

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 167**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015** E 15305265 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** EP 3059307

54 Título: **Uso de una laminina para diferenciar células pluripotentes en células de linaje hepatocitario**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2019**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) (50.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR y**

**UNIVERSITÉ DE NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NGUYEN, TUAN HUY y**

**FOURRIER, ANGÉLIQUE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

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

**ES 2 703 167 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

Uso de una laminina para diferenciar células pluripotentes en células de linaje hepatocitario

## 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN:

La invención se refiere al campo de la diferenciación celular y la terapia celular.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:

10

Desde su descubrimiento, las células pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) y las células madre embrionarias humanas (hESC) se han investigado intensamente como una fuente renovable de cualquier célula especializada del cuerpo para reemplazar las células enfermas [1, 2]. Se han previsto para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, como cardiopatías graves [3], neurológicas [4], hepáticas [5] y enfermedades de la retina [6] y diabetes [7, 8].

15

La enfermedad hepática afecta a millones de personas en todo el mundo. Hasta la fecha, el trasplante de hígado es la única opción curativa cuando los pacientes presentan trastornos hepáticos metabólicos graves. Cerca de 25 000 pacientes están en las listas de espera para trasplante de hígado en Europa y Estados Unidos. Más de 5500 trasplantes de hígado se realizan en Europa cada año y las enfermedades metabólicas hereditarias representan el 26 % de las indicaciones (Registro Europeo de Trasplantes de Hígado). Sin embargo, solo un tercio de los pacientes en la lista de espera de hígado puede recibir un trasplante de hígado cada año y el número de pacientes que fallecieron mientras estaban en la lista de espera para trasplante de hígado (alrededor del 10 %) ha aumentado durante los últimos años como resultado de la escasez de órganos de donantes.

20

En los últimos 15 años, el trasplante de hepatocitos aislados de hígados cadavéricos en el hígado de los pacientes se ha convertido en una alternativa clínica al trasplante de hígado [9, 10], en particular para enfermedades metabólicas innatas donde se mantienen las funciones hepáticas y existe un solo defecto enzimático. La evidencia inequívoca de la función metabólica de los hepatocitos humanos trasplantados se demostró por primera vez en un paciente con Crigler-Najjar tipo 1 (CN1) [11]. Después del trasplante celular, el estado clínico y la calidad de vida del paciente mejoraron con la restauración del 5 % de la actividad de UGT1A1, lo que llevó a una reducción del 50 % en la bilirrubinemia y en el tratamiento fototerapéutico. Este estudio seminal abrió el camino para tratar a más de 40 pacientes afectados principalmente por trastornos del ciclo de urea y CN1, además de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo 1, enfermedad de Refsum infantil, colestasis intrahepática familiar tipo 2 progresiva y hemofilia tipo VII [9]. El trasplante de hepatocitos permitió evitar nuevos daños neurológicos en algunos niños mientras esperaban un trasplante de hígado. Una cantidad relativamente pequeña de hepatocitos infundidos ( $1,5 - 2 \times 10^9$  células) fue suficiente para mejorar la deficiencia metabólica de algunos pacientes afectados. Sin embargo, el efecto de estabilización de larga duración ciertamente requiere infusiones celulares repetidas [12]. Este enfoque sufre otras limitaciones importantes para su uso general y uso habitual en la práctica clínica. Los trasplantes de hígado disponibles se priorizan para el trasplante de hígado y solo los de calidad marginal se utilizaron para el aislamiento de hepatocitos. Por lo tanto, los hepatocitos aislados son de calidad y cantidad variables. Se desdiferencian rápidamente y no pueden expandirse en el cultivo y no toleran bien la crioconservación. En conjunto, estas limitaciones enfatizan la necesidad de explorar otras fuentes de células hepáticas humanas funcionales.

Estos últimos años, varios grupos informaron la diferenciación *in vitro* de hESCs e hiPSCs en células similares a hepatocitos (HLC) utilizando diversas condiciones de cultivo que imitan las etapas de desarrollo embrionario del hígado [5, 13-21]. Las HLC no mostraron funciones de hepatocitos completamente maduros, pero tenían un fenotipo más cercano a los hepatocitos humanos fetales, expresando por ejemplo AFP [22]. Pueden injertar, expandir en cierta medida y mantener la funcionalidad hepática después del trasplante en los hígados de animales inmunocomprometidos que fueron lesionados químicamente, irradiados o manipulados genéticamente para dar una ventaja de crecimiento selectivo a los hepatocitos trasplantados, como los ratones que sobreexpresan el activador de plasminógeno tipo uroquinasa para inducir una lesión hepática receptora constitutiva y estímulos regenerativos [5, 14, 17, 23-25].

