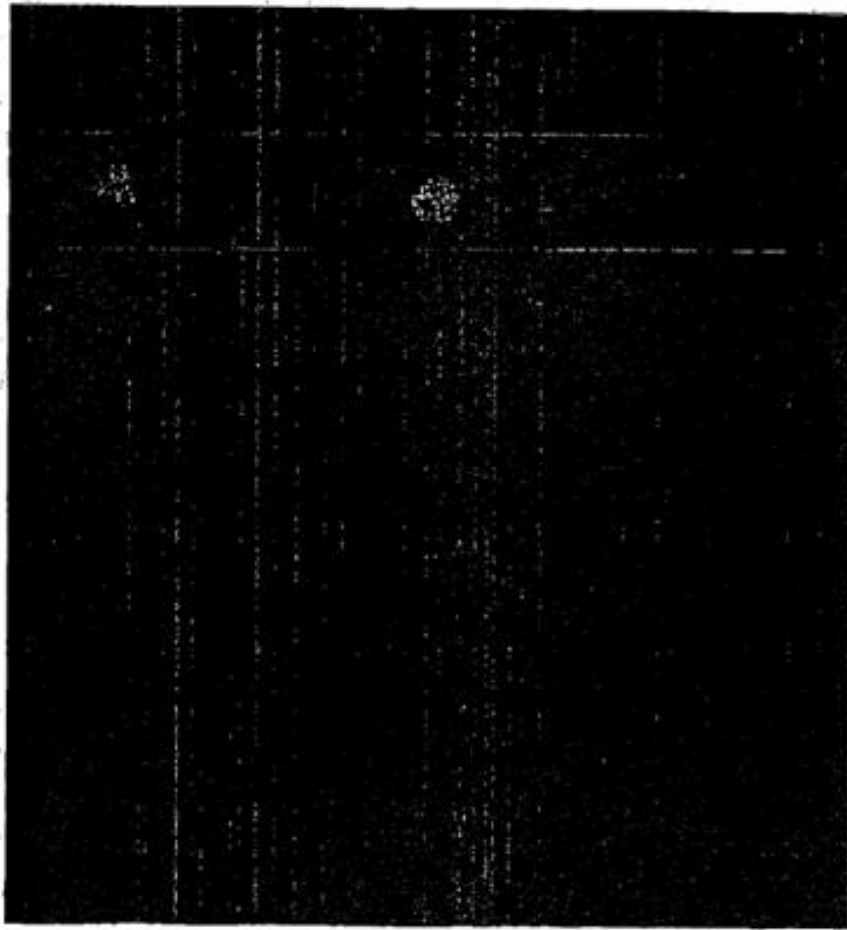


Figura 13b