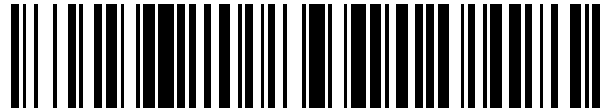


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 951**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/413 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2003 E 03728245 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 1490480**

54 Título: **Células madre hepáticas primitivas y proximales**

30 Prioridad:

15.03.2002 US 365361 P

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

13.05.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL (50.0%)

Office of Commercialization and Economic Development, 100 Europa Drive, Suite 430 Chapel Hill, NC 27517, US y VESTA THERAPEUTICS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

**REID, LOLA;
MOSS, NICHOLAS G.;
FURTH, MARK E.;
LUDLOW, JOHN W. y
BRUCE, ANDREW T.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 569 951 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 madre hepáticas primitivas y proximales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a células madre hepáticas humanas, células pluripotentes que dan lugar a células hepáticas maduras. Estas incluyen dos poblaciones de células madre: un progenitor muy primitivo, las células madre de la placa ductal, que dan lugar a células madre hepáticas proximales, las células madre proximales que dan lugar a los hepatocitos y las células biliares. La presente invención también se refiere a métodos para aislar las células madre hepáticas humanas de la placa ductal, y para aislar las células madre hepáticas proximales y los progenitores hepatocíticos comprometidos y los progenitores biliares comprometidos. Las composiciones que comprenden las
10 células de la presente invención se pueden usar para terapias celulares y génicas, y para el establecimiento de órganos bioartificiales.

Antecedentes de la invención

1. Anatomía del Hígado Humano

15 La unidad estructural y funcional principal del hígado maduro es el ácino, cuya sección transversal está organizada como una rueda alrededor de dos lechos vasculares diferentes: 3-7 grupos de tríadas portales (cada una con una vénula portal, arteriola hepática y un conducto biliar) en la periferia, y con la vena central en el eje. Las células hepáticas están organizadas como placas de células revestidas a ambos lados por endotelios fenestrados, que definen una serie de sinusoides que están contiguos a la vasculatura portal y central. Los datos recientes han indicado que los canales de Hering, pequeños conductos localizados alrededor de cada una de las tríadas portales,
20 producen conductillos minúsculos que se prolongan y se juntan en las placas hepáticas por toda 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 los endotelios de los hepatocitos a lo largo del sinusoide. Como resultado de esta organización, los hepatocitos tienen dos dominios basales, cada uno de los cuales está orientado hacia un sinusoide, y un dominio apical que está definido por la región de contacto entre hepatocitos adyacentes.
25 Los dominios basales entran en contacto con la sangre, y están implicados en la absorción y secreción de componentes del plasma, mientras los dominios apicales forman los canalículos biliares, especializados en la secreción de sales biliares, y están asociados por medio de una red de interconexión con los conductos biliares. La sangre fluye desde las vénulas portales y las arteriolas hepáticas a través de los sinusoides hacia las vénulas hepáticas terminales y la vena central.

30 Basándose en este patrón microcirculatorio, el ácino se divide en tres zonas: zona 1, la región periportal; zona 2, la región acinar media; y zona 3, la región pericentral. El potencial proliferativo, los criterios morfológicos, la ploidía y la mayoría de los genes específicos del hígado se correlacionan con la ubicación zonal (Gebhardt, R., et al. 1988. FEBS Lett. 241:89-93; Gumucio, J. J. 1989, Vol. 19. Springer International, Madrid; Traber, P. et al. 1988. Gastroenterology. 95:1130-43). Los gradientes de la concentración de los componentes sanguíneos, que incluyen el
35 oxígeno, a través del ácino y el seguimiento de la dirección del flujo sanguíneo desde las tríadas portales hacia la vena central, son responsables de parte de esta formación de zonas, por ejemplo la compartimentación recíproca de la glucólisis y la gluconeogénesis. Sin embargo, la formación de la zona periportal de la proteína de unión en hendidura conexina 26 y la formación de la zona pericentral de la glutamina sintetasa, por nombrar solamente dos, son insensibles a tales gradientes, son más representativas de la mayoría de genes específicos de tejidos, y parecen estar determinadas por factores intrínsecos a las células o a variables distintas del flujo sanguíneo en el
40 microambiente.

Además de hepatocitos, células epiteliales de los conductos biliares (colangiocitos) y células endoteliales, la región entre los tractos portal y central contiene otros tipos de células, tales como las células de Ito y las células de Kupffer. Estas desempeñan papeles prominentes en condiciones patogénicas del hígado, especialmente en la inflamación y la fibrosis, pero su contribución directa a las funciones homeostáticas principales del órgano normal es
45 aparentemente pequeña.

2. Desarrollo del Hígado Humano

El hígado se desarrolla como resultado de la convergencia de un divertículo formado del intestino anterior caudal y el septum transversum, parte del mesénquima esplácnico. La formación de las células hepáticas comienza después de
50 que el epitelio endodérmico interactúe con el mesodermo cardiogénico, probablemente por medio de factores de crecimiento de fibroblastos. Las células hepáticas especificadas proliferan y penetran después en el mesénquima del septum transversum con un patrón similar a un cordón, lo que forma el primordio hepático. La interacción epitelial-mesenquimatosa directa es crítica en estas etapas tempranas del desarrollo del hígado, y determina qué células se convertirán en hepatocitos o en colangiocitos, y los endotelios fenestrados, respectivamente. Las mutaciones de los genes *hlx* y *jumonji* específicos del mesénquima bloquean el desarrollo del hígado, lo que ilustra la importancia de
55 las contribuciones de este tejido. De manera temprana en su desarrollo, el hígado consiste en agrupamientos de células madre hepáticas proximales rodeadas por un endotelio continuo que carece de membrana basal y

abundantes células hematopoyéticas. A medida que el endotelio se transforma para convertirse en un endotelio discontinuo, fenestrado, la vasculatura, en especial 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 a medida que rodea las vénulas portales, arteriolas hepáticas y conductos biliares, se forman las triadas portales. Las células madre hepáticas proximales proliferan rápidamente y se forman las placas parenquimatosas, probablemente en respuesta a cambios en la cantidad y distribución de moléculas de organización de tejidos, tales como C-CAM 105, Agp110, E-cadherina y conexinas, que coincide con el traslado de la mayoría, pero no todas, las células hematopoyéticas hacia la médula ósea. Los estudios recientes sugieren que algunos progenitores hematopoyéticos persisten en el hígado de roedor adulto en reposo, y se han aislado células madre hematopoyéticas de hígado adulto humano y murino (Crosbie, O. M. et al. 1999. *Hepatology*. 29:1193-8).

El hígado de rata se forma en la vida embrionaria alrededor del día 10, denominado "día embrionario 10" o E10, con la invaginación del mesénquima cardiaco por endodermo localizado en la región del intestino medio del embrión (Zaret, K. 1998. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8:526-31). Se ha conseguido el reconocimiento más temprano de las células hepáticas en los embriones mediante el uso de estudios de hibridación *in situ* para mRNA que codifica la alfa-fetoproteína (AFP) (Zaret, K. 1998. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8:526-31; Zaret, K. 1999 *Developmental Biology* (Orlando). 209:1-10). Se observan células que expresan AFP en la región del intestino medio del embrión cerca del mesénquima que produce el corazón en los días 9-10 en todos los hígados de rata y de ratón ensayados. El hígado se hace visible macroscópicamente en E12, y tiene alrededor de 1 mm de diámetro en E13.

En paralelo, la hematopoyesis se da al aparecer las primeras células hematopoyéticas identificables en E15-E16 (en roedores) y del 3^{er} al 4^o mes (en humanos), y el nivel máximo de eritropoyesis (formación de células eritroides o glóbulos rojos) se da en E18 (en roedores) y en el 5^o-6^o mes (en humanos). En el nivel máximo de eritropoyesis, el número de estos glóbulos rojos domina en el hígado y representa más del 70% del número de células en el hígado. El final del período gestacional es en el día 21 en roedores, y 9 meses en humanos. En horas tras el nacimiento, el número de células hematopoyéticas disminuye drásticamente, de forma que en dos días de vida postnatal (roedores), y en una o dos semanas (humanos), la gran mayoría de las células hematopoyéticas ha desaparecido, y han migrado a la médula ósea. No se conoce la causa de la migración de las células hematopoyéticas. Sin embargo, existen dos especulaciones predominantes.

En primer lugar, los progenitores hematopoyéticos prefieren condiciones relativamente anaeróbicas, y la mayoría de ellos migra hacia la médula ósea (que es relativamente anaeróbica) al elevarse los niveles de oxígeno en el hígado con la activación de los pulmones. Además, se ha especulado que la pérdida de las hormonas del embarazo también puede ser un factor en la migración. De manera postnatal, la pérdida de los progenitores hematopoyéticos en el hígado se correlaciona con una reducción drástica del número de progenitores hepáticos y un incremento paralelo del número y la madurez de los hepatocitos y las células biliares. La madurez plena del hígado se completa en 2 a 3 semanas de vida postnatal (en roedores), y en unos cuantos meses (en humanos). En ese momento, las células progenitoras hepáticas restantes se localizan en las regiones de los canales de Hering, y el número predominante de ellas está presente en las triadas portales en la periferia de cada ácino hepático (Thiese et al, Crawford et al.).

Posteriormente se establece la arquitectura clásica del ácino hepático, y cada ácino se define periféricamente por seis grupos de triadas portales, y cada una tiene un conducto biliar, una arteria hepática y una vena hepática, y en el centro una vena central que conecta con la vena cava. Las placas de células hepáticas, como radios en una rueda, se prolongan desde la periferia hacia el centro. Por convención, las placas se dividen en tres zonas: La zona 1 está cerca de las triadas portales; la zona 2 es acinar media; 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 sugiere claramente un linaje madurativo que termina en un proceso apoptótico (Sigal, S. H., S. et al. 1995. *Differentiation*. 59:35-42).

3. Enfermedad Hepática

Cada año en Estados Unidos se hospitalizan alrededor de 250.000 personas por insuficiencia hepática. Los trasplantes de hígado son curativos para algunas formas de insuficiencia hepática, y se llevan a cabo aproximadamente 4100 trasplantes cada año en Estados Unidos. Uno de los factores limitantes en el trasplante de hígado es la disponibilidad de hígados de donantes, en especial dada la limitación de que los hígados de donantes para trasplante de órganos deben proceder de pacientes que hayan sufrido muerte cerebral, pero no paro cardiaco. Los hígados de cadáveres no han tenido éxito, aunque los esfuerzos recientes para usar tales donantes han apoyado la posibilidad de usarlos si el hígado se obtiene en una hora desde la muerte.

El trasplante de células en el hígado es una terapia alternativa atractiva para la mayoría de las enfermedades hepáticas. Los procedimientos quirúrgicos para el trasplante de células son de poca importancia respecto de los necesarios para el trasplante de órganos completos y, por lo tanto, se pueden usar para pacientes con diversos riesgos quirúrgicos, tales como la edad o la debilidad. El uso de células hepáticas humanas es superior a las células hepáticas derivadas de otros mamíferos, ya que los posibles patógenos, si los hay, son de origen humano, y los pacientes podrían tolerarlos mejor, y se podrían cribar fácilmente antes del uso.

Los intentos de llevar a cabo el trasplante de células hepáticas han usado células hepáticas maduras sin fraccionar, y han mostrado cierta eficacia (Fox, I. J. et al. 1998. New England Journal of Medicine. 338:1422-1426). Sin embargo, el éxito requiere la inyección de un gran número de células (2×10^{10}), ya que las células no crecen *in vivo*. Además, la introducción de un número sustancial de grandes células hepáticas maduras (diámetro celular medio de 30-50 μm) se complica por su tendencia a formar grandes agregados tras la inyección, lo que da como resultado émbolos potencialmente mortales. Además, estas células generan una respuesta notable de rechazo inmunológico, lo que fuerza a que los pacientes se mantengan en tratamiento con fármacos inmunosupresores durante el resto de sus vidas. Finalmente, no se han criopreservado con éxito células hepáticas maduras, y se necesita una logística compleja para coordinar la disponibilidad del tejido hepático adecuado, la preparación de suspensiones de células, y la administración inmediata de las células para las terapias clínicas.

4. Células Madre Totipotentes

Las células madre son una terapia alternativa basada en células para la enfermedad hepática. Las células madre totipotentes son células primitivas que se pueden auto-replicar, son pluripotentes, es decir, producen células hijas con más de un destino, y se pueden expandir considerablemente y pueden dar lugar a células madre determinadas que pueden reconstituir un tejido o tejidos. La mayoría de la bibliografía sobre las células madre procede de la bibliografía sobre embriones, o aquella sobre los tejidos hematopoyético, epidérmico o intestinal.

Más recientemente, se han modificado las definiciones para reconocer clases particulares de células madre. Aquellas con capacidad de 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 8 células (la mórula). Las células madre embrionarias, también denominadas células "ES", consisten en poblaciones celulares permanentes derivadas de células totipotentes normales en blastocistos, que se informaron por primera vez a principios de los años ochenta. Las líneas de células ES se pueden cultivar *in vitro* con el mantenimiento de la totipotencia. Cuando las células ES se inyectan de vuelta a blastocistos normales, son capaces de reanudar el desarrollo embrionario y de participar en la formación de un ratón normal, pero quimérico. Aunque se han establecido líneas de células ES de muchas especies (ratón, rata, cerdo, etc.), solamente se ha usado de manera rutinaria el sistema de ratón para generar animales con fenotipos nuevos (con expresión inactivada, transgénicos) fusionando células ES modificadas de cultivo con blastocistos, y después implantando los blastocistos en hospedadores pseudopreñados. Las líneas de células germinales embrionarias (EG), que muestran muchas de las características de las células ES, se pueden aislar directamente *in vitro* de la población de células germinales primordiales. Como con las células ES, las células EG contribuyeron a quimeras, lo que incluye la línea germinal, cuando se inyectaron en blastocistos.

Recientemente, experimentos muy publicitados han informado que se pueden establecer cultivos de células ES humanas a partir de embriones humanos. Se ha propuesto que estas células ES humanas se pueden inyectar en tejidos con la esperanza de que puedan reconstituir órganos y tejidos dañados. Sin embargo, las células ES y EG son tumorigénicas si se introducen en hospedadores inmunocomprometidos en cualquier localización distinta del útero, formando teratocarcinomas. Por lo tanto, el plan de inocular células ES humanas en pacientes no es realista, y tiene la grave posibilidad de crear tumores en los pacientes. Para superar este punto muerto, algunos grupos están dedicándose al proyecto de diferenciar las células ES en condiciones microambientales definidas para convertirlas en células madre determinadas que después se pueden inocular con seguridad a los pacientes. Por ejemplo, existe cierto grado de éxito en la generación de progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, sigue existiendo la preocupación de que las células ES residuales del cultivo pudieran plantear el riesgo de tumorigénesis, si los cultivos se inoculan a un paciente. En resumen, hasta que la investigación en la biología del desarrollo revele la miríada de controles que determinan los destinos de las células durante la embriogénesis, las células ES seguirán siendo una herramienta experimental con poca esperanza 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 está restringido a un número limitado de tipos de células.

5. Células Madre Determinadas

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 potencial de crecimiento extenso. Pruebas cada vez más numerosas, tales como la del campo de la telomerasa, sugieren que las células madre determinadas, en sentido estricto, no se autorreplican, es decir, su progenie puede tener menos potencial de crecimiento que el progenitor. Las células madre determinadas dan lugar a progenitores comprometidos, células hijas que pierden la pluripotencia restringiendo su potencial genético a un único destino, p.ej., hepatocitos, cuyos progenitores comprometidos se denominan progenitores hepatocíticos comprometidos. En el linaje hepático, existen progenitores hepatocíticos comprometidos (que dan lugar a hepatocitos) y progenitores biliares comprometidos (que dan lugar a conductos biliares).

Las transiciones desde la célula madre hasta las células adultas se dan en un proceso por etapas, que produce un linaje madurativo en el que el tamaño celular, la morfología, el potencial de crecimiento y la expresión génica están asociadas al linaje. La metáfora del envejecimiento es útil para definir el proceso. Las células "jóvenes" tienen una expresión génica temprana y el mayor potencial de crecimiento; las células tardías del linaje tienen una expresión

génica "tardía", y normalmente están limitadas en su crecimiento, o no crecen en absoluto. Las células tardías se pueden considerar "viejas" o, en términos biológicos, apoptóticas, y finalmente son desechadas. El proceso de linaje madurativo da como resultado una renovación natural para el tejido, y permite la regeneración tras lesiones. Los tejidos difieren en la cinética del proceso madurativo. El linaje madurativo del intestino es bastante rápido, y un ciclo completo se da en menos de una semana; el del hígado se da lentamente, y en el hígado de rata es de alrededor de un año.

Existe un gran interés clínico y comercial por aislar e identificar las células progenitoras inmaduras del hígado, debido al impacto que tal población de células puede tener en el tratamiento de las enfermedades hepáticas. El uso de progenitores hepáticos en las terapias celulares y génicas puede superar muchos de los defectos asociados al uso de las células hepáticas maduras descritas anteriormente. Las células son pequeñas (7-15 μm), y por lo tanto se minimiza la formación de grandes émbolos. Además, las células tienen un gran potencial de crecimiento, lo que significa que se necesitan menos células para la reconstitución del tejido hepático en un paciente. Finalmente, los progenitores tienen mínimos marcadores antigénicos que podrían provocar el rechazo inmunológico, lo que proporciona la esperanza de que se puedan necesitar pocos o ningún fármaco inmunosupresor.

6. Aislamiento de Progenitores Hepáticos

Se sabe que el aislamiento de progenitores hepáticos del hígado es una tarea que supone un gran reto, debido a la escasez de marcadores que seleccionen positivamente las células hepáticas. Los únicos anticuerpos disponibles para los candidatos de progenitores hepáticos son los anticuerpos monoclonales que se preparan contra subpoblaciones de progenitores hepáticos, denominados células ovals si se aíslan de hospedadores expuestos a agresiones oncogénicas. Estos anticuerpos, sin embargo, reaccionan en manera cruzada con los antígenos presentes en las células hematopoyéticas.

La expresión células ovals procede de una miríada de estudios en el campo de la carcinogénesis y la oncogénesis. Los animales expuestos a carcinógenos u otras agresiones oncogénicas experimentan una pérdida drástica de células hepáticas maduras (destruidas por las diversas agresiones) y, de manera secundaria, la expansión de células pequeñas (7-15 μm de diámetro) con núcleos ovalados y que albergan marcadores que comprenden antígenos hepáticos y hematopoyéticos (Grisham y Thorgeirsson, 1998). Los estudios con células ovals condujeron a las hipótesis de que son progenitores hepáticos que se desencadenan para expandirse en las condiciones de las agresiones oncogénicas, y que con las condiciones adecuadas pueden continuar hasta llegar a ser células tumorales. El fenotipo de las células ovals varía de maneras sutiles y no sutiles, dependiendo de la(s) agresión(es) oncogénica(s). Además, se sabe que se pueden establecer fácilmente en cultivo sin condiciones especiales de células de soporte o medios. (J. Grisham y S. Thorgeirsson, 1998, Hepatic Stem Cells, En: Stem Cells, C Potten, editor, Academic Press, NY). Basándose en estos hallazgos y en estudios que caracterizan algunas de las líneas celulares derivadas de los tratamientos oncogénicos, se comprendió que los tumores hepáticos son progenitores transformados de manera maligna, y que las células ovals son progenitores parcialmente o completamente transformados (Zvibel I, Fiorino A, Brill S, y Reid LM. Phenotypic characterization of rat hepatoma cell lines and lineage-specific regulation of gene expression by differentiation agents. Differentiation 63:215-223, 1999).

En el pasado se han hecho intentos de obtener la población de células progenitoras hepáticas propuesta como la población más versátil para la terapia celular y génica del hígado. Las pat. de EE.UU. n°s 5.576.207 y 5.789.246 (Reid et al.) utilizan marcadores superficiales celulares y citometría de flujo de dispersión lateral para proporcionar una subpoblación definida en el hígado. Se han aislado subpoblaciones de células hepáticas de rata mediante extracción de células comprometidas a un linaje, seguido de selección de precursores hepáticos inmaduros que se detectaron como células agranulares que albergaban marcadores celulares positivos para OC.3 (marcador antigénico de células ovals), positivos para AFP, positivos para albúmina y negativos para CK19 (citoqueratina 19). Las subpoblaciones de hígado de rata anteriores muestran características particulares importantes en el aislamiento y la identificación de progenitores hepáticos enriquecidos de hígado de roedor.