Algunos estudios investigaron el potencial terapéutico de las HLC y trataron con éxito varios modelos murinos de insuficiencia hepática letal inducida químicamente [26-33]. Sin embargo, el hígado tiene una capacidad notable para regenerarse a partir de hepatocitos endógenos. Por lo tanto, un apoyo temporal de las funciones metabólicas hepáticas por las HLC es suficiente para rescatar a los ratones de la insuficiencia hepática aguda. Por el contrario, para el tratamiento de enfermedades hepáticas hereditarias, las HLC deben diferenciarse completamente *in vivo* y ser funcionales a largo plazo para expresar las funciones metabólicas hepáticas maduras que faltan en los animales

60

enfermos. Hasta ahora, no se ha demostrado todavía la corrección metabólica exitosa de un animal que modela una enfermedad hepática hereditaria en la cual las HLC trasplantadas no tienen una supervivencia selectiva y una ventaja de crecimiento en los hígados receptores.

- 5 La rata Gunn, un animal de CN1, tiene una mutación natural en UGT1A1 que causa una pérdida completa de la actividad de UGT1A1 e hiperbilirrubinemia poco después del nacimiento. La ausencia total de conjugados de bilirrubina en la bilis proporciona una lectura fácil, inequívoca y sensible para evaluar la restauración de la actividad de UGT1A1. Por lo tanto, la rata Gunn constituye un modelo inestimable y conveniente para seguir la maduración de células hepáticas *in vivo* y el potencial terapéutico de los hepatocitos trasplantados. Al igual que en los pacientes  
10 con CN1, una restauración parcial de la actividad de UGT1A1 después del trasplante de hepatocitos produce una corrección metabólica significativa [37-39].

15 Antes de considerar las HLC para uso clínico, un problema crucial es también producirlas utilizando un protocolo de diferenciación hepática compatible con las BPF (Buenas Prácticas de Fabricación). Los protocolos actuales de diferenciación hepática habitualmente contienen medio condicionado por células alimentadoras, suero, matrices derivadas de animales (como Matrigel®), células alimentadoras de ratón, vectores virales para mejorar la diferenciación hepática o moléculas pequeñas que no están disponibles en las BPF [15, 34 -36]. Todos los cuales son fuentes de factores desconocidos que hacen que los tejidos resultantes sean incompatibles con futuras aplicaciones clínicas.

20 En consecuencia, existe una demanda clínica de hepatocitos humanos para terapias de células alogénicas. Las células madre pluripotentes han sido investigadas intensamente como una fuente renovable de HLC trasplantables. Sin embargo, todavía se espera la demostración de que las HLC podrían tratar una enfermedad hepática metabólica hereditaria en ausencia de alguna ventaja de crecimiento selectivo de las células trasplantadas sobre los hepatocitos  
25 de roedores residentes. Además, las HLC generadas anteriormente se produjeron utilizando protocolos que las hacen inadecuadas para aplicaciones clínicas.

Recientemente, lamininas como la laminina-521 y la laminina-111 se han descrito como una matriz relevante para el cultivo celular, más particularmente para mantener las propiedades funcionales del cultivo *in vitro* a largo plazo de  
30 células de interés tales como células pluripotentes o HLC, pero sin embargo, las lamininas nunca se han descrito ni sugerido como capaces de inducir y / o mejorar la diferenciación hepática.

Por lo tanto, la solicitud de patente internacional WO 2012/080844 se refiere a un nuevo uso de la laminina-521. De hecho, la laminina-521 puede mantener las células madre en pluripotencia *in vitro*, permitir la autorrenovación y  
35 permitir la supervivencia de una única célula de células madre embrionarias humanas. Cuando las células madre embrionarias pluripotentes humanas se cultivan en placas recubiertas con laminina-521 recombinante en ausencia de inhibidores de diferenciación o células alimentadoras, las células madre embrionarias proliferan y mantienen su pluripotencia.

40 Además, se ha demostrado que las células similares a hepatoblastos humanos pueden generarse primero a partir de células pluripotentes en platos recubiertos con Matrigel (inducción de diferenciación hepática) y luego cultivarse en platos recubiertos con laminina-111 para expandirlas durante más de 3 meses mientras mantienen la capacidad potencial de diferenciarse tanto en células similares a hepatocitos como en células similares a colangiocitos [36].

#### 45 RESUMEN DE LA INVENCION:

En un primer aspecto, la invención se refiere al uso *in vitro* de una laminina (LN) como matriz para la diferenciación hepática.