De esta manera, existe la necesidad de desarrollar métodos para aislar progenitores hepáticos humanos que se puedan usar para tratar pacientes con enfermedad o disfunción hepática. La presente invención satisface esta necesidad.

Compendio de la invención

La presente invención se dirige a una composición que comprende una célula madre hepática primitiva humana aislada, en la que dicha célula madre hepática primitiva aislada no expresa alfa-fetoproteína, expresa Ep-CAM y es un precursor para una célula madre hepática proximal, y dicha célula madre hepática proximal es capaz de dar lugar a un progenitor hepatocítico o un progenitor biliar, en la que dicha célula madre hepática primitiva aislada es una célula individual adulta.

La presente invención también se dirige a un método para aislar un progenitor hepático primitivo humano capaz de dar lugar a progenitores hepatocíticos o progenitores biliares, y el método comprende:

(a) proporcionar una suspensión de células derivadas de tejido hepático;

(b) aplicar dicha suspensión de células a una superficie de plástico;

(c) cultivar las células en condiciones que incluyen el uso de medio sin suero que comprende un regulador del metabolismo de carbohidratos, una fuente de hierro, y un factor de producción de membranas; y

(d) seleccionar las células que expresan Ep-CAM y que no expresan alfa-fetoproteína.

5 La presente invención se dirige además a una célula madre hepática primitiva humana aislada que no expresa alfa-fetoproteína y que expresa Ep-CAM y es capaz de dar lugar a progenitores hepatocíticos o progenitores biliares, en la que dicha célula madre hepática primitiva aislada es una célula individual adulta.

Además, la presente invención se dirige a un método para producir un medicamento para tratar una disfunción o enfermedad hepática que comprende mezclar una cantidad eficaz de dicha célula madre hepática primitiva humana con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 demuestra la formación de colonias en cultivo sobre plástico de células parenquimatosas fetales enriquecidas en el Día 1 de cultivo sobre plástico (Panel Superior) y Día 5 (Panel Inferior).

La FIG. 2 demuestra la formación de colonias en cultivo sobre plástico del Día 5 al Día 14.

15 La FIG. 3 demuestra el comportamiento de las colonias en el cultivo sobre plástico.

La FIG. 4 demuestra la tinción de las células de las colonias sobre plástico para albúmina (fila 1), CK19 (fila 2), ep-CAM (fila 3) y NCAM (fila 4).

La FIG. 5 demuestra la tinción para colonias cultivadas sobre plástico para CD146 y CD133 (superior), y AC133 (inferior).

20 La FIG. 6 demuestra un cultivo primario de células madre proximales después de 7 días sobre una capa de soporte de STO teñido para albúmina (fila 1), alfa-fetoproteína (fila 2), y CK19 (fila 3).

La FIG. 7 demuestra el desarrollo de una célula de una colonia retirada de un cultivo sobre plástico y colocada en placas sobre una capa de células de soporte STO.

Las FIGS. 8-11 demuestran la irrupción de células desde la colonia sobre una capa de soporte de STO.

25 Las FIGS. 12 y 13 demuestran el enriquecimiento de células que expresan AFP en células hepáticas humanas.

Las FIGS. 14-18 demuestran el aislamiento de una subpoblación de células de hígado humano adulto que co-expresan albúmina, CD133, y Ep-CAM.

30 La FIG. 19 representa la curva de crecimiento de 9 colonias de células madre de 3 hígados cultivadas sobre plástico a lo largo de un periodo de 3 semanas. Las medidas del crecimiento se iniciaron después de 12 días en cultivo. La curva muestra que las células crecen con un tiempo de duplicación de 5,2 días.

La FIG. 20 representa transferencias de Western de la expresión de albúmina (ALB, grupo superior) y de alfa-fetoproteína (AFP, grupo inferior) en células de hígado fetal recién aisladas y durante su cultivo posterior sobre un sustrato de plástico.

35 En el grupo de la izquierda, se muestran dos fracciones de células (P e I) basadas en una centrifugación a través de Ficoll. Las células que se sedimentan en el Ficoll se denominan P, y las células que forman capas en la interfase entre el medio acuoso y el Ficoll se denominan I. La transferencia individual del medio muestra la expresión de albúmina y AFP en las células de colonias purificadas (células madre hepáticas primitivas) cultivadas sobre plástico durante 3 semanas. El panel de la derecha muestra los carriles de control, en los que no hubo proteína (blanco), o patrones de albúmina (ALB) o alfa-fetoproteína (AFP). Se cargaron 10 µg de proteína en cada carril.

40 Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

En la descripción siguiente se usan ampliamente varios términos para describir la invención. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, lo que incluye el alcance a dar a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

45 CD: "Grupo de diferenciación" o "determinante común", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas de la superficie celular reconocidas por anticuerpos monoclonales. La expresión de algunos CDs es específica de las células de un linaje o ruta de maduración particular, y la expresión de otros varía según el estado de activación, la posición o la diferenciación de las mismas células.

Terapia Celular: Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "terapia celular" se refiere a la transferencia *in vivo* o *ex vivo* de poblaciones celulares definidas usadas como material autólogo o alogénico y trasplantadas a, o cerca de, una célula objetivo específica de un paciente. Las células se pueden trasplantar en cualquier medio, vehículo o diluyente adecuado, o cualquier tipo de sistema de administración de fármacos, que incluye los microportadores, esferas, microsomas, microesferas, vesículas, etc. También se pueden usar en un biorreactor en el que proporcionan funciones críticas, y el biorreactor se puede usar como un dispositivo de asistencia para pacientes con disfunción(es) hepática(s).

Progenitores Comprometidos: Células sumamente proliferativas que dan lugar a células hijas de un solo destino. Un "progenitor biliar comprometido" da lugar a conductos biliares y se puede reconocer antigénicamente por la expresión de citoqueratina 19, pero no AFP. Un "progenitor hepatocítico comprometido" da lugar a hepatocitos, y se puede reconocer antigénicamente por la expresión de AFP y albúmina, pero no citoqueratina 19. El proceso de compromiso no se comprende a nivel molecular. Más bien, se reconoce que ha ocurrido solamente de manera experimental cuando los destinos de las células se han estrechado desde el de un predecesor.

Terapia Génica: Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "terapia génica" se refiere a la transferencia *in vivo* o *ex vivo* de material genético definido a células objetivo específicas de un paciente, por lo que se altera el genotipo y, en la mayoría de las situaciones, se altera el fenotipo de las células objetivo con el propósito final de prevenir o alterar un estado patológico particular. Esto puede incluir modificar la célula objetivo *ex vivo* e introducir las células en el paciente. En manera alternativa, se puede dirigir un vector hacia las células progenitoras hepáticas *in vivo* para administrar el material genético exógeno y transfectar los progenitores. Además, se pueden usar células progenitoras modificadas genéticamente en un biorreactor como terapia para pacientes o como fuente de productos biológicos. Como indica esta definición, la premisa subyacente es que estos procedimientos genéticos terapéuticos están diseñados para prevenir, tratar o alterar finalmente una afección patológica manifiesta o encubierta. En la mayoría de las situaciones, el propósito terapéutico final de los procedimientos de terapia génica es alterar el fenotipo de la población celular objetivo específica.

Células Hepáticas: Una subpoblación de células hepáticas que incluyen hepatocitos y células biliares.

Progenitores Hepáticos: Una subpoblación de células madre, y estas células dan lugar finalmente a células parenquimatosas maduras que comprenden hepatocitos y células biliares. Los progenitores hepáticos incluyen las dos subpoblaciones siguientes: (a) células madre hepáticas y (b) progenitores comprometidos.

Células Madre Hepáticas: Una subpoblación de progenitores hepáticos, que incluyen "células madre hepáticas primitivas" y "células madre hepáticas proximales".

Precursor: Tal como se usa en la presente memoria, el término "precursor" se refiere a un primer tipo de célula que da lugar a un segundo tipo de célula. El precursor puede dar lugar directamente al segundo tipo de célula. El precursor también puede dar lugar al segundo tipo de célula a través de otro u otros tipos de células intermediarias.

Células Madre Hepáticas Primitivas: Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células madre hepáticas primitivas" se refiere a células madre hepáticas que dan lugar a células madre hepáticas proximales.

Células Madre Hepáticas Proximales: Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células madre hepáticas proximales" se refiere a células madre hepáticas que dan lugar a hepatocitos y células epiteliales biliares.

Células Hepáticas: Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células hepáticas" se refiere a todos los tipos de células presentes en el hígado normal, independientemente de su origen o destino.

Células Madre: Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células madre" se refiere a células sumamente proliferativas 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 las células embrionarias hasta la etapa de 8 células de un embrión de mamífero, tienen capacidad de autorrenovación (automantenimiento), en donde la célula madre produce una célula hija idéntica a sí misma. En contraste, las células madre determinadas, tales como las células madre hematopoyéticas, neuronales, cutáneas o hepáticas, son pluripotentes, y tienen una amplia capacidad de crecimiento, pero tienen una capacidad de autorrenovación cuestionable. En el caso de las células madre totipotentes, algunas células hijas son idénticas al progenitor, y algunas "se comprometen" hacia destino(s) específico(s), lo que limita su potencial genético al que es menor que el del progenitor. En el caso de las células madre determinadas, algunas células hijas conservan la pluripotencia y algunas la pierden, comprometiéndose a un único destino específico.

Cuando se usan los términos "uno", "un" o "una" en esta descripción, significan "por lo menos uno" o "uno o más", a menos que se indique de otra manera.

2. Marcadores de Diagnóstico para Linajes Hepáticos

La alfa-fetoproteína (AFP) y la albúmina, ambas proteínas citoplásmicas, son marcadores especialmente fiables para los linajes hepáticos cuando se ensayan como proteínas. Se expresan ARNs mensajeros que codifican formas

variantes de estas proteínas en los progenitores hematopoyéticos, pero no se traducen; por ejemplo, una forma variante de mRNA de AFP que difiere de la de las células hepáticas por la sustitución de las secuencias codificadas por el exón 1 con un exón 1 alternativo o dos exones (Kubota, Storm y Reid, presentado; también en solicitud de patente). Por lo tanto, la expresión de estas dos proteínas es el fundamento para la identificación de las subpoblaciones hepáticas de otros tipos de células en el hígado. En el hígado en desarrollo, se reconoce la presencia de AFP y albúmina como un buen indicador positivo de las células progenitoras hepáticas. En las etapas más tempranas del desarrollo del hígado, estas células son capaces de producir una descendencia que entra en los linajes biliar y hepatocítico. Si estas células hijas se comprometen hacia el linaje biliar, cesa la expresión de AFP. Sin embargo, la expresión de AFP persiste en el linaje hepatocítico hasta el período perinatal, cuando se inhibe, y queda la expresión de albúmina como una de las características principales del hepatocito adulto.

3. Procesamiento de Progenitores Hepáticos Humanos

El aislamiento de las células hepáticas normalmente implica la disociación enzimática y mecánica del tejido hasta suspensiones de células individuales, seguido del fraccionamiento con una centrifugación en gradiente de densidad, elutriación centrífuga, protocolos de digestión enzimática diferencial (es decir, células hepáticas estrelladas), y/o con selección mediante el uso de cultivo celular (revisado en Freshney, "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique" 1983, Alan R Liss, Inc. NY). Se puede obtener tejido hepático de un adulto (tras la pubertad). Se usa preferiblemente la centrifugación en gradiente de densidad para fraccionar y aislar las diferentes poblaciones celulares (p.ej., hepatoblastos).

4. Cultivo de Células Madre Hepáticas Proximales y Otros Progenitores

Las células madre hepáticas proximales y los progenitores hepáticos comprometidos necesitan células de soporte de estroma hepático embrionario y un medio sin suero complementado con una mezcla de hormonas y factores de crecimiento definidos [1-6]. Se puede dar la expansión clonogénica y el mantenimiento prolongado de marcadores clave de las células madre hepáticas proximales, de los progenitores comprometidos y de las células diploides de hígado adulto, si las células de soporte de estroma hepático embrionario se sustituyen por células de soporte STO en combinación con un medio sin suero definido hormonalmente complementado con insulina, transferrina/Fe, y preferiblemente hidrocortisona [7]. Dado que estas condiciones mantienen una diversidad de progenitores de tejido fetal e incluso la formación de colonias de células adultas diploides [7], son necesarias condiciones diferentes para seleccionar las células madre hepáticas primitivas.

5. Aislamiento de Células Madre Hepáticas Primitivas

La presente invención implica un método para aislar células madre hepáticas primitivas de tejido hepático humano que comprende aplicar una suspensión de células derivadas de tejido hepático, preferiblemente enriquecida en células parenquimatosas, a una superficie de plástico, y someter a las células a condiciones de cultivo rigurosas que eliminan las células hepáticas maduras, las células madre hepáticas proximales y los progenitores comprometidos. Las condiciones de cultivo rigurosas incluyen el uso de medio sin suero complementado con un regulador del metabolismo de carbohidratos, una fuente de hierro, un factor de producción de membranas, y preferiblemente un antioxidante.

Un regulador preferido del metabolismo de carbohidratos es insulina. Una fuente preferida de hierro es transferrina. Un factor de producción de membranas preferido es una composición que comprende uno o más lípidos, más preferiblemente, ácidos grasos libres. Un antioxidante preferido es selenio. El medio sin suero además está complementado preferiblemente con hidrocortisona. El tejido hepático se obtiene preferiblemente de un feto, un neonato, un lactante, un niño, un adolescente o un adulto, y lo más preferiblemente de un feto.

Las células madre hepáticas primitivas se aíslan cultivando la suspensión de células derivadas de hígado sobre una superficie de plástico a densidades celulares bajas (p.ej., 1000-2000 células/cm²). Las condiciones de cultivo rigurosas dan como resultado la aparición de células madre hepáticas primitivas de hígado humano que son precursores de células madre hepáticas proximales. Estas células madre hepáticas primitivas de hígado humano co-expresan Ep-CAM, AC133, CK8/18, CK19 y albúmina, y subpoblaciones de las mismas expresan N-CAM, CAM 5.2 y c-kit.

Alguien de experiencia en la técnica reconocerá que la presente invención se puede usar para aislar células primitivas de otros tipos de tejido.

6. Aislamiento de las Células Madre Hepáticas Proximales

Las células madre hepáticas proximales humanas dan lugar a hepatocitos o epitelios biliares, o combinaciones de los mismos. Las células madre hepáticas proximales humanas co-expresan Ep-CAM, CK8/18, citoqueratina 19, alfa-fetoproteína y albúmina, y subpoblaciones expresan AC133. Las células madre hepáticas proximales humanas se pueden aislar mediante diversos métodos, que incluyen (i) inmunoselección de células que co-expresan EP-CAM, (ii) cultivo de suspensiones de células derivadas de hígado, preferiblemente enriquecidas en células parenquimatosas, con un factor inductor del desarrollo, o (iii) cultivo de células madre hepáticas primitivas humanas con un factor inductor del desarrollo. El factor inductor del desarrollo lo proporciona preferiblemente una célula secundaria. Las

células secundarias preferidas incluyen una célula de soporte STO, una célula del estroma hepático embrionario o una célula endotelial.

8. Producción de Progenitores Hepáticos

5 La presente invención implica además un método para producir células madre hepáticas proximales y progenitores comprometidos a partir de células madre hepáticas primitivas que comprende colocar en placas directamente sobre células de soporte STO y en el HDM, o transferir las células madre hepáticas primitivas de colonias sobre plástico para cultivo a una capa de células de soporte STO, y permitir que las células madre hepáticas proximales surjan de las colonias de células madre hepáticas primitivas.

10 También se pueden producir células madre hepáticas proximales y progenitores comprometidos a partir de células madre hepáticas primitivas cultivando sobre superficies sin revestir, que incluyen placas de Petri (preferiblemente superficies de poliestireno sin carga), plástico para cultivo de tejidos (preferiblemente superficies de poliestireno expuestas a gas ionizante, de forma que el poliestireno está polarizado con una orientación preferente de cargas negativas (o positivas) hacia el lado al que se van a unir las células), microportadores (preferiblemente esferas de cultivo a las que se pueden unir las células), telas textiles (preferiblemente nailon, algodón, poliéster), estructuras sintéticas (preferiblemente hechas de polilactidas, poli(fumarato de propileno), poli(orto ésteres) u otros materiales sintéticos) o esponjas (preferiblemente esponjas naturales o sintéticas).

También se pueden producir células madre hepáticas proximales y progenitores comprometidos a partir de células madre hepáticas primitivas cultivando sobre superficies biológicas. Las superficies biológicas se pueden revestir o preparar sobre las superficies de las categorías anteriores. Así, por ejemplo, se pueden aplicar revestimientos de matriz extracelular sobre placas de Petri, plástico para cultivo de tejidos, microportadores o telas textiles. Las superficies biológicas usadas en la presente invención incluyen (i) matriz extracelular (una mezcla compleja de proteínas y carbohidratos producidos por las células y localizados fuera y entre las células, y que comprende colágenos, proteínas de adhesión, proteoglicanos y otras proteínas), (ii) componentes de la matriz extracelular (componentes de la matriz individuales, purificados, usados solos o en combinaciones para la optimización de la unión celular, el crecimiento y/o la expresión de función(es) específica(s) de tejido(s), que incluyen fibronectina, laminina, colágenos (existen más de 20 familias de colágenos) que incluyen colágeno tipo I, colágeno tipo III y colágeno tipo IV (estos tres son los usados más habitualmente hoy día en el cultivo de células), moléculas de adhesión celular o "CAMs", algunas de las cuales son dependientes de calcio y algunas no lo son, y proteoglicanos (moléculas que consisten en una proteína central a la que se unen una o más cadenas de glucosaminoglucanos, polímeros de una unidad dimérica de ácido glucurónico o ácido idurónico + un aminoazúcar). Estos incluyen proteoglicano de sulfato de condroitina, proteoglicano de sulfato de dermatano, proteoglicano de sulfato de heparitina, proteoglicano de heparano), (iii) extractos de tejidos enriquecidos en matriz extracelular, que incluyen Matrigel (un extracto de urea de un carcinoma embrionario murino trasplantable). Se puede revestir sobre cualquiera de las superficies proporcionadas en el grupo I)), ECM (extracción de células cultivadas mediante el uso de álcali diluido, detergente diluido, extracción a concentración salina elevada, urea, etc., y dejando un exudado enriquecido en componentes de la matriz extracelular que reviste la superficie (cualquiera de los del grupo I)), matriz de la membrana amniótica (extracción del amnios con álcali diluido, detergente diluido, extracción a concentración salina elevada, urea, etc., y dejando los componentes de la matriz presentes en el amnios) y biomatrix (extracción de tejido con concentración salina elevada (p.ej., NaCl >3 M) y nucleasas para dejar todos los colágenos del tejido y cualquier componente asociado, tal como proteínas de adhesión), (iv) revestimiento de suero (si se recubren placas de Petri o placas de cultivo de tejidos con suero, se añaden proteínas de adhesión, en especial fibronectina, presente a niveles elevados en el suero), y (v) polilisina o polileucina (el revestimiento con estos aminoácidos cargados positivamente se usa para unir de manera preferente las células epiteliales).

45 Los progenitores hepáticos producidos mediante la presente invención incluyen células madre hepáticas primitivas y proximales, progenitores hepatocíticos comprometidos y progenitores biliares comprometidos.

9. Aproximaciones Terapéuticas

50 Los progenitores aislados de la presente invención se pueden usar para la terapia celular y/o génica dirigida al hígado, o como células para ser hospedadores para la producción de virus (p.ej., hepatitis C) para generar vacunas. Además, los progenitores de la presente invención se pueden expandir *ex vivo* a partir de biopsias hepáticas (p.ej., biopsia en sacabocados), y las células expandidas se pueden usar para terapias celulares o génicas autólogas o alogénicas, o se pueden usar para sembrar biorreactores para crear hígados bioartificiales que se pueden usar clínicamente o para estudios académicos. Esto eliminaría la necesidad de resección quirúrgica invasiva mayor del hígado del paciente.

55 Una vez que los progenitores se establecen en cultivo, se puede llevar a cabo la transferencia génica mediante el uso de cualquiera de varios sistemas diferentes de vectores de administración de genes. Las características de crecimiento de los progenitores de esta invención permiten el uso en una transferencia génica *ex vivo* mediante el uso de ciertos vectores de administración de genes (es decir, vectores retrovirales) que necesitarán la proliferación celular para una inserción y expresión génica eficaz.

Un procedimiento alternativo para la terapia génica es diseñar vectores que seleccionen como objetivo específicamente los progenitores, y después inyectar el vector, acoplado con el gen de interés, directamente al paciente. Los vectores seleccionarían y modificarían la población de células progenitoras endógenas.

5 El progenitor de esta invención se puede usar en una terapia celular o génica autóloga o alogénica dirigida al hígado. Claramente, el uso de progenitores hepáticos autólogos eliminará una preocupación importante con respecto al rechazo de las células trasplantadas. Los progenitores de esta invención son especialmente atractivos para la transferencia de células alogénicas, ya que su perfil antigénico indica mínimos fenómenos de rechazo inmunológico.

10 Una vez que los progenitores autólogos o alogénicos se aíslan, purifican y cultivan, se pueden modificar genéticamente o pueden permanecer intactos, se pueden expandir *in vitro*, y después se pueden trasplantar de nuevo al hospedador. Si se desea la modificación genética, después de la modificación genética y antes del trasplante, las células modificadas genéticamente se pueden expandir y/o seleccionar basándose en la incorporación y la expresión de un marcador seleccionable dominante. El trasplante puede ser otra vez en el compartimento hepático o en un sitio ectópico o heterotópico. Para el trasplante en el compartimento hepático, se
15 podría usar infusión en la vena portal o inyección intraesplénica. La inyección intraesplénica puede ser la vía de administración de elección, ya que los progenitores hepáticos trasplantados por medio de una inyección intraesplénica se trasladan al compartimento hepático.

Otros procedimientos médicos pueden favorecer la eficacia del injerto hepático de los progenitores hepáticos trasplantados. Los modelos animales han demostrado que en la hepatectomía parcial, la administración de factores de angiogénesis y otros factores de crecimiento favorecen el injerto y la viabilidad de los hepatocitos trasplantados. Una aproximación alternativa es trasplantar los progenitores modificados genéticamente en un sitio ectópico.

Hasta la fecha ha habido problemas asociados a las aproximaciones de la terapia celular hepática, que incluyen la procedencia de las células, la incapacidad de criopreservar las células, la formación de émbolos y el rechazo inmunológico, etc. Los problemas asociados a las aproximaciones actuales de la terapia celular hepática se pueden
25 deber al hecho de que las células donantes que se usan son predominantemente células hepáticas adultas, y viven poco tiempo tras el aislamiento y la reinyección. Además, el uso de células adultas da como resultado un intenso rechazo inmunológico. Las células progenitoras de la presente invención ofrecen mayor eficacia debido a su capacidad limitada de generar fenómenos de rechazo inmunológico, su capacidad de ser criopreservadas, y por lo tanto ofrecer oportunidades para tipificar en ellas el tejido (y por tanto hacer coincidir las células donantes con el receptor), y ofrecer un producto "de fabricación estándar", y debido a su extenso potencial regenerativo.

Con respecto a la terapia génica, los esfuerzos en curso hacen uso de "vectores inyectables dirigidos", la vía más utilizada para las terapias clínicas en desarrollo. Estas aproximaciones han tenido una eficacia limitada debido a los problemas inmunológicos y la expresión transitoria de los vectores. La única vía para la terapia génica que se ha demostrado que merece mérito ha sido la terapia génica *ex vivo*, y se ha realizado casi exclusivamente en las
35 células progenitoras hematopoyéticas. Se predice que la terapia génica *ex vivo* con células progenitoras (o el uso de vectores inyectables de alguna manera dirigidos hacia esos progenitores) demostrará ser más eficaz, ya que los vectores se pueden introducir *ex vivo* en las células progenitoras purificadas; seleccionar las células modificadas y reintroducirlas *in vivo*. Las ventajas de las células progenitoras son su enorme potencial de expansión, su mínima inducción, si la hay, de reacciones inmunológicas, o la capacidad de tipificar su tejido y por lo tanto hacerlas coincidir con el fenotipo inmunológico del receptor, y su capacidad de diferenciarse para producir hepatocitos y células biliares.

10. Otros Usos

Los usos de las células madre hepáticas primitivas y proximales humanas son muchos y diversos. Incluyen: 1) investigación en células humanas; 2) producción de vacunas o antivirales; 3) estudios toxicológicos; 4) desarrollo de fármacos; 5) fabricación de proteínas (mediante el uso de las células como hospedadores para la producción de
45 diversos factores específicos humanos); 6) terapias celulares hepáticas; 7) terapias génicas hepáticas; y 8) hígados bioartificiales que se pueden usar en estudios de investigación, toxicológicos y antimicrobianos, fabricación de proteínas, o clínicamente como un sistema de asistencia para el hígado. Considerando la capacidad de las células madre hepáticas primitivas y proximales de diferenciarse en hepatocitos y células biliares, las células de la presente invención se pueden usar para destinos hepáticos o biliares, dependiendo del microambiente en el que se coloquen.

La disponibilidad de las células progenitoras hepáticas humanas (las cuatro categorías) permitirá una investigación mucho más exhaustiva en las células humanas, facilitará el desarrollo de formas eficaces de terapia celular y génica del hígado, y debería permitir el desarrollo de hígados bioartificiales humanos para el uso en investigación y como dispositivos de asistencia clínica. En la actualidad, el suministro limitado de tejidos humanos sanos impide los programas clínicos en la terapia celular del hígado o en hígados bioartificiales humanos. Las poblaciones de células progenitoras deberían tener un potencial de expansión suficiente para superar, o al menos aliviar en gran medida, ese suministro limitado. Además, estas células y sus descendientes inmediatos muestran una supervivencia preferente a la isquemia, en frío y en caliente, respecto de la observada con las células hepáticas maduras, lo que

significa que los hígados que no se pueden usar para el trasplante hepático o para producir células hepáticas maduras sanas son fuentes de células progenitoras.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)

5 Preparación de una Suspensión de Células Hepáticas a Partir de Tejido Fetal

Se obtuvo tejido hepático de fetos de una edad gestacional de 18-22 semanas mediante interrupciones electivas de la gestación. Las muestras de tejido hepático se enviaron durante la noche en RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal del 10%.

10 El volumen de tejido osciló de 2 a 12 mL después de un lavado preliminar en tampón de células (RPMI complementado con albúmina de suero bovino (fracción V de BSA, 0.1%, Sigma, St. Louis, Mo.), ácido selenioso (300 pM) y mezcla antimicrobiana, AAS (Gibco BRL/Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). Se subdividió el tejido hepático según fue necesario en fragmentos de 3 mL o menos para la digestión en 25 mL de tampón de células que contenía colagenasa tipo IV y desoxirribonucleasa (Sigma, St Louis, Mo.; ambos a 6 mg por mL). Se llevó a cabo la incubación a 32 °C con agitación frecuente durante 15 - 20 minutos, y dio como resultado una
15 suspensión homogénea de agregados celulares. La suspensión se hizo pasar después a través de un tamiz de calibre 40, y se centrifugó a 1200 RPM durante cinco minutos antes de la resuspensión en una disolución sin calcio de solución salina tamponada de Hanks complementada con EGTA (0.2 mM, Sigma), Hepes (20 mM, Boehringer Mannheim), BSA (0.1%, Sigma), DNasa (0.01%, Sigma), y se denominó HBSS mod.

20 La suspensión digerida enzimáticamente comprende subpoblaciones hematopoyéticas y hepáticas. Se muestra un perfil antigénico de la suspensión digerida enzimáticamente en la Tabla 1, y las células que expresan AFP son un 6-9% de la suspensión de células original (Figura 12), y con un porcentaje comparable de células que expresan albúmina junto con una contaminación significativa de células hematopoyéticas (véanse los porcentajes de células que expresan CD45 y glucoforina A en la Tabla 1). Si se criopreserva la suspensión de células original, se pierden algunas células, tales como las células eritroides, lo que enriquece las células que expresan albúmina y AFP hasta un 15-20% (Tabla 1). Sin embargo, el enriquecimiento más notable se da con la digestión enzimática parcial con colagenasa para proporcionar agregados de células parenquimatosas que se separan después de las células no parenquimatosas (flotantes) mediante centrifugación repetida a baja velocidad como se describe más adelante, y proporciona una suspensión de células que tiene más de un 80% de células que expresan albúmina y AFP (Tabla 1).

30 Las células hematopoyéticas (principalmente eritrocitos y eritroblastos) y las células no parenquimatosas flotantes se separaron después de la fracción de células parenquimatosas mediante centrifugación repetida a velocidad lenta a 30 g (300 RPM) durante cinco minutos en HBSS mod. El sedimento se resuspendió y se volvió a centrifugar en 40 ml de HBSS mod, hasta que el color mostró una contaminación mínima con glóbulos rojos. Normalmente, como informaron otros, esto requirió cuatro o cinco ciclos de centrifugación y resuspensión [14, 15]. Se minimizó la agregación mediante una segunda ronda de digestión enzimática en disolución reciente de colagenasa seguido de tamizado a través de una malla de nailon de 50 µm, y la vuelta de las células a un tampón sin calcio.

40 La suspensión de células resultante se lavó dos veces y después se colocaron por capas alícuotas de 5 mL, que contenían cada una alrededor de 2×10^7 células, sobre 5 mL de Ficoll Hypaque (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) en tubos Falcon de 50 mL, y se centrifugaron a 3000 RPM durante 20 minutos. Las células de la interfase y el sedimento se resuspendieron por separado en medios de siembra (complementados con RPMI), y se tiñó una alícuota de cada uno con azul de tripano para la enumeración y el estudio de la viabilidad con un hemocitómetro. La viabilidad celular fue de manera rutinaria mayor del 95 por ciento. El método de centrifugación a baja velocidad para el enriquecimiento de las células parenquimatosas eliminó los constituyentes hematopoyéticos, lo que dejó una suspensión de células que tuvo aproximadamente un 80% de células que expresaban AFP. La mayoría de las
45 células que expresan AFP son células madre hepáticas proximales, dado que expresan AFP, albúmina y CK19, pero no marcadores hematopoyéticos (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis Mediante Citometría de Flujo en Células de Hígado Fetal Recién Aisladas

Marcador	Localización	% Positivo en la Suspensión de Células Original, OCS (% en C-OCS)	% Positivo en la Preparación Enriquecida de Células Parenquimatosas
AFP	Citoplasmática	6,4±0,8% (~15-20%)	75.5%
Albúmina	Citoplasmática	9,3% (~15-20%)	>80%
CD45	Superficie	1,4%±0,4	
Glicoforina A	Superficie	>50% (37,5±9%)	Insignificante

CD34	Superficie	(2,7±0,5%)	
CD38	Superficie	(1,2±0,3%)	
CD14	Superficie	3,0±	
CD 117 (c-kit)	Superficie	~1%	
Ep-CAM	Superficie	n.d.	
CD146	Superficie	n.d.	
N-CAM	Superficie	n.d.	
CAM-5.2	Superficie	n.d.	
PE-CAM	Superficie	n.d.	
CD133	Superficie	n.d.	
Citoqueratina 19	Citoplasmática	n.d.	
Citoqueratina 8/18	Citoplasmática	n.d.	

OCS= suspensión de células original; C-OCS= la suspensión de células original se criopreservó en un tampón patentado. Las células se descongelaron más tarde y después se analizó la expresión de los marcadores. Varias células, en especial las células eritroides (subpoblación enucleada), no sobreviven a la criopreservación. Preparación de células parenquimatosas= tras la eliminación de las células eritroides y de otras células no parenquimatosas flotantes mediante centrifugación repetida a baja velocidad; n.d. = no determinado

Ejemplo 2

Preparación de una Suspensión de Células Hepáticas a Partir de Tejido Adulto

5 Se obtuvo un hígado humano de una organización de adquisición de órganos autorizada. El donante fue una niña de 13 años que había sufrido muerte cerebral. El hígado se digirió mediante el uso de una técnica de perfusión de órganos completos. Después se fraccionó la suspensión de células individuales para obtener células viables mediante el uso de un gradiente de Optiprep de 2 etapas (9-12,5%) en un lavador de células Cobe 2991. Las células vivas se separaron después de las células muertas residuales mezclando volúmenes iguales de las células fraccionadas al 9% (banda 1) y 12,5% (banda 2) individualmente con Optiprep del 25% para el fraccionamiento adicional en el Cobe 2991. Basándose en el análisis mediante citometría de flujo de los parámetros de dispersión 10 frontal y lateral, la composición celular de la banda 1 y de la banda 2 pareció similar. Las células se criopreservaron.

Ejemplo 3

Formación de Colonias a Partir de Células de Hígado Humano Adulto

15 Para estudiar la presencia de células madre hepáticas mediante formación de colonias, las células del Ejemplo 2 se descongelaron y se colocaron en placas a una densidad de 12.500 células vivas/pocillo en una placa de 6 pocillos, por triplicado, sobre una capa de células de soporte STO-5. El medio de cultivo de tejidos usado fue DMEM F12 que contenía penicilina/estreptomina (50 U/ml/50 µg/ml), albúmina de suero bovino (0,2%, p/v), transferrina (10 µg/ml), ácidos grasos libres (7,6 µEq/L), nicotinamida (4,4 mM), selenio (3×10^{-8} M), cobre (1×10^{-6} M), 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M), L-glutamina (2 mM), insulina (5 µg/ml), hidrocortisona (10^{-7} M), con o sin la adición de factor de crecimiento epidérmico.

20 Las células se cultivaron durante 5 días, se fijaron, y se contaron las colonias visualizadas mediante microscopía óptica. No se observaron colonias en ningún pocillo de las células sin fraccionar. Esto se puede deber a los efectos inhibitorios de las células muertas o moribundas, o a otro componente de la preparación celular antes de la centrifugación en el gradiente de Optiprep. Sin embargo, se observaron colonias de las fracciones celulares de la banda 1 y banda 2. Se observaron 8 colonias en total en los 3 pocillos que contenían células de la banda 1 (4 del medio +EGF, 4 del medio -EGF), y se observaron 13 colonias en total en los 3 pocillos de la banda 2 (11 del medio +EGF, 2 del medio -EGF). La frecuencia global de las células formadoras de colonias calculada para este 25 experimento fue del 0,03%.

Ejemplo 4

Co-Expresión de Albúmina, CD133 y Ep-CAM en una Subpoblación de Células de Hígado Humano Adulto

30 Se aislaron células de hígados de donantes básicamente como se describió en el Ejemplo 2. La presencia de células que expresaban el antígeno de superficie celular CD45, o antígeno común de leucocitos, una tirosina fosfatasa

expresada de manera generalizada en los glóbulos blancos (leucocitos), se determinó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-CD45. Aproximadamente un 17 por ciento de las células fueron positivas para CD45 (Figura 14A). Las células positivas para CD45 se redujeron mediante clasificación magnética de células, con el uso del anticuerpo monoclonal anti-CD45 y MicroEsferas MACS super-paramagnéticas y el autoMACS, un clasificador de células magnético automatizado de sobremesa. Tanto el anticuerpo marcado con esferas magnéticas como el instrumento fueron suministrados por Miltenyi Biotec. Las células positivas para CD45 también se podrían haber reducido mediante "lavado selectivo", clasificación de células activadas por fluorescencia, u otros modos de inmunoselección negativa. Tras la reducción, la fracción de células positivas para CD45 que quedaron en la preparación de células hepáticas se redujo hasta aproximadamente el 1 por ciento (Figura 14B). La reducción de células positivas para CD45 facilita el análisis posterior de los antígenos de los hepatocitos y los progenitores hepáticos y las células madre. También debería facilitar el aislamiento de poblaciones enriquecidas de estas células.

a. Albúmina

Tras la reducción de las células positivas para CD45, se analizó la expresión de albúmina de suero humano en una muestra de las células hepáticas. Las células se fijaron con paraformaldehído, se permeabilizaron mediante tratamiento con detergente Triton X-100 del 0,2%, y se tiñeron mediante incubación secuencial con un anticuerpo monoclonal IgG₁ de ratón marcado con el colorante fluorescente A647, y anticuerpos de cabra purificados por afinidad contra la inmunoglobulina G₁ (IgG₁) de ratón marcados con el colorante fluorescente A647. Se determinó la tinción de fondo y la autofluorescencia de las células mediante el uso de una proteína purificada de mieloma de ratón (también una IgG₁) sin actividad de unión específica a antígenos humanos, en lugar del anticuerpo monoclonal anti-albúmina. Aproximadamente un 97,5 por ciento de las células fueron positivas para albúmina (Figura 15A). El acotamiento de subpoblaciones para la tinción positiva (contorno rojo) se determinó mediante comparación con el control de proteína de mieloma de ratón (no mostrado).

Se puede usar la medición mediante FACS de la dispersión frontal y dispersión lateral de luz para caracterizar las poblaciones celulares. Las dispersiones frontal y lateral son principalmente funciones del tamaño celular y de la complejidad estructural intracelular, respectivamente. Como se muestra en la Figura 15B, la población celular positiva para albúmina del hígado humano adulto comprende una clase mayoritaria de células con dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) relativamente elevadas. El análisis del tamaño y la morfología, así como de marcadores bioquímicos y antigénicos adicionales (no mostrados), muestra que estas células tienen propiedades coherentes con hepatocitos maduros pequeños (tamaño medio de aproximadamente 18-22 micrómetros de diámetro). Los hepatocitos más grandes (aproximadamente > 30 micrómetros de diámetro) del hígado humano adulto normal están aparentemente sub-representados en las preparaciones, probablemente debido a la mayor susceptibilidad a la muerte durante el periodo entre la recogida del órgano y la perfusión, y/o la mayor susceptibilidad al daño durante el procedimiento de aislamiento. Sin embargo, la Fig. 15B también muestra que, además de los hepatocitos maduros pequeños, muchas células caracterizadas por una dispersión frontal y lateral menor también expresan albúmina. Las pocas células negativas para albúmina (aproximadamente un 2,5 por ciento) de la preparación muestran casi exclusivamente dispersión frontal y lateral muy baja (Fig. 15C). Estas pueden ser células muertas, o células muy pequeñas, tales como precursores de etapa tardía de glóbulos rojos.

b. CD133

El antígeno CD133 (AC133) es una glucoproteína de la superficie celular de 120 kilodaltons que tiene cinco dominios transmembrana. La proteína es similar u ortóloga a la proteína de ratón prominina. El antígeno CD133 humano se identificó originariamente en un subgrupo de progenitores tempranos, que incluyen células madre, en el linaje de células formadoras de sangre (hematopoyéticas). Algunas otras células inmaduras expresan CD133, que incluyen el epitelio en desarrollo en embriones humanos (semana 5), los precursores de células endoteliales y los progenitores neuronales o las células madre. También se ha informado la expresión de CD133 en ciertos tumores humanos y líneas celulares derivadas de tumores, tales como retinoblastomas y la línea de carcinoma de colon CaCo-2. La proteína se halla concentrada de manera preferente en profusiones de membranas plasmáticas, tales como las microvellosidades. Cuando se halla en las células epiteliales, se localiza de manera preferente en la superficie de membrana apical, pero no en la vasolateral. Los estudios previos, en particular mediante inmunohistoquímica, no han podido demostrar la expresión de la proteína CD133 en el tejido epitelial humano adulto, a pesar de la presencia de ARN mensajero detectable para la proteína en muchos tejidos humanos, que incluyen el hígado adulto.