- 50 En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso *in vitro* de una LN para inducir y/o mejorar la diferenciación de una población de células pluripotentes o una población de células multipotentes o una población de células endodérmicas definitivas (DE) en una población de células de linaje hepatocitario.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para inducir la diferenciación hepática  
55 humana que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una población de células DE humanas, y (ii) cultivar la población en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatoblastos humanos, y (iii) cultivar opcionalmente dicha población de células similares a hepatoblastos humanos sobre un  
60 soporte recubierto con una laminina en un medio de maduración hepática para producir una población de células

similares a hepatocitos fetales humanos.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para inducir la diferenciación hepática que comprende las etapas de:

5

(i) proporcionar una población de células pluripotentes humanas, (ii) cultivar la población en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción endodérmica para producir una población de células DE humanas, (iii) cultivar dicha población de células DE humanas en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatoblastos humanos, y (iv) cultivar opcionalmente  
10 dicha población de células similares a hepatoblastos humanos en un soporte recubierto con una laminina en un medio de maduración hepática para producir una población de células similares a hepatocitos fetales humanos.

En un quinto aspecto, la descripción se refiere a una población de células similares a hepatoblastos humanos obtenidas mediante el procedimiento de la invención.

15

En un sexto aspecto, la descripción se refiere a una población de células similares a hepatoblastos humanos de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano.

En un séptimo aspecto, la descripción se refiere a una población de células similares a hepatocitos fetales humanos  
20 obtenidas mediante el procedimiento de la invención.

20

En un octavo aspecto, la descripción se refiere a un kit para inducir la diferenciación hepática humana, que comprende un soporte recubierto con una laminina, BMP4 y un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), tal como FGF2 o FGF10.

25

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La invención aborda estas necesidades, ya que se refiere a la identificación de un medio químicamente definido capaz de diferenciar una población de células pluripotentes o una población de células endodérmicas definitivas  
30 (DE) en una población de células de linaje hepatocitario. Los inventores han demostrado de manera sorprendente que la laminina-111 es tan eficiente como Matrigel para iniciar y apoyar la diferenciación hepática de hiPSC en nuestras condiciones de cultivo, pero con una matriz recombinante.

30

Los inventores han demostrado que la laminina-521 (LN-521) también es útil como matriz y permite una mejor  
35 diferenciación de hiPSC en endodermo definitivo y HLC.

35

De hecho, los inventores han producido hepatoblastos derivados de células madre pluripotentes humanas (IDHB) en protocolos sin xeno, sin alimentadores y químicamente definidos utilizando laminina-111 recombinante (LN-111) como matriz extracelular para iniciar y apoyar el proceso de diferenciación hepática. Estas IDHB con un conjunto  
40 particular de marcadores (combinación de marcadores expresados o no expresados) fueron trasplantadas en el hígado de la rata Gunn, un modelo animal para el síndrome de Crigler-Najjar, que se caracteriza por altos niveles de bilirrubina no conjugada. Después del trasplante celular, mostraron una corrección significativa de la hiperbilirrubinemia, que se mantuvo estable durante los 6 meses de estudio sin eventos adversos. También mostraron que las IDHB trasplantadas se sometieron a una maduración adicional *in situ* para restaurar la función  
45 hepática metabólica deficiente (glucuronidación de bilirrubina por UGT1A1). Para concluir, demostraron por primera vez la eficacia de un regenerativo basado en hiPSC con un protocolo compatible con BPF para tratar una enfermedad metabólica hepática hereditaria en ausencia de cualquier ventaja de crecimiento selectivo de las células trasplantadas sobre los hepatocitos residentes, que es la situación encontrada en el trasplante de hepatocitos en humanos.

50

Procedimientos de diferenciación hepática y usos de lamininas

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere al uso de una laminina (LN) como matriz para la  
55 diferenciación hepática.

55

La invención también se refiere al uso de una LN para inducir y/o mejorar la diferenciación de una población de células pluripotentes, una población de células multipotentes o una población de células endodérmicas definitivas (DE) en una población de células de linaje hepatocitario.