Se usó una tinción con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia y análisis mediante FACS para buscar las células que expresaban el antígeno CD133 en las preparaciones de células de hígado humano adulto reducidas en CD45. Sorprendentemente, a la luz de los anteriores informes negativos, se observó que una mayoría de las células hepáticas reducidas en CD45 (véase la Fig. 14B) muestran una tinción positiva para CD133. La Fig. 16A revela aproximadamente un 58 por ciento de células positivas para CD133 en una preparación de hígado de un individuo infantil (de dos años). La presencia de una población sustancial de células positivas para CD133, que incluyen células del tamaño de pequeños hepatocitos maduros, se ha observado en preparaciones de células de otros individuos, que incluyen adultos. La población positiva para CD133 (caja superior de la Fig. 16A), comprende aproximadamente la mitad de las células de la preparación identificada como hepatocitos maduros (pequeños), basándose en la dispersión de luz lateral (Fig. 16A) y la dispersión de luz frontal (no mostrada). También comprende

muchas células que son más pequeñas y distintas morfológicamente de los hepatocitos maduros, a juzgar por la dispersión de la luz.

Se puede usar la clasificación celular magnética para seleccionar positivamente las células hepáticas que expresan CD133. La Figura 16B muestra el enriquecimiento de células positivas para CD133 hasta aproximadamente un 75% de las células recuperadas después de un ciclo de clasificación magnética mediante el uso del instrumento autoMACS (Miltenyi Biotec). El uso de cantidades mayores de MicroEsferas MACS acopladas a anticuerpos y el ajuste de las condiciones de clasificación [insertar mención a tal efecto - ¿debería ser sencillo para un "experto en la técnica"?] debería permitir el aislamiento de poblaciones de células positivas para CD133 sumamente enriquecidas con un rendimiento casi cuantitativo. {También nótese que se pueden usar otros métodos de inmunoselección positiva para enriquecer las células positivas para CD133}. A juzgar por la dispersión lateral (Fig. 16B) y la dispersión frontal (no mostrada), las células positivas para CD133 enriquecidas comprenden todas las subpoblaciones de CD133 identificadas en la preparación de células hepáticas reducidas en CD45.

c. Ep-CAM

La molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM, también conocida como GA733-2, CO17-1A, EGP40, KS1-4 y KSA), es una glucoproteína implicada en la adhesión célula-célula homofílica, independiente de iones de calcio. La proteína se expresa en muchos tejidos epiteliales humanos, y parece estar elevada sustancialmente en las células epiteliales en proliferación, lo que incluye las células tumorales. C.J. de Boer y sus colegas informaron que en el hígado humano embrionario de 8 semanas la mayoría de los hepatocitos expresan proteína Ep-CAM detectable [de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. (1999). "Expression of Ep-GAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver," *Journal of Pathology* 188:201-6]. En contraste, en el hígado humano adulto normal, no pudieron detectar la expresión de Ep-CAM en los hepatocitos, e informaron que solo las células epiteliales del conducto biliar se tiñen positivamente para este antígeno. Finalmente, se detectó el antígeno en células identificadas como precursores hepáticos en situaciones en las que se indujo la regeneración y reparación del hígado mediante cirrosis biliar, y en células de ciertos tumores hepáticos, en particular colangiocarcinomas.

Mediante análisis FACS se detectó sistemáticamente una población menor de células positivas para Ep-CAM en preparaciones de células hepáticas humanas sin fraccionar de niños y adultos. La población positiva para Ep-CAM comprende aproximadamente del 0,4 al 2,5 por ciento de las células. Como se muestra en la Figura 17, también se pueden observar células positivas para Ep-CAM en poblaciones de células hepáticas después de la reducción de > 95 por ciento de las células positivas para CD45. La Fig. 17B muestra las células positivas para Ep-CAM de dicha preparación de hígado humano (0,57 por ciento en la región de la gráfica acotada como se muestra mediante el contorno rojo, en comparación con el 0,15 por ciento en la misma región acotada para un anticuerpo de control que no tiñe ningún antígeno humano conocido, Fig. 17A; así, aproximadamente un $0,57 - 0,15 = 0,42$ por ciento de las células son positivas para Ep-CAM). El análisis de doble marcador (datos no mostrados) demuestra que la gran mayoría de las células positivas para Ep-CAM en la población reducida en CD45 son, como se esperaba, negativas para CD45. Sin embargo, parece que algunas de las células positivas para CD45 (aproximadamente el 1 por ciento) en las preparaciones de hígado humano también expresan Ep-CAM (datos no mostrados).

d. Co-expresión de Ep-CAM, CD133, y Albúmina

Se buscaron células hepáticas de hígado humano adulto que expresasen Ep-CAM y CD133. Se incubaron células con anticuerpos monoclonales hacia CD133 y Ep-CAM, cada uno conjugado directamente con un fluorocromo diferente. Como se muestra en la Fig. 17C, aproximadamente un 42 por ciento de las células en esta preparación particular de células de hígado humano adulto reducidas en CD45 se tiñeron de manera detectable para CD133. (El grado un poco menor de tinción de CD133 en este caso en comparación con el experimento mostrado en la Fig. 16A puede ser el resultado de diferencias reales entre preparaciones de células hepáticas de diferentes donantes como consecuencia de la edad u otras variables, o de variaciones sin identificar en la técnica experimental). Entre las células de la población que se tiñeron intensamente para Ep-CAM (mostradas dentro del límite rojo en la Fig. 17B), alrededor del 70 por ciento se tiñeron también positivamente para CD133 (Fig. 17D). Así, en esta preparación de hígado particular, aproximadamente un 0,3 por ciento del total de las células negativas para CD45 co-expresaron Ep-CAM y CD133.

La preparación de células usada para el experimento mostrado en la Fig. 17 fue idéntica a la usada en el análisis de la expresión de albúmina mostrada en las Figs. 14 y 15. Como se indicó anteriormente, aproximadamente un 97,5 por ciento de las células de la población de células reducidas en CD45 se tiñeron positivamente para albúmina, y las pocas células negativas para albúmina exhibieron un patrón diferente de baja dispersión frontal y lateral. Como se muestra en la Fig. 17E, prácticamente todas (aproximadamente un 99,5 por ciento) las células que se descubrió que co-expresaban CD133 y Ep-CAM mostraron una dispersión de luz frontal y lateral características de las células positivas para albúmina; se hallan completamente fuera de la región limitada de la gráfica de dispersión frontal frente a la dispersión lateral que contiene todas las células negativas para albúmina (véase la Fig. 15C). Así, las células de hígado humano postnatal que co-expresan Ep-CAM y CD133 también expresan albúmina de suero humano.

e. Co-Enriquecimiento de Células que Expresan CD133 y Ep-CAM

Como se muestra en la Fig. 16B, la inmunoselección positiva, tal como la clasificación celular magnética, permite el enriquecimiento de las células positivas para CD133 de preparaciones de células hepáticas humanas. Se estudiaron las células en la población de partida (ya reducidas en CD45) y la preparación enriquecida en CD133 en función de la expresión de Ep-CAM. La Fig. 17A muestra que por lo menos el 1,1 por ciento (acotado estrechamente a propósito) de la población de partida expresó Ep-CAM. Después del enriquecimiento de las células positivas para CD133, la población resultante (Fig. 5B) contiene al menos un 4,5 por ciento de células positivas para Ep-CAM. Esto confirma la co-expresión de CD133 y Ep-CAM en una subpoblación de células de hígado humano adulto, y demuestra que estas células se pueden enriquecer mediante inmunoselección positiva. El análisis de la dispersión frontal y lateral (como en el experimento de la Fig. 17) por las células que co-expresan los dos antígenos de superficie muestra de nuevo que casi el 100 por ciento de estas células también deben ser positivas para albúmina.

Las células de hígado humano adulto descritas anteriormente co-expresan albúmina, un marcador prototípico del linaje de hepatocitos, junto con CD133 o Ep-CAM, y por lo tanto tienen el mismo perfil fenotípico de ciertas células madre hepáticas de hígado fetal humano que se describen en la presente memoria. Además, las células de hígado humano adulto descritas en la presente memoria son células hepáticas de un tamaño menor que los hepatocitos maduros (incluso los "hepatocitos pequeños" de 18-22 micras de diámetro). En conjunto con el hallazgo de que el hígado humano adulto contiene células capaces de formar colonias en condiciones que definen operacionalmente las células madre hepáticas (es decir, en medio sin suero con células de soporte STO), la co-expresión de albúmina, Ep-CAM y CD133 demuestra la presencia de dichas células madre en el hígado adulto. Se pueden usar los métodos de inmunoselección positiva descritos en la presente memoria para aislar células que expresan simultáneamente los dos marcadores superficiales, Ep-CAM y CD133, para obtener poblaciones sumamente enriquecidas de células madre hepáticas de hígado humano, que incluyen tejido derivado de un niño o un adulto.

Ejemplo 5

Cultivos Primarios de Células Madre Hepáticas Proximales sobre Capas de Células de Soporte STO

La mayoría de los progenitores hepáticos, a excepción de las células madre hepáticas primitivas, no sobreviven mucho tiempo al co-cultivarlas con células de soporte estromales de hígado embrionario; las células de soporte de hígados neonatales, hígados adultos o diversos tejidos adultos no tuvieron éxito (Sigal et al, 1994; Brill et al, 1995; Sigal et al, 1995; (Brill S, Zvibel I, y Reid LM. Expansion conditions for early hepatic progenitor cells from embryonal and neonatal rat livers. Digestive Diseases and Sciences 44:364-371, 1999). Las células de soporte estromales de hígado embrionario se pueden sustituir por células STO, una línea de células estromales embrionarias usadas como células de soporte de rutina para células madre embrionarias, y que se descubrió que mantienen la expansión clonogénica de las células madre hepáticas de roedor normales recién aisladas y las células diploides de hígado de rata adulta (Kubota y Reid, 2000). Se descubrió que estas condiciones también son esenciales para todos los progenitores de hígado fetal humano, con la excepción de la célula madre hepática primitiva que se expandiría con y sin las células de soporte. También se ha demostrado que las células de soporte STO son eficaces para los progenitores hepáticos de hígados humanos neonatales y adultos. No se conocen los factores aportados por las células de soporte estromales embrionarias, esenciales para los progenitores.

Se expandieron células de soporte STO, originariamente de la ATCC, a partir de células de reserva en matraces de 75 cm en DMEM/F12 (Gibco/BRL/InVitrogen Corporation, Carlsbad, California) complementado con suero bovino fetal, FBS, del 10% (Hyclone, Logan, UT) y DMSO del 1% (Sigma, St. Louis, Mo.). Después de tres pases para proporcionar nueve matraces confluentes, las células se trataron durante 2 horas con 10 µg/mL de mitomicina C (Sigma, St. Louis, Mo; también, Biomol, Plymouth Meeting, PA), para inducir la detención del ciclo celular, y se lavaron dos veces con medio de cultivo. Las células se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de criopreservación (DMEM/F12 del 50%, FBS del 40%, DMSO del 10%) antes de congelarlas en alícuotas de 1 mL de 5×10^6 células, y se almacenaron a -80 °C. Se prepararon células de soporte sembrando 6×10^4 células descongeladas/cm² en placas de cultivo pre-revestidas con gelatina del 0,1% (Sigma, St. Louis, Mo). Los protocolos detallados descritos en [16] se incorporan en la presente memoria como referencia.

Las células que se pasaron a células STO se cultivaron en un medio sin suero, hormonalmente definido (HDM) que comprendía RPMI 1640 (GIBCO/BRL/InVitrogen Corporation, Carlsbad, California) complementado con albúmina de suero bovino del 0,2% (Fracción V sin ácidos grasos, Sigma, St. Louis), insulina (5 µg/ml), transferrina/Fe (10 µg/ml), selenio (3×10^{-8} M), 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M), una mezcla compleja de ácidos grasos libres (7,6 µEq; [16, 17]), hidrocortisona (10^{-7} M), glutamina (2 mM), nicotinamida (4 mM) y AAS (penicilina, 1000 µg/mL, estreptomina, 100 µg/ml, y anfotericina B 250 ng/mL, Sigma). Preferiblemente, no se usaron ni citocinas ni factores de crecimiento hepático clásicos (p.ej., factor de crecimiento epidérmico, EGF, factor de crecimiento de hepatocitos, HGF, ni factores de crecimiento similares a insulina, IGFI e IGFI).

Se sembraron en placas cultivos primarios de células parenquimatosas dispersadas y enriquecidas del Ejemplo 1 sobre una capa de células de soporte STO, y produjeron agregados estables de células madre hepáticas proximales que expresaron albúmina, AFB y CK19. La tinción celular típica para albúmina, AFP y CK19 se muestra en las

Figuras 6a-6c. Estas células también fueron positivas para CK8/18. A diferencia de las células cultivadas sobre un sustrato de plástico como se describe en el Ejemplo 6, las células madre hepáticas proximales sembradas sobre células de soporte STO conservaron una morfología coherente y mantuvieron la expresión de AFP durante varias semanas. Debido a que estas condiciones mantienen tanto a las células madre hepáticas proximales como a células más diferenciadas, que incluyen las células diploides de hígado adulto ([7]), el co-cultivo con células de soporte STO demostró ser inadecuado para la selección de células formadoras de colonias realmente primitivas.

Ejemplo 6 (ejemplo de referencia)

Selección de Células Madre Hepáticas Primitivas

La suspensión enriquecida de células parenquimatosas del Ejemplo 1 se colocó en placas a una densidad de 2000-5000 células/cm² sobre plástico para cultivo de tejidos en un medio sin suero complementado con lípidos, insulina y transferrina/Fe (HDM). Durante las primeras 12 horas tras la colocación en placas, el medio contuvo FBS del 10% para estimular la unión de las células, tras lo cual los cultivos se mantuvieron sin suero. Se realizaron cambios del medio a intervalos de tres días.

Inmediatamente tras la unión, las células predominantes presentes en el cultivo fueron células madre hepáticas proximales y progenitores comprometidos, agregados de células con una morfología celular parenquimatosa clásica, y con expresión de albúmina, AFP y/o CK19; las células madre hepáticas proximales mostrarán expresión de albúmina, AFP y CK19 (Figura 2a). Después de varios días, las células madre hepáticas proximales y los progenitores comprometidos dejaron de expresar AFP, y se sustituyeron por tipos de células solitarias móviles con una apariencia miofibroblástica que se dispersaron en la placa. Además de las células madre hepáticas proximales, hubo presentes otros tipos de células en el cultivo, algunos solitarios, algunos formando monocapas confluentes extensas, mientras otros formaron agrupamientos de células redondas discretas. Entre estos tipos de células, se observó la tinción positiva para albúmina solo en las células madre hepáticas proximales, los progenitores comprometidos y en colonias circulares firmemente agregadas, las células madre hepáticas primitivas, que aparecieron en cultivo de manera concurrente con la desaparición gradual de las células madre hepáticas proximales y los progenitores comprometidos.

La formación de colonias mostró una secuencia de eventos predecible. En los primeros días de cultivo apareció una oleada inicial de colonias, y parecieron surgir a partir de agregaciones de células preexistentes (Figura 1b). Sin embargo, después de 5-7 días, se inició una nueva oleada de formación de colonias a partir de células solitarias dispersadas por toda la placa de cultivo. Estas colonias fueron reconocibles primero como grupos de 4-8 células pequeñas, oscuras, firmemente compactadas, con lamelipodios en la periferia que formaban un borde continuo estrecho (Figura 2a). Las colonias se expandieron en agrupamientos extensos de células redondeadas firmemente agregadas de 8-10 µm de diámetro (Figura 2b-2e). La apariencia general de estas colonias de formación tardía es diferente de las colonias que se forman en los primeros días de cultivo, que estuvieron compuestas de células más grandes, y de los agregados iniciales de células madre hepáticas proximales que constituyen las células parenquimatosas principales del hígado fetal.

Las células madre hepáticas primitivas crecieron bien sobre plástico para cultivo de tejidos en el HDM, y alcanzaron diámetros de hasta 1 cm después de varias semanas en cultivo. Se retiraron de manera selectiva numerosas colonias y se dispersaron mediante tripsinización para proporcionar un número medio de células por colonia que osciló de 1000 células para las colonias de 3 mm de diámetro a 15.000-20.000 en las colonias grandes, con diámetros de 1 cm.

En general, las células más exteriores de las colonias se convirtieron en un fenotipo aplanado que se separó de la colonia para formar células solitarias de gran diámetro que se dispersaron por toda la placa de cultivo (Figura 3a). En otras colonias, las células del perímetro asumieron una apariencia fibroblástica elongada que inicialmente se enrolló estrechamente alrededor de la circunferencia de la colonia, quizá células mesenquimatosas firmemente asociadas (Figura 3b). Estas células también migraron lejos de las colonias en forma de células fusiformes aisladas. Estas células dispersadas siguieron siendo sumamente proliferativas, y a menudo llegaron a ser el tipo de células predominante en el cultivo, formando una capa firmemente empaquetada que se extendió por toda la placa. Esta capa de células rodeó las colonias, pero no las superó, aunque se formó una zona de transición en el margen de cada colonia, donde los dos tipos de células se entremezclaban (Figura 3c).

Ejemplo 7 (ejemplo de referencia)

Perfiles Antigénicos de Células Formadoras de Colonias en Cultivo sobre Plástico

Se investigaron las características antigénicas de las células cultivadas en el Ejemplo 6 con tinción inmunocitoquímica para marcadores relevantes para la organogénesis hepática. Se fijaron los cultivos celulares con una mezcla 50/50 (V/V) de metanol y acetona durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se crearon varias regiones de tinción sobre la superficie de cada placa con un rotulador PAP (Research Products International Corp, Mt. Prospect, Illinois) para permitir múltiples combinaciones de anticuerpos en el mismo cultivo. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon mediante incubación con una solución de suero de cabra del 10% (GIBCO/BRL/In Vitrogen, Carlsbad, California) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces con

5 PBS, se aplicaron anticuerpos monoclonales primarios a cada una de las regiones de tinción (normalmente 0,1-0,3 mL por región), y se incubaron durante la noche. Tras la incubación durante la noche a 4 °C las células se lavaron dos veces con PBS y después se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (1:750) o Alexa 594 (1:1250) (Molecular Probes, Eugene OR). En algunos casos estuvo disponible un anticuerpo monoclonal primario conjugado a FITC o PE y proporcionó el medio para el marcaje doble mediante incubación con este anticuerpo tras la finalización del protocolo de marcaje con un anticuerpo primario sin conjugar.

10 El perfil antigénico se resume en la Tabla 2. Las colonias se tiñeron positivamente para varios marcadores previamente asociados a los tipos de células hepáticas, que incluyen albúmina (Figura 4a), CK19 (Figura 4b), epCAM (Figura 4c) y NCAM (CD56, Figura 4d), pero no PECAM (CD31; datos no mostrados). Se observó la tinción con c-kit en varias colonias, localizada en general en un segmento estrecho en el margen de las colonias (Figura 5a). Además, las colonias fueron positivas para el supuesto marcador de células madre, CD133 (AC133, Figura 5c). De manera interesante, las células de la zona de transición en la periferia de las colonias se tiñeron positivamente para un marcador endotelial recientemente descrito, CD146 (M-CAM, Figura 5c), y siguieron siendo positivas para esta proteína mientras estuvieron próximas a las colonias, lo que posiblemente identifica un tipo de célula mesenquimatosa estrechamente asociada, posiblemente un progenitor endotelial. Las células madre hepáticas primitivas que surgieron en forma de colonias fueron negativas para AFP, lo que indica que las células madre hepáticas primitivas son un precursor de las células madre hepáticas proximales, que a su vez son precursores de los progenitores de hepatocitos y los progenitores biliares.

Tabla 2 - Fenotipos de las Células Cultivadas

Fenotipo	Células Madre de la Placa Ductal	Células madre hepáticas proximales	Hepatocitos	Epitelios Biliares
Morfología en condiciones rigurosas: plástico para cultivo de tejidos y HDM	Células oscuras, firmemente empaquetadas, 7-10 de diámetro, con morfología de "alfiletero"	Transitoriamente son agregados de células pequeñas, cuboides que llegan a ser móviles	No sobreviven a las condiciones rigurosas	
Morfología sobre células de soporte STO y en HDM	Células oscuras, firmemente empaquetadas, 7-10 de diámetro, con morfología de "alfiletero"	Agregados de células estables, densamente empaquetados	Subpoblación diploide aplanada y que tiene diferentes límites celulares; Las células poliploides sobreviven pero no crecen	
Alfa-fetoproteína	No expresada	+++	No expresada	No expresada
Albúmina	+++	+++	+++	No expresada
CK8/18	+++	+++	+++	+++
CK19	+++	+++	No expresada	+++
c-Kit	+++ (células en la periferia de la colonia)	No expresada	No expresada	No expresada
Ep-CAM	+++	+++		
N-CAM	+++ (células en la periferia de las colonias)	No expresada	No expresada	No expresada
CAM-5.2	+++ (algunas, no todas, las células)	No expresada		
CD133 (AC133)	+++	+++	No expresada	No expresada
CD146	Periferia de las colonias (se desconoce si es una célula mesenquimatosa asociada o derivada de la célula madre hepática primitiva)	No expresada	No expresada	No expresada
PE-CAM	No expresada	No expresada	No expresada	No expresada

20

Ejemplo 8 (ejemplo de referencia)

Paso de las Células de las Colonias desde el Substrato de Plástico a Células de Soporte STO

Se usaron células de soporte STO para estudiar los destinos de las células madre hepáticas primitivas tras el paso selectivo desde el sustrato de plástico. Después de 1-2 semanas en cultivo, las colonias del sustrato de plástico del Ejemplo 6 se levantaron físicamente de los sustratos de plástico mediante aspiración en una pipeta de 100 µL con aumento binocular. Se recogieron hasta 50 colonias en HBSS mod, y después se digirieron durante hasta 20 min en disolución de colagenasa con agitación para dispersar las células en suspensión.

La eficacia de formación de colonias tras el paso desde el plástico a una capa de células de soporte STO fue bajo, y varió entre un 0,5 y 1% para las células que se pasaron a densidades de 500 o 50 células por cm². La unión inicial de las células formadoras de colonias pasadas mejoró por la presencia de EGF (20 ng/mL) en el medio de colocación en placas. La baja eficacia de formación de colonias se pudo haber debido, en parte, a la necesidad de someter a las células a digestión prolongada (hasta 20 minutos) con colagenasa para conseguir suspensiones de células individuales.

Después del paso a las células de soporte STO, las células progenitoras primitivas se fusionaron en la capa de células STO, y reaparecieron en forma de colonias firmemente compactadas de células pequeñas después de 4-5 días en cultivo (Figura 6a). Las nuevas colonias se ampliaron durante las siguientes semanas para producir agrupamientos circulares firmemente agregados, a menudo con un ligero engrosamiento en la circunferencia (Figura 6c). En algunas colonias, se dio una etapa proliferativa secundaria en la que se dio una irrupción de células desde un punto en el borde de la colonia, y se extendieron sobre la capa de STO, a menudo rodeando la colonia original (Figura 6c).

Las propiedades inmunocitoquímicas de las colonias formadas sobre las células STO fueron iguales a las descritas anteriormente para las células formadoras de colonias sobre los sustratos de plástico. Esto incluye la tinción positiva para albúmina, CK19, CK18 y CD133. Como en las colonias iniciales generadas sobre plástico, se expresaron marcadores tales como CD146 y NCAM más claramente en la periferia de las colonias formadas sobre las células STO. Este patrón de expresión marginal se volvió incluso más pronunciado cuando las colonias fueron rodeadas por células que proliferaron desde la colonia primaria. Esto se muestra claramente para NCAM en la Figura 9, en la que la interfase entre la colonia original formada por las células pasadas y la proliferación secundaria está marcada por una banda de células con expresión de NCAM intensamente positiva. Este patrón se observó también para la expresión del marcador de pan-citoqueratina CAM 5.2, y el marcaje doble para NCAM y CAM 5.2 mostró que los dos marcadores se expresaron a niveles elevados en la misma región de las células marginales (Figura 9).

Finalmente, las características del tipo de célula en irrupción fueron de interés, ya que surgieron de las colonias en una disposición diferente que consistió en una fila paralela de células que se alargaban en un patrón de ramificación de células dispuestas linealmente con espacios intercelulares claros (Figura 8). Cuando estas células se alargaron en una hoja extensa alrededor de las colonias de células originales, parecieron perder su organización lineal aparente en el momento de su aparición. Sin embargo, la tinción para albúmina reveló que la organización en filas de células se mantuvo dentro de la masa de células (Figura 10a), y la co-tinción para CD146 mostró que este marcador se expresa también a niveles elevados dentro del grupo de células en proliferación (Figura 10b). Quizá lo más importante en estas células es la aparición de tinción para AFP en la periferia de las células emergentes (Figura 11). Esto representa el primer punto en las manipulaciones *ex vivo* descritas en la presente memoria de que la expresión de AFP se puede asociar a la progenie de las células formadoras de colonias iniciales. Estos datos indican que las células madre hepáticas primitivas aisladas en el Ejemplo 6 se pueden usar para producir progenitores hepáticos comprometidos.

Ejemplo 9

Presencia de Células Madre Hepáticas Primitivas y Proximales en un Hígado de un Donante Neonatal

Se obtuvo un hígado de un donante que había nacido después de aproximadamente 28 semanas de gestación, y que sobrevivió solamente un día. El periodo de isquemia caliente entre el paro cardiaco y la recogida y el lavado del órgano donante fue de entre seis y siete horas. Después, el órgano se mantuvo sobre hielo durante aproximadamente doce horas. El órgano completo (peso húmedo de aproximadamente 100 gramos) se sometió a perfusión y digestión con Liberasa, y se preparó una suspensión de células básicamente como para un hígado obtenido de un niño o adulto humano. Se eliminaron las células no viables y muchos glóbulos rojos mediante centrifugación preparativa con el uso de Optiprep. Sin embargo, fue difícil determinar el rendimiento real y el porcentaje de células viables no eritroides en la preparación final.

Las porciones de las células recuperadas se redujeron adicionalmente en glóbulos rojos mediante centrifugación diferencial, básicamente como se describe para las células de hígado fetal, y después se sembraron en cultivo en condiciones adecuadas para determinar la presencia de células madre hepáticas primitivas (es decir, colocándolas en placas en un medio sin suero hormonalmente definido sobre un sustrato de plástico para cultivo de tejidos). Otras porciones de células se colocaron en placas, sin purificación adicional, en condiciones para ensayar las

células madre hepáticas proximales (es decir, colocándolas en placas en medio definido sin suero con células de soporte STO). Se sembraron porciones adicionales de las células sobre plástico para cultivo de tejidos revestido con colágeno tipo I, en medio sin suero definido que contenía o que carecía de factor de crecimiento epidérmico (EGF) complementario a 5 ng/ml.

5 Después de períodos adecuados de incubación, se observó el crecimiento de las colonias hepáticas en todas las condiciones ensayadas. En los ensayos respectivos para células madre hepáticas primitivas y proximales, la morfología de las colonias y la velocidad de crecimiento fueron similares a las observadas para las células cultivadas de hígado fetal humano (obtenido en general después de < 22 semanas de gestación) cultivadas en las mismas condiciones. Se pusieron a prueba colonias representativas mediante tinción de inmunofluorescencia para la expresión de albúmina humana, y todas fueron positivas para este marcador.

10 Aparecieron colonias de morfología epitelial aparente (presuntamente hepáticas) en las placas revestidas de colágeno en presencia de EGF. También crecieron rápidamente otras células de morfología menos definida en estos cultivos, pero aún no se han caracterizado con detalle.

15 También aparecieron colonias de células presuntamente epiteliales en las placas revestidas de colágeno en ausencia de EGF complementario. Algunas de estas colonias se recogieron individualmente mediante el uso de un dispositivo de pipeteo manual, y se transfirieron a medio fresco en placas de 96 pocillos. Las células de ciertas colonias han continuado proliferando en tales cultivos, y se están haciendo pases como cepas celulares. Parece probable que estas representen cepas, potencialmente clonales, de precursores hepáticos propagables, quizá células madre. La caracterización adicional de la expresión de los antígenos, que incluyen CD133, Ep-CAM, albúmina, AFP y CK19, determinará el estado relativo de diferenciación de estas supuestas líneas de células madre hepáticas.

20 Ejemplo 10

Clasificación Mediante Citometría de Flujo y Análisis Mediante Citometría de Flujo (FACScan)

25 Se realizaron análisis mediante FACScan de antígenos citoplásmicos (p.ej., albúmina, AFP) con células fijadas y permeabilizadas con paraformaldehído del 3% antes de la tinción con los antisueros. Las células se tiñeron como se indicó para la inmunofluorescencia, pero mediante el uso de anticuerpos marcados directamente con la sonda fluorescente relevante (véanse las Tablas 3 y 4). La citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro de flujo "MoFlow" Cytomation (Fort Collins, Colorado) (instalación de FACs dirigida por el Dr. Larry Arnold). El líquido de recubrimiento fue HBSS sin modificar. El citómetro MoFlow es capaz de analizar o clasificar 40.000 células/segundo, con hasta 12 parámetros en paralelo (6 "colores" en combinación con la dispersión frontal y/o la dispersión lateral), y con una exactitud mayor del 99%. Para la mayoría de las clasificaciones se usó un láser de argón de 4 W con una potencia de 60 mW y con una boquilla de 100 µm. Se recogieron las emisiones de fluorescencia a 488 nm de excitación tras el paso a través de un filtro de paso de banda de 530/30 nm para FITC. La fluorescencia se midió mediante amplificación logarítmica. Las células se consideraron positivas cuando la fluorescencia fue mayor del 95% de las células de control negativo. Se usó un valor de detector de E-1 para la dispersión frontal (FSC) con una amplificación de escala media, y el detector se usó a escala media para la dispersión lateral (SSC) con una amplificación de 1. Los acotamientos de SSC se realizaron por medio de amplificación lineal con división de los parámetros en 256 unidades arbitrarias. Como controles negativos se usaron células sin teñir, células teñidas con un anticuerpo irrelevante y la misma sonda fluorescente o con el mismo anticuerpo pero sin sonda fluorescente. En cada muestra se ensayaron 30.000-50.000 células. En las células positivas, aquellas con una fluorescencia mayor que los controles negativos, se estudió adicionalmente la granularidad, el tamaño y el grado de fluorescencia. Las células antes y después de la clasificación se mantuvieron a 4 °C en el HDM al cual se añadió suero al 10%.

Tabla 3 - Anticuerpos Monoclonales

Anticuerpos (todos preparados en ratones)	Isotipo/Dilución	Antígeno objetivo (todos humanos)	Fuente comercial
CD45 (31254X; 31255X)	IgG ₁ Kappa/ 1:	Antígeno leucocitario común en todas las células hematopoyéticas	Pharmingen
CD 235A (32591A)	IgG _{2b} Kappa/ 1:	Glucoforina A (antígeno de glóbulos rojos)	
CD 14 (APC)	IgG _{2a} Kappa/ 1:	Antígeno presente en monocitos, dendritas, (uno de los receptores de endotoxinas)	
CD34 (34374X)	IgG ₁ Kappa/ 1:	Antígeno de células madre presentes en diversas poblaciones de progenitores	
CD38 (31015X; 31014X)	IgG ₁ Kappa/ 1:	Antígeno presente en células B, timocitos y células T activadas	
CAM 5.2	IgG _{2a} /1:500	CAM en la placa ductal	

CD117 (CD11704) (MHCK04)	IgG ₁ / 1:	c-kit: receptor para factor de células madre	Caltag
CD31	IgG ₁ / 1:250	PE-CAM: CAM en endotelios	
ALB (A-6684)	IgG _{2a} /1:120	Albúmina	Sigma, St. Louis, Mo.
CD56	IgG ₁ / 1:250	N-CAM: CAM en ciertas neuronas y en la placa ductal	
AFP (18-0003)	IgG ₁ Kappa/ 1:250	AFB	Zymed
CK 8/18	IgG ₁ / 1:1000	Citoqueratinas genéricas para epitelios	
CD146	IgG ₁ / 1:250	M-CAM: hallado en endotelios	Chemicon,
CD133	IgG ₁ / 1:	AC133, marcador de células madre	Mylteni Biotek,
Ep-CAM	IgG ₁ / 1:750	Una CAM en la mayoría de progenitores epiteliales	Neomarkers
CK-19	IgG _{2b} / 1:300	Citoqueratina-19, queratina específica de epitelios biliares	NovCastra

Tabla 4 - Sondas Fluorescentes

Sondas Fluorescentes	Color	Máximo de Absorbancia/ Máximo de Emisión	11. Fuente
FITC	Verde	494/525	Sigma, St. Louis, Mo
Ficoeritrina (PE)	Amarillo	480/578	Molecular Probes, Eugene, Oregon
Alexa 488	Verde	495/519	
7-AAD (A-1310) usado sin un anticuerpo para la eliminación de las células muertas	Rojo	488/650	
Cy-5	Rojo Lejano	649/670	Jackson Labs, West Row, Pennsylvania
AMCA	Azul	350/450	

- 5 Para el análisis mediante citometría de flujo de antígenos citoplásmicos (p.ej., albúmina, AFP), las células se fijaron y se permeabilizaron con paraformaldehído al 3% antes de la tinción con los antisueros. Las células se tiñeron como se indicó anteriormente para inmunofluorescencia. Para el análisis mediante el uso de 2 marcadores, se usará un segundo anticuerpo marcado con una sonda fluorescente distinta y no solapante en longitud de onda. El análisis se llevó a cabo mediante el uso de un FACscan de Becton Dickinson. Las células teñidas solo con el anticuerpo secundario se usaron como controles negativos. En cada muestra se ensayaron 30.000-50.000 células. En las
- 10 células positivas, aquellas con una fluorescencia mayor que los controles negativos, se estudió adicionalmente la granularidad, el tamaño y el grado de fluorescencia.

Ejemplo 11 (ejemplo de referencia)

Determinación de la Expresión de Albúmina y Alfa-Fetoproteína en una Suspensión de Células Hepáticas Obtenidas de Tejido Fetal

- 15 En este experimento, se examinó la expresión de albúmina y alfa-fetoproteína en células madre hepáticas proximales y en células madre hepáticas primitivas. Inicialmente se determinó que la fracción de sedimento está enriquecida en hepatoblastos (células madre hepáticas proximales), mientras la interfase está enriquecida en células formadoras de colonias (células madre hepáticas primitivas).

- 20 La expresión de albúmina es comparable entre las células de la interfase y del sedimento, tanto en células recién aisladas como después de 10 días de cultivo. Sin embargo, la expresión disminuye en cultivo. Esto se pudo deber a una menor expresión o proliferación de las células no parenquimatosas negativas a albúmina. Las observaciones en los cultivos indican que ambas contribuyen a este patrón (Fig. 20).

La AFP se expresa intensamente en la fracción de sedimento recién aislada, y se expresa débilmente en las células de la interfase. Esto es coherente con la observación de que la AFP no se expresa en las células de las colonias.

Después de 10 días en cultivo, la AFP no es detectable en las células del sedimento o de la interfase. Las células de las colonias en cultivo expresan albúmina, pero no AFP. Esto pudo haberse debido a las condiciones (cultivo sobre plástico), que llevan a la inhibición de la expresión de AFP en todas las células. Sin embargo, la baja expresión de AFP en las células de la interfase indica que la AFP nunca se expresa intensamente en estas células (Fig. 20).

5 Además, cuando las células de las colonias se cultivan en condiciones que mantienen una expresión prolongada de AFP en las células del sedimento (co-cultivo con STO), todavía son negativas para la expresión de AFP. No hubo reactividad cruzada entre la unión de anticuerpos a albúmina o alfa-fetoproteína, y no se observó ninguna señal en los carriles vacíos.

10 Los resultados de estos experimentos demuestran, por tanto, que la AFP se expresa intensamente en la fracción de sedimento recién aislada, y se expresan solo débilmente en las células de la interfase. Esto es coherente con la observación de que la AFP no se expresa en las células de las colonias.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una célula madre hepática primitiva humana aislada, en la que dicha célula madre hepática primitiva aislada no expresa alfa-fetoproteína, expresa Ep-CAM y es un precursor para una célula madre hepática proximal, y dicha célula madre hepática proximal es capaz de dar lugar a un progenitor hepatocítico o un progenitor biliar, en la que dicha célula madre hepática primitiva aislada es una célula individual adulta.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la célula madre hepática primitiva humana aislada expresa AC133 y albúmina.
3. La composición según la reivindicación 2, en la que la célula madre hepática primitiva humana aislada expresa citoqueratina 8/18, citoqueratina 19, o combinaciones de las mismas.
- 10 4. La composición según la reivindicación 3, en la que la célula madre hepática primitiva humana aislada expresa N-CAM, CAM5.2, *c-kit*, CD146, o combinaciones de las mismas.
5. Un método para aislar un progenitor hepático primitivo humano capaz de dar lugar a progenitores hepatocíticos o progenitores biliares, y el método comprende:
 - (a) proporcionar una suspensión de células derivadas de tejido hepático;
 - 15 (b) aplicar dicha suspensión de células a una superficie de plástico;
 - (c) cultivar las células en condiciones que incluyen el uso de medio sin suero que comprende un regulador del metabolismo de carbohidratos, una fuente de hierro, y un factor de producción de membranas; y
 - (d) seleccionar las células que expresan Ep-CAM y que no expresan alfa-fetoproteína.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, que comprende además seleccionar de la suspensión las células que expresan albúmina, citoqueratina 19, AC133, citoqueratina 8/18, o combinaciones de las mismas.
7. El método de la reivindicación 5, en el que el tejido hepático se obtiene de un feto o de un neonato.
8. El método de la reivindicación 5, en el que el tejido hepático se obtiene de un niño o de un adulto.
9. El método de la reivindicación 5 ó 6, que comprende además seleccionar de la suspensión las células que expresan N-CAM, CAM5.2, *c-kit*, CD146, o combinaciones de las mismas.
- 25 10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la célula madre hepática primitiva humana comprende un ácido nucleico exógeno.
11. Una célula madre hepática primitiva humana aislada, que no expresa alfa-fetoproteína y que expresa Ep-CAM y es capaz de dar lugar a progenitores hepatocíticos o progenitores biliares, en la que dicha célula madre hepática primitiva aislada es una célula individual adulta.
- 30 12. La célula madre hepática primitiva humana aislada según la reivindicación 11, que expresa además AC133 y albúmina.
13. La célula madre hepática primitiva humana aislada según la reivindicación 12, que expresa además citoqueratina 8/18, citoqueratina 19, o combinaciones de las mismas.
- 35 14. La célula madre hepática primitiva humana aislada según la reivindicación 12, que expresa además N-CAM, CAM5.2, *c-kit*, CD146, o combinaciones de las mismas.
15. La célula madre hepática primitiva humana aislada según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que comprende además un ácido nucleico exógeno.
- 40 16. Un método para producir un medicamento para tratar una disfunción o enfermedad hepática que comprende mezclar una cantidad eficaz de la célula madre hepática primitiva humana según cualquiera de las reivindicaciones 11-15 con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

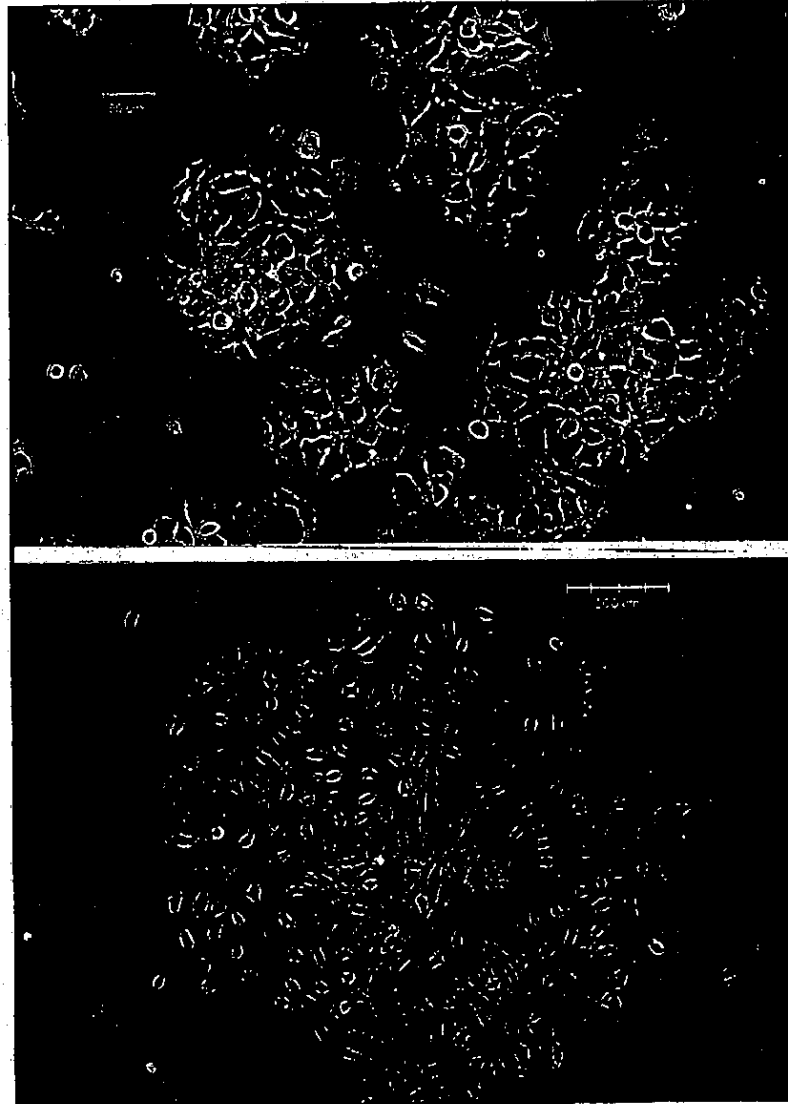


FIG. 2

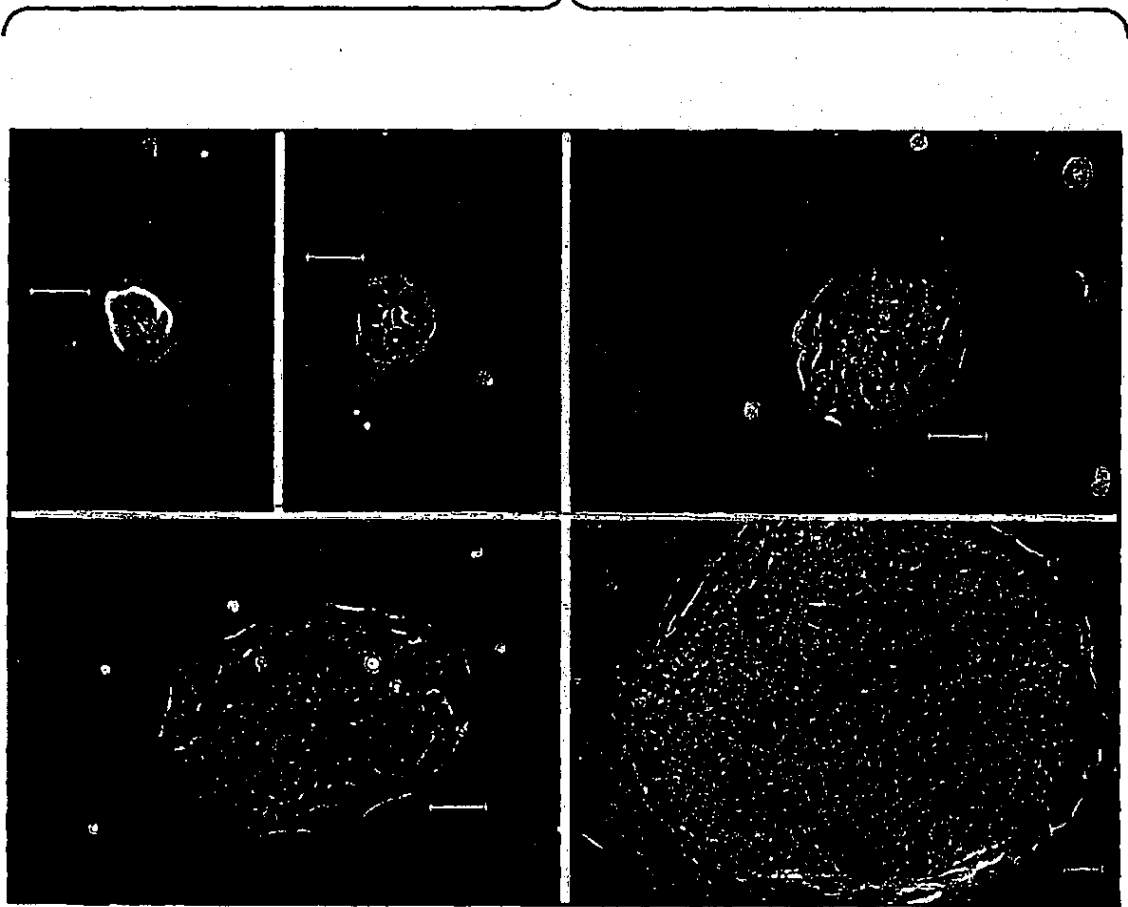


FIG. 3

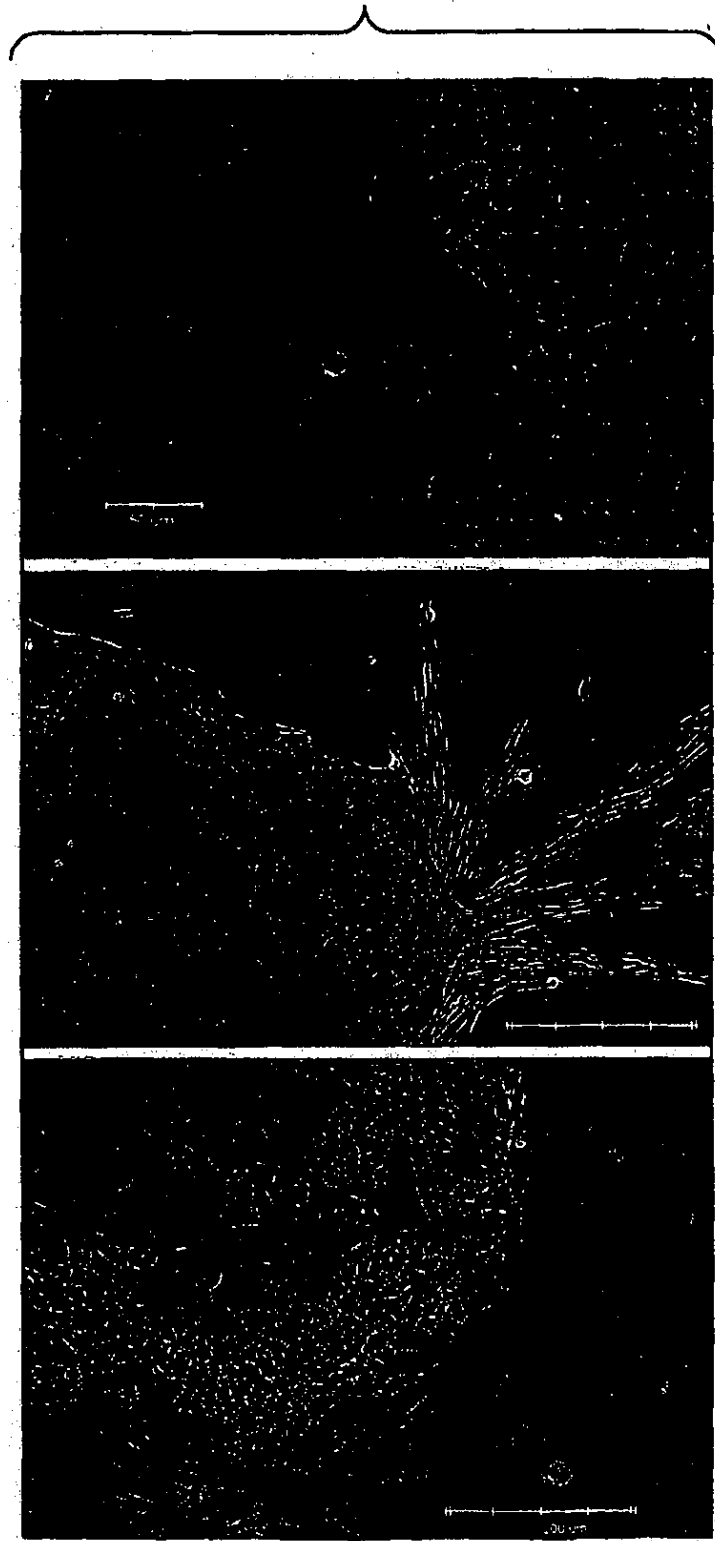


FIG. 4

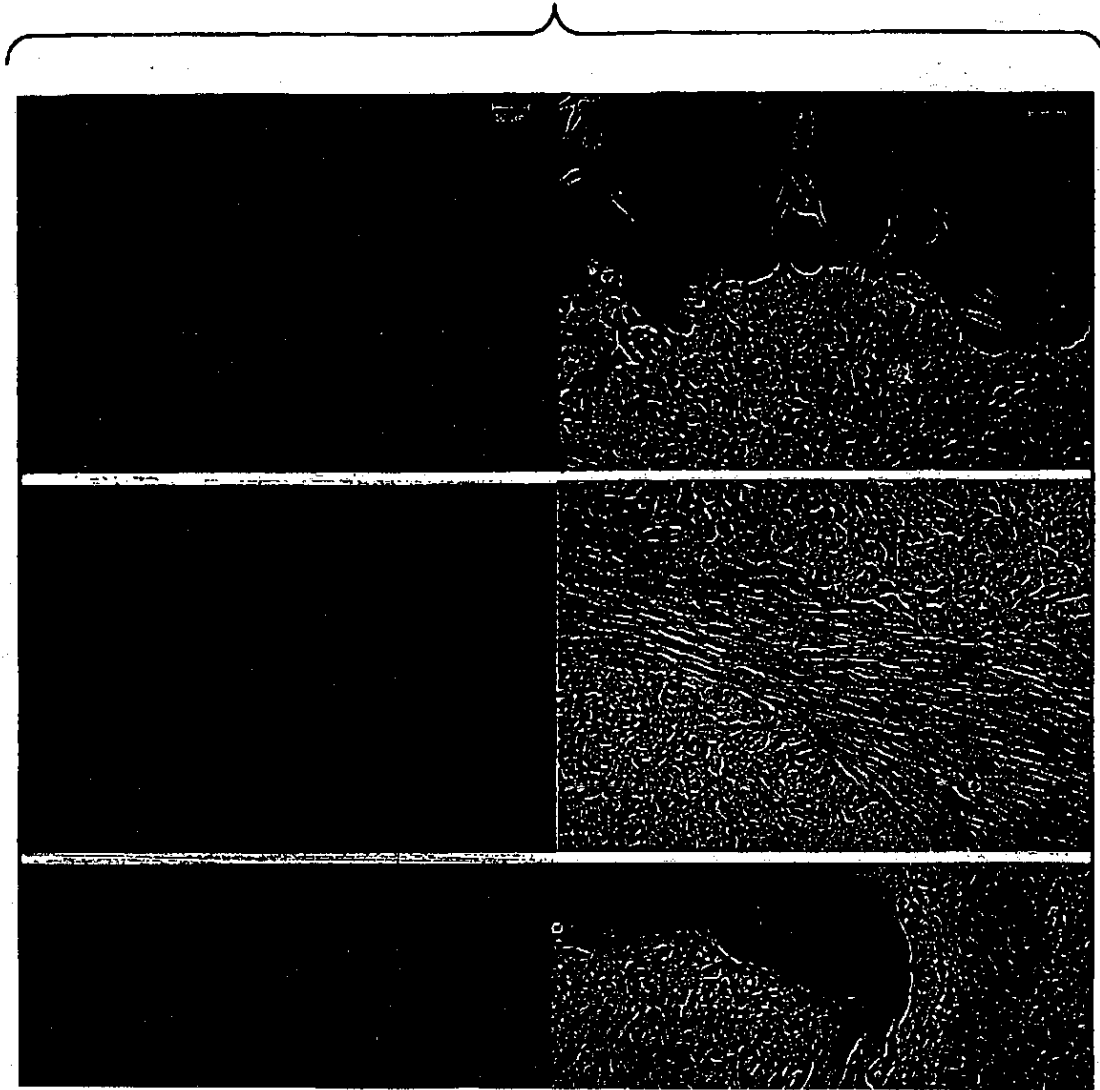


FIG. 5

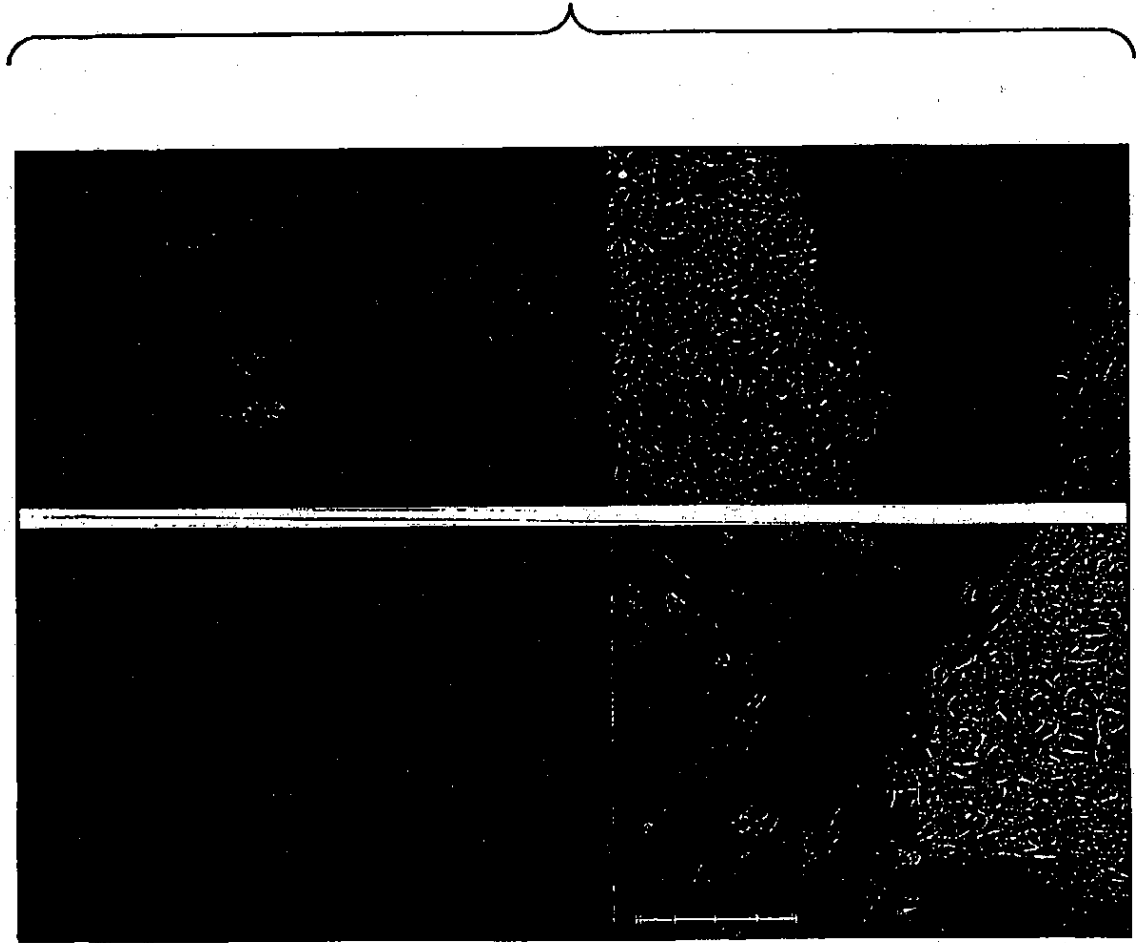


FIG. 6

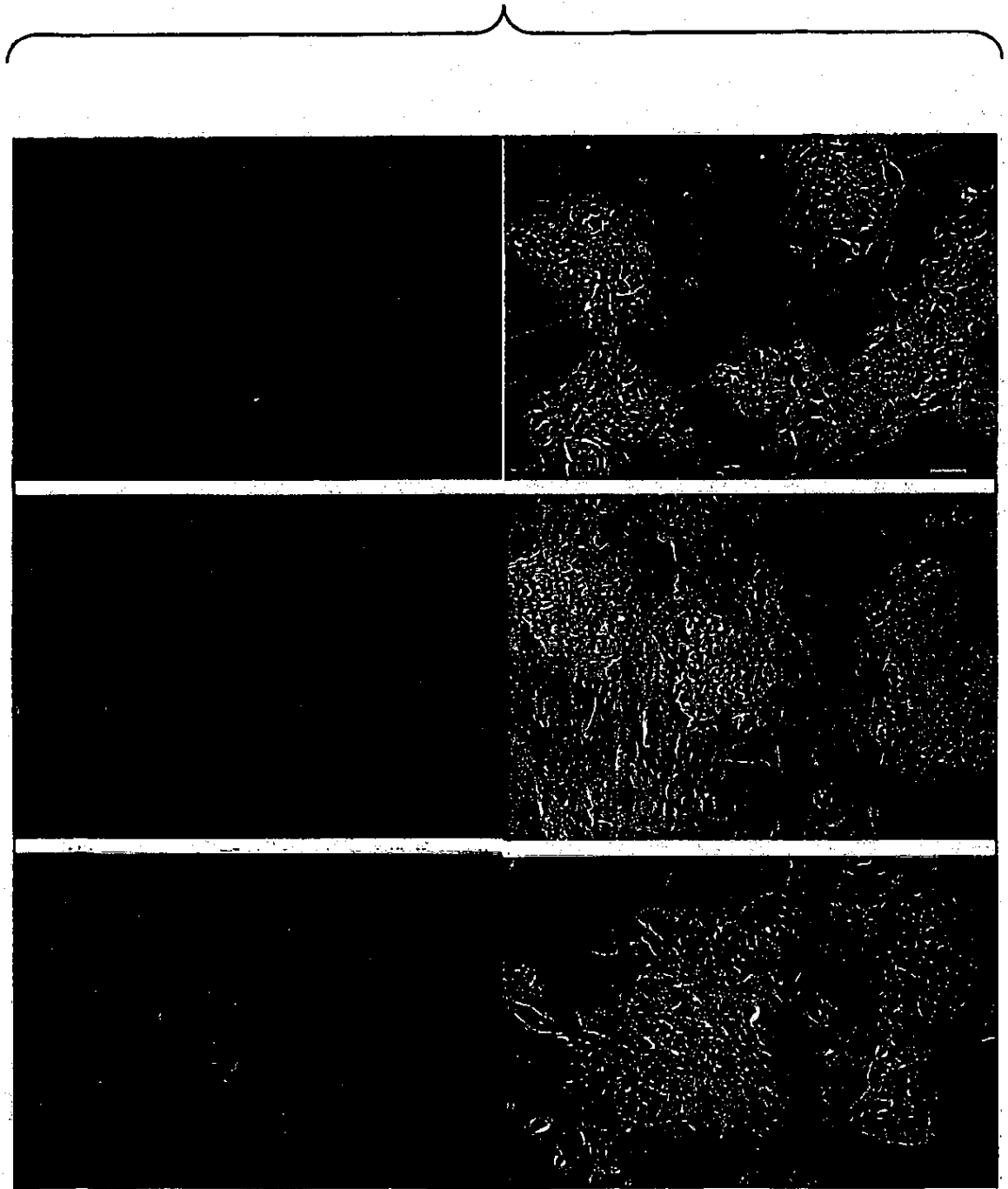


FIG. 7

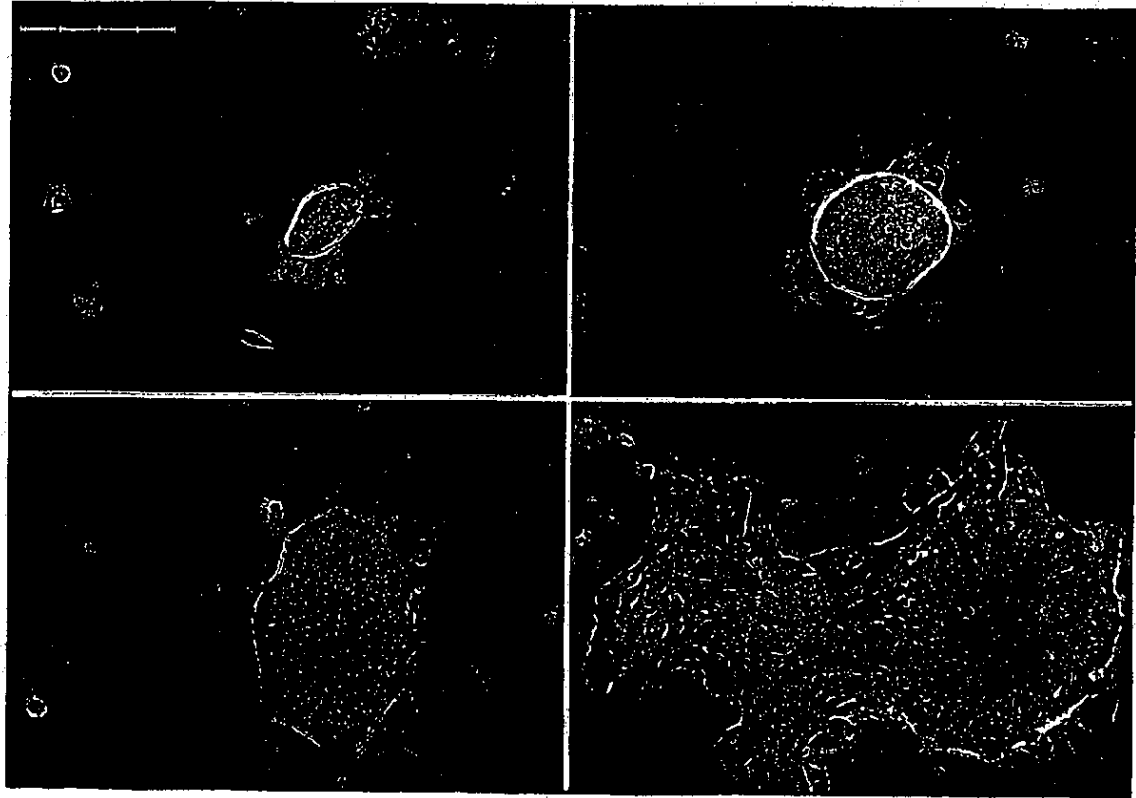


FIG. 8

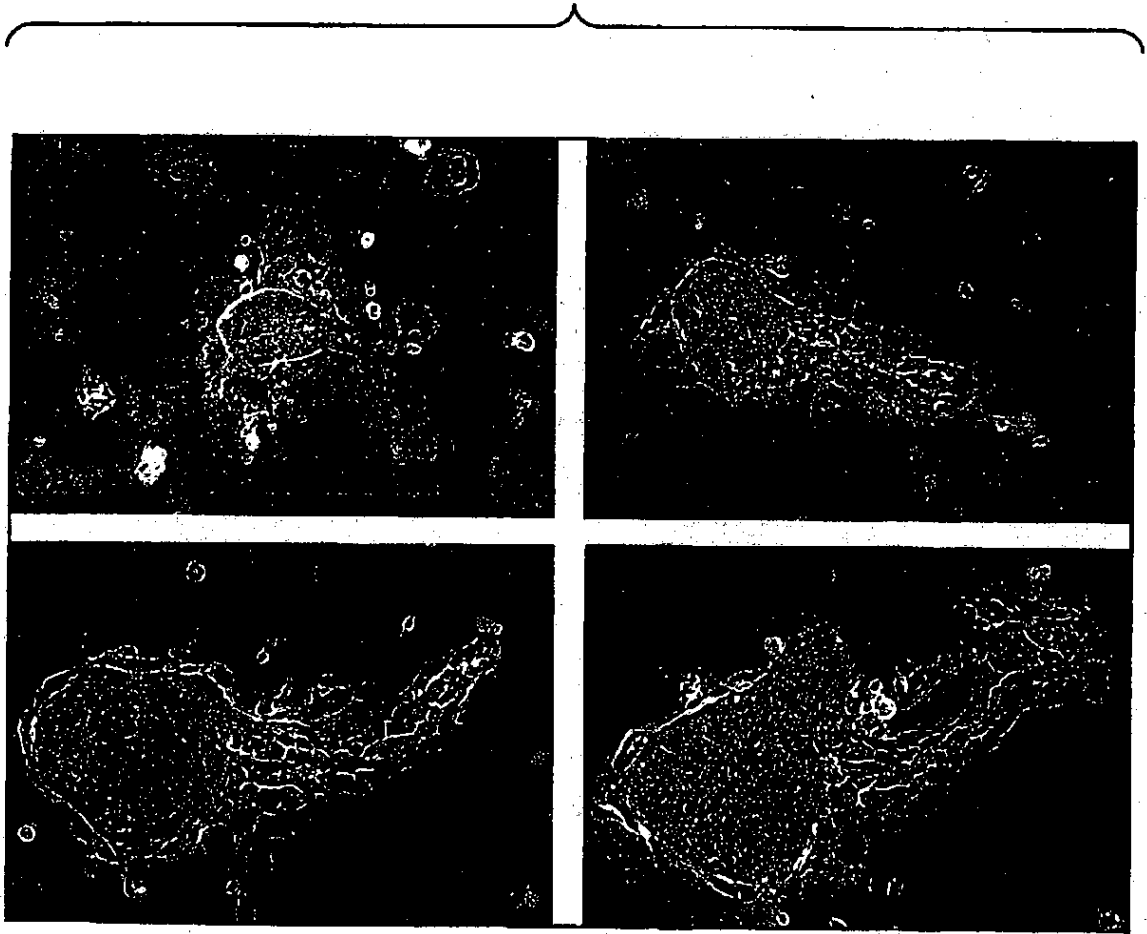


FIG. 9

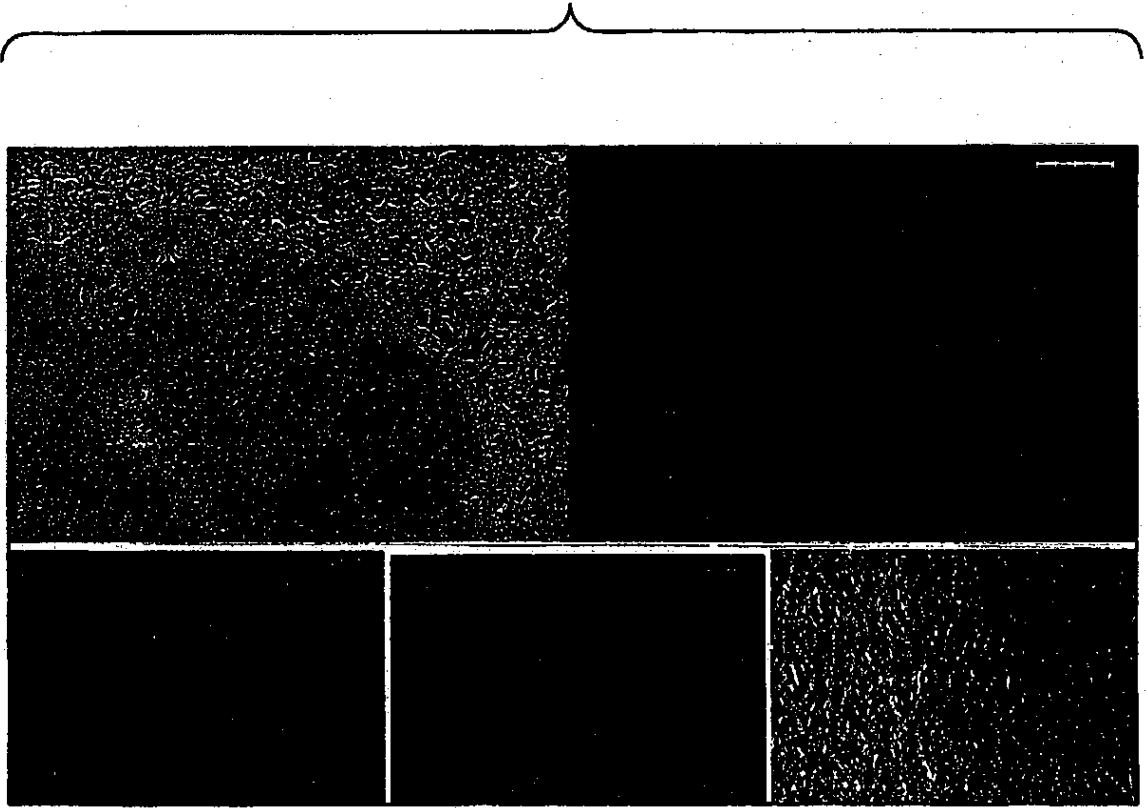


FIG. 10

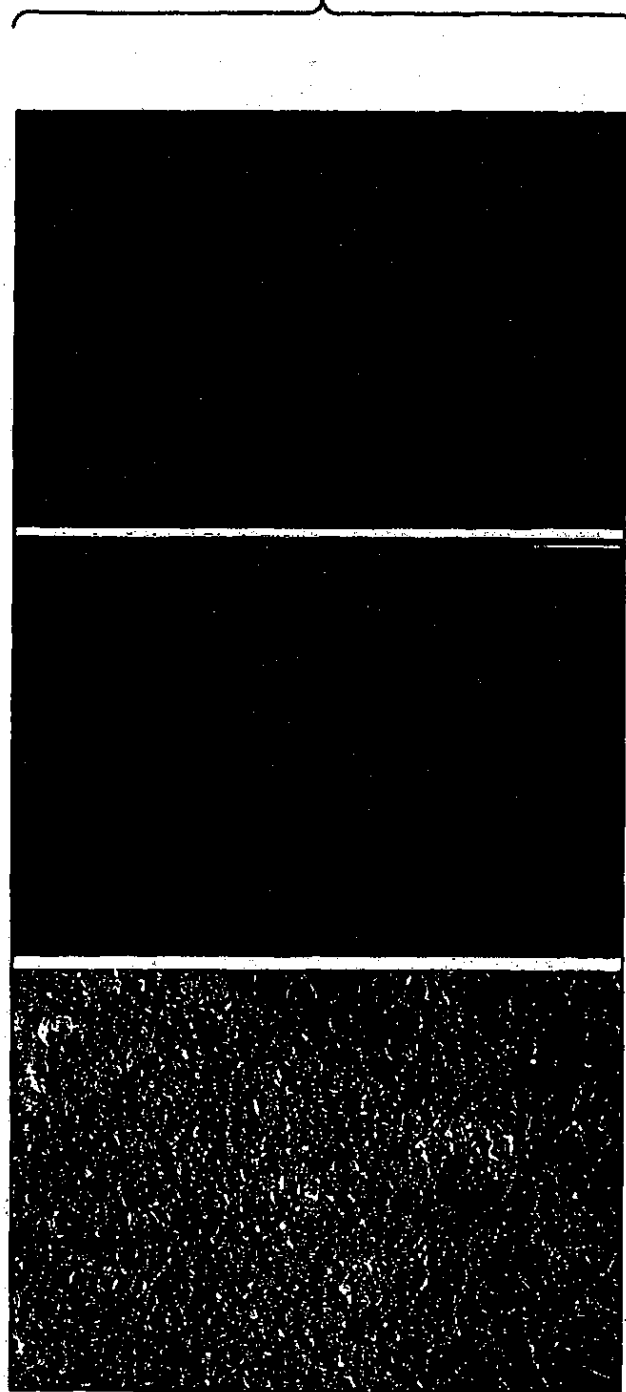


FIG. 11

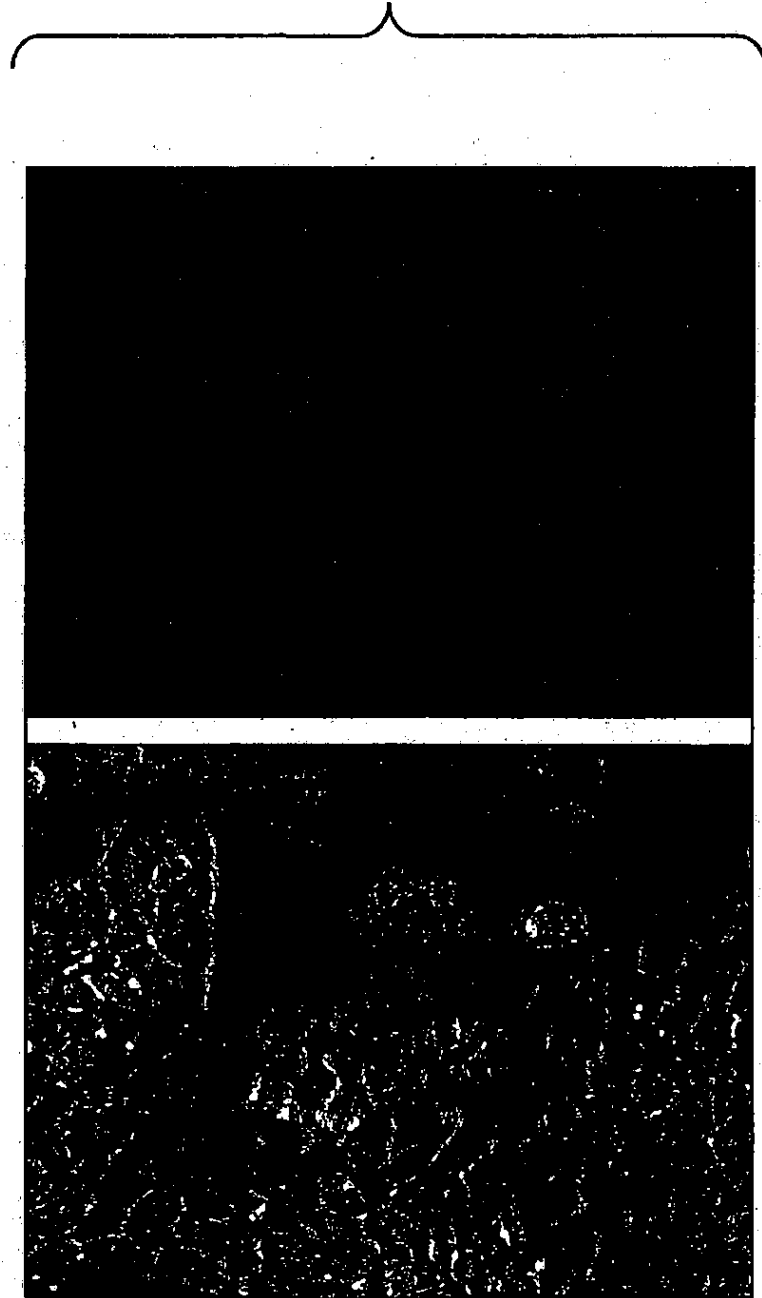


FIG. 12

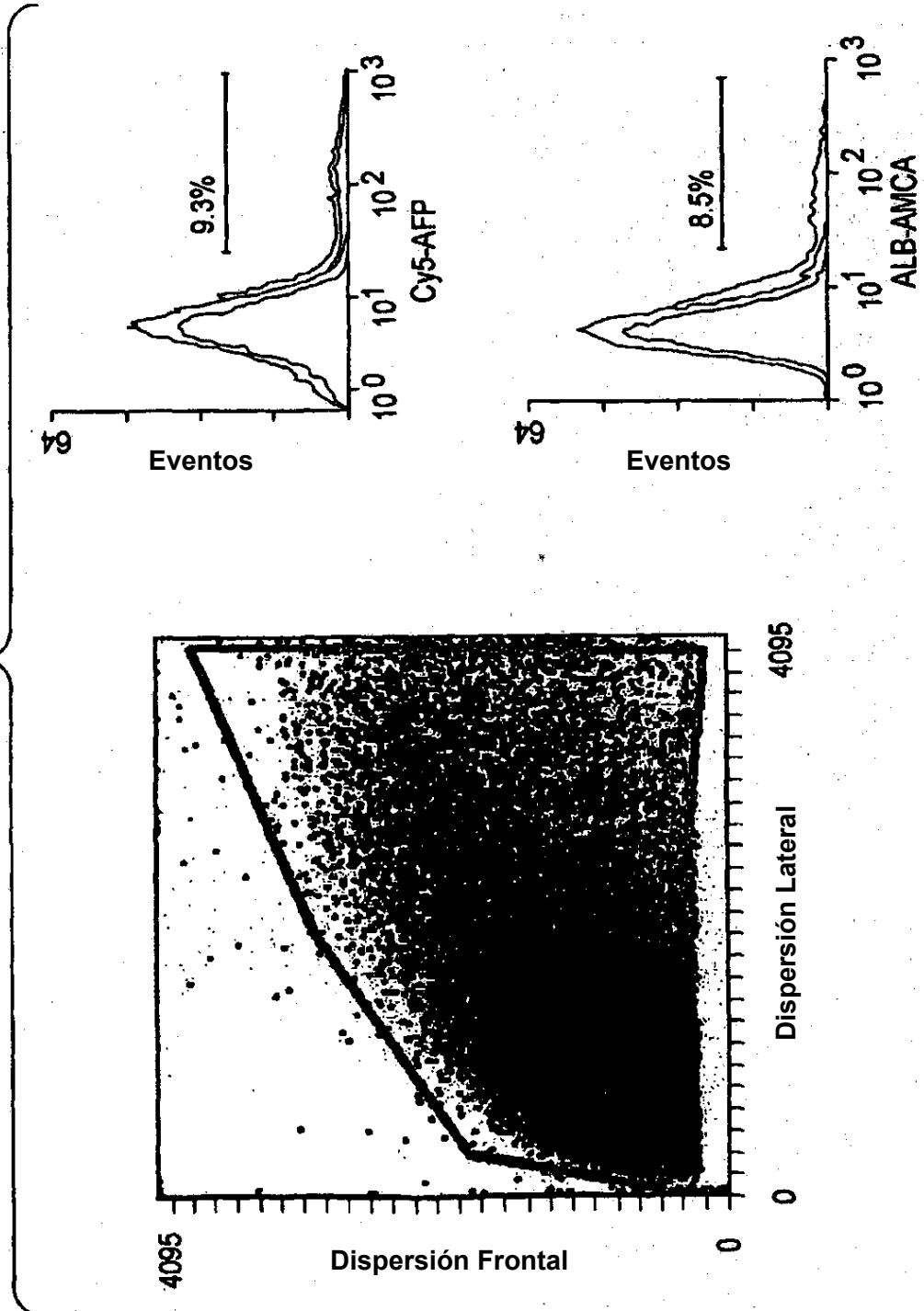


FIG. 13

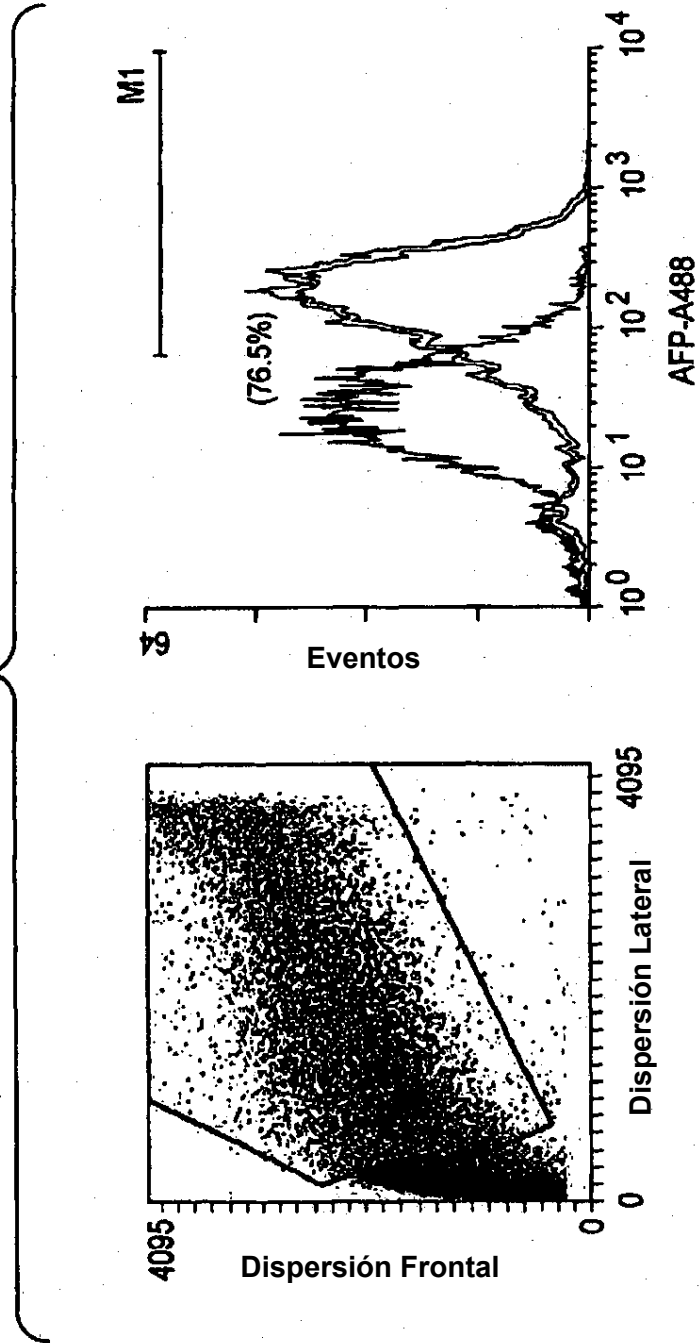


FIG. 14A

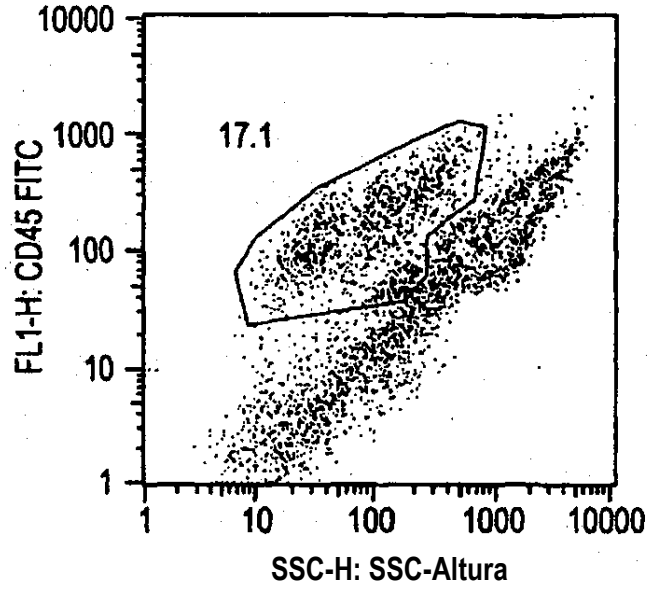


FIG. 14B

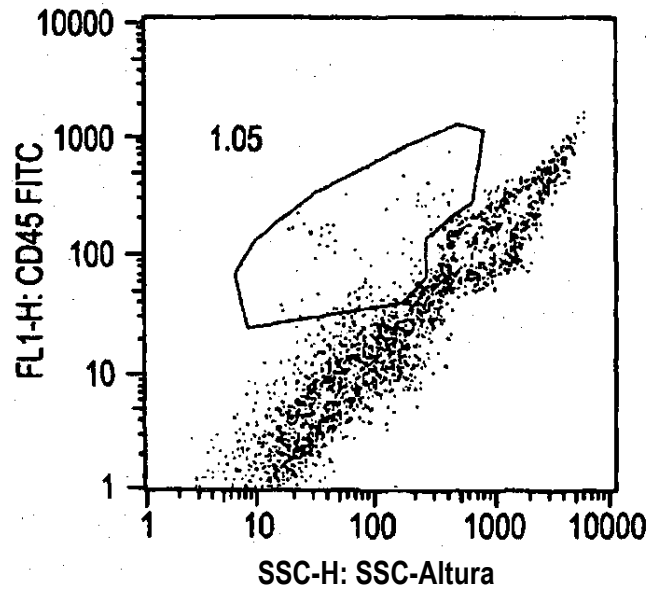


FIG. 15A

Expresión de albúmina en células hepáticas humanas reducidas en CD-45

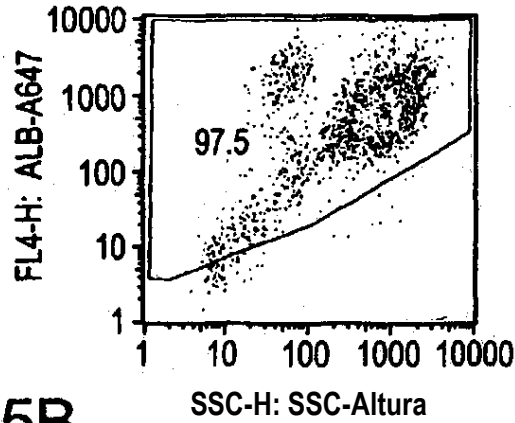


FIG. 15B

Dispersión de luz (frontal y lateral) en células hepáticas humanas positivas para albúmina

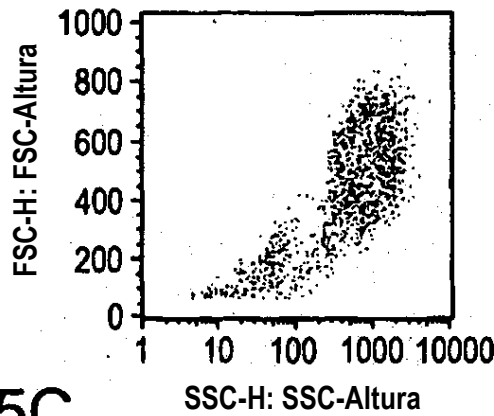


FIG. 15C

Dispersión de luz (frontal y lateral) en células hepáticas humanas negativas para albúmina

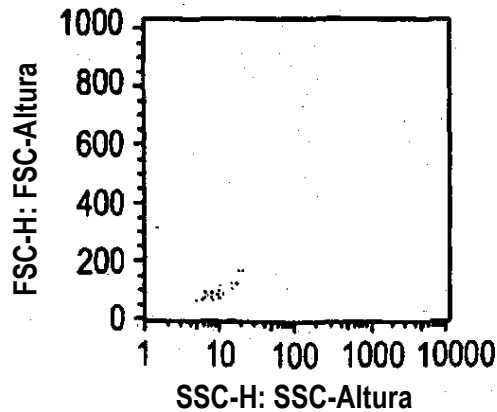


FIG. 16A

Expresión de la proteína CD133 en células de hígado humano adulto

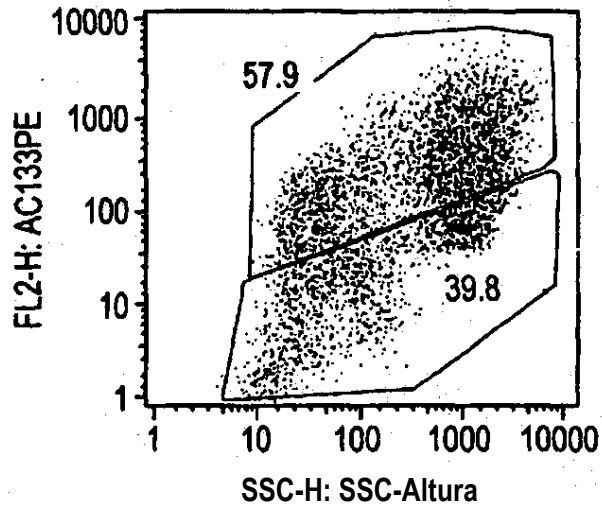


FIG. 16B

Enriquecimiento de células de hígado humano adulto positivas para CD133 mediante clasificación celular magnética

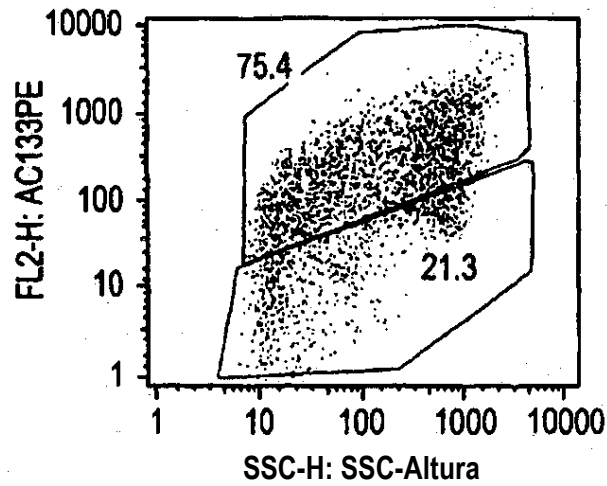


FIG. 17A

Análisis mediante FACS de la tinción de células hepáticas humanas reducidas en CD45 con un anticuerpo de control negativo

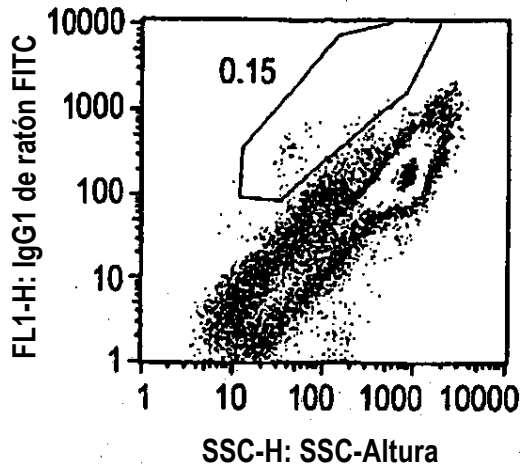


FIG. 17B

Análisis mediante FACS de la tinción de células hepáticas humanas reducidas en CD45 con un anticuerpo hacia Ep-CAM

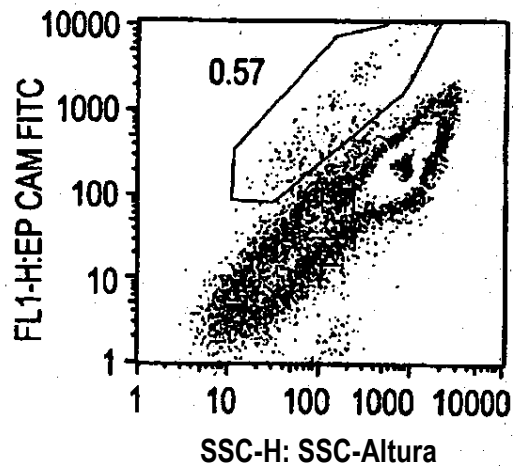


FIG. 17C

Análisis mediante FACS de la tinción de células hepáticas humanas reducidas en CD45 con un anticuerpo hacia CD133

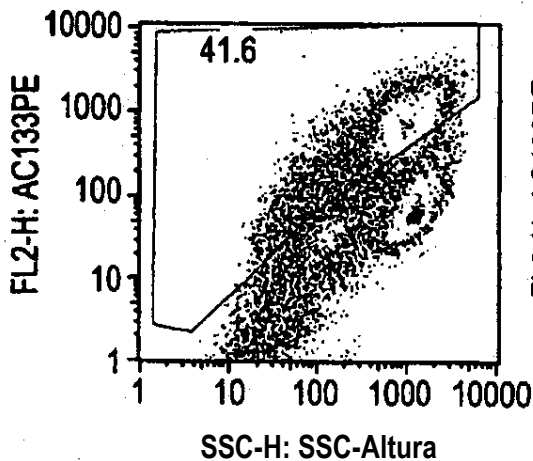


FIG. 17D

Análisis mediante FACS de la tinción de células hepáticas humanas reducidas en CD45 con co-expresión de CD133 en células positivas para Ep-CAM

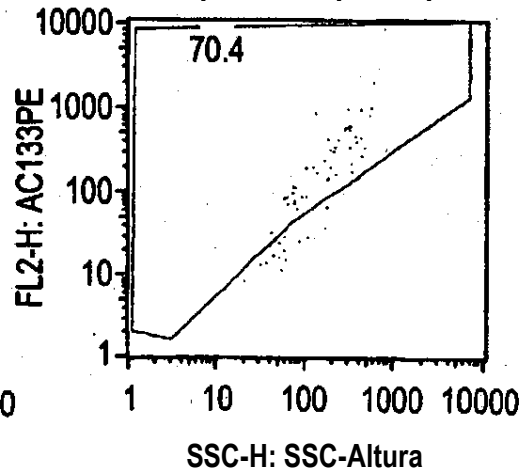


FIG. 17E

Análisis de la dispersión de luz de células
doblemente positivas para CD133 y Ep-CAM

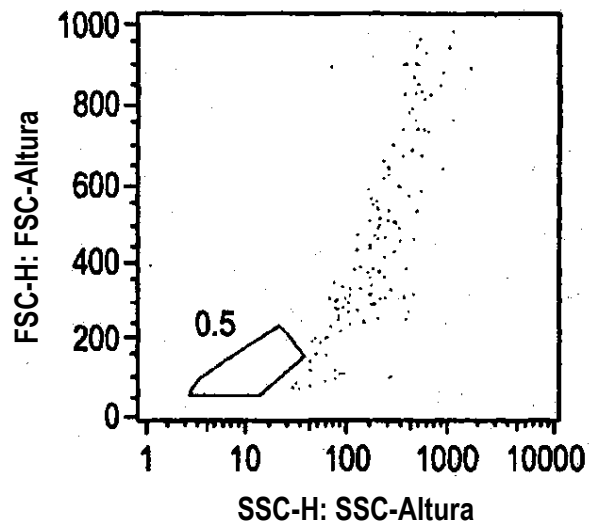


FIG. 18A

Análisis mediante FACS de la tinción de células hepáticas humanas reducidas en CD45 con un anticuerpo de control negativo

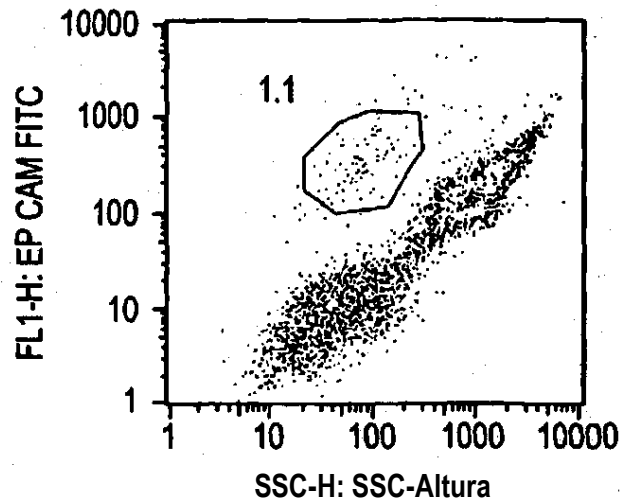


FIG. 18B

Análisis mediante FACS de la tinción de células hepáticas humanas reducidas en CD45 con un anticuerpo hacia Ep-CAM

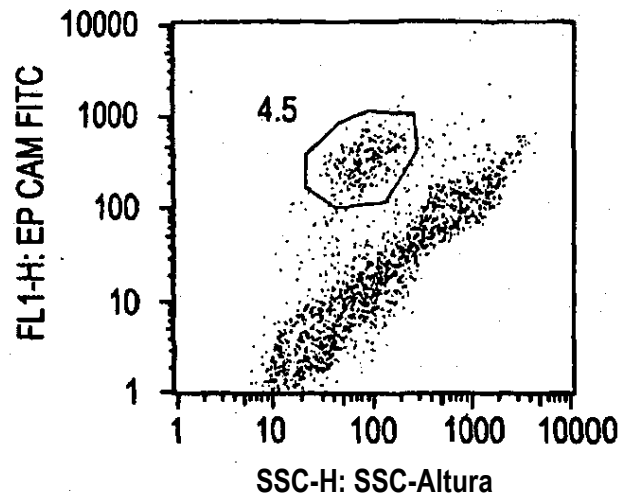


FIG. 19

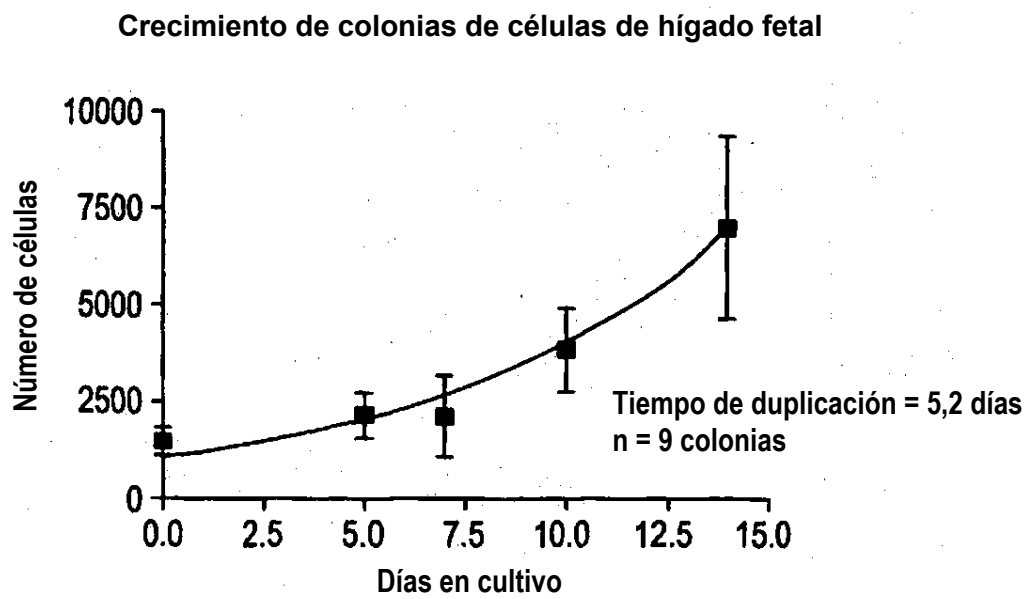
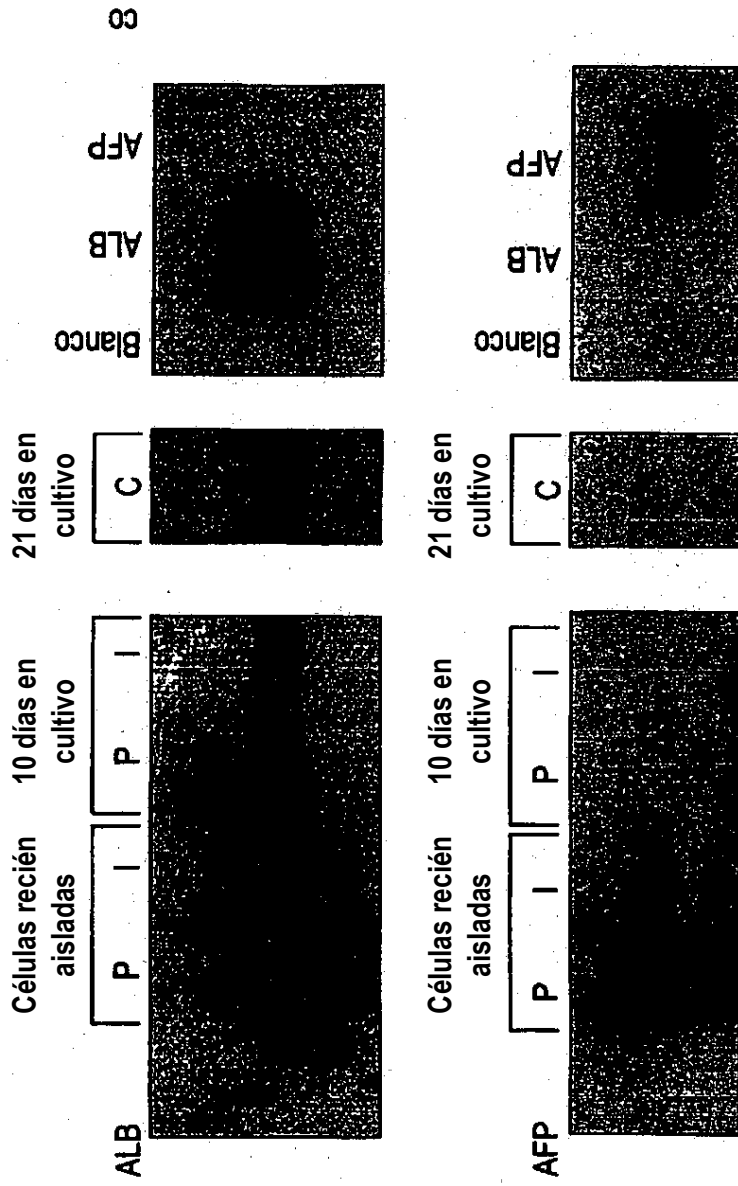


FIG. 20



P: Fracción de sedimento de Ficoll
 I: Fracción de interfase de Ficoll
 C: Células de colonias seleccionadas

Células cultivadas sobre plástico
 10 µg de proteína/pocillo