60 Como se usa en el presente documento, el término "laminina" (LN) se refiere a una proteína de una familia de

glicoproteínas heterotriméricas que residen principalmente en la lámina basal. Funcionan a través de las interacciones de unión con los receptores celulares vecinos en un lado, y al unirse a otras moléculas de laminina u otras proteínas de la matriz como los colágenos, los nidógenos o los proteoglicanos. Las moléculas de laminina también son moléculas de señalización importantes que pueden influir fuertemente en el comportamiento y la función celular. Las lamininas son importantes tanto para mantener el fenotipo de células/tejidos como para promover el crecimiento y la diferenciación celular en la reparación y el desarrollo de tejidos. Las lamininas son proteínas grandes, de múltiples dominios, con una organización estructural común. La molécula de laminina integra varias funciones interactivas de matriz y célula en una molécula. Una molécula de proteína laminina comprende una subunidad de cadena  $\alpha$ , una subunidad de cadena  $\beta$  y una subunidad de cadena  $\gamma$ , todas juntas en un trímero a través de un dominio de bobina en espiral. Las doce cadenas de subunidades de laminina conocidas pueden formar al menos 15 tipos de lamininas triméricas en tejidos nativos. Dentro de las estructuras de laminina trimérica hay dominios identificables que poseen actividad de unión hacia otras moléculas de laminina y de lámina basal, y receptores unidos a la membrana.

15 Debe observarse además que el término "laminina" comprende la laminina intacta, como cadenas separadas o como fragmentos de la misma. Como se usa en el presente documento, el término "intacta" se refiere a la proteína que se compone de todos los dominios de la cadena  $\alpha$ , la cadena  $\beta$  y la cadena  $\gamma$ , con las tres cadenas unidas entre sí para formar la estructura heterotrimérica. La proteína no se divide en cadenas, fragmentos o dominios funcionales separados. Por ejemplo, la laminina-111 y la laminina-521 (como se describen a continuación) son proteínas intactas. Como se usa en el presente documento, el término "cadena" se refiere a la totalidad de la cadena alfa, beta o gamma de la proteína laminina. Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a cualquier fragmento de proteína que contiene uno, dos o tres dominios funcionales que poseen actividad de unión a otra molécula o receptor. Sin embargo, una cadena no debe considerarse un fragmento porque cada cadena posee más de tres dominios de este tipo. Del mismo modo, una proteína laminina intacta no debe considerarse un fragmento. Los ejemplos de dominios funcionales incluyen los dominios I, II, III, IV, V, VI y el dominio G.

Existen cinco cadenas alfa diferentes, tres cadenas beta y tres cadenas gamma que en tejidos humanos se han encontrado en al menos quince combinaciones diferentes. Estas moléculas se denominan laminina-1 a laminina-15 en función de su descubrimiento histórico, pero una nomenclatura alternativa describe las isoformas en función de su composición de cadena, por ejemplo, la laminina-111 (laminina-1) que contiene las cadenas alfa-1, beta-1 y gamma-1. Se han identificado cuatro grupos estructuralmente definidos de familias de lamininas. El primer grupo de cinco moléculas de laminina identificadas comparten las cadenas  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  y varían según su composición de cadena  $\alpha$  (cadena  $\alpha 1$  a  $\alpha 5$ ). El segundo grupo de cinco moléculas de laminina identificadas, incluida la laminina-521, comparten la cadena  $\beta 2$  y  $\gamma 1$  y varían nuevamente según su composición de cadena  $\alpha$ . El tercer grupo de moléculas de laminina identificadas tiene un miembro identificado, laminina-332, con una composición de cadena de  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ . El cuarto grupo de moléculas de laminina identificadas tiene un miembro identificado, laminina-213, con la composición de cadena  $\gamma 3$  recién identificada ( $\alpha 2\beta 1\gamma 3$ ).

Se han identificado al menos 15 subtipos (o "isoformas") de laminina (LN), según su composición de cadena, que incluyen LN-111 ( $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ), LN-121 ( $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ ), LN-211 ( $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ ), LN-213 ( $\alpha 2\beta 1\gamma 3$ ), LN-221 ( $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ ), LN-311 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 1$ ), LN-321 ( $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ ), LN-332 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ), LN-411 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ), LN-421 ( $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ ), LN-423 ( $\alpha 4\beta 2\gamma 3$ ), LN-511 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ), LN-521 ( $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ ), LN-522 ( $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ ) y LN-523 ( $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ ).

En una realización de la invención, dicha laminina se selecciona del grupo que consiste en laminina-111 (LN-111), laminina-211 (LN-211), laminina-332 (LN-332), laminina-411 (LN-411), laminina-421 (LN-421), laminina-511 (LN-511) y laminina-521 (LN-521).

En la invención, dicha laminina es una laminina humana.

50 En una realización de la invención, dicha laminina es una laminina humana recombinante.

En una realización preferida de la invención, dicha laminina es la laminina-111 humana recombinante (LN-111) o la laminina-521 humana recombinante (LN-521).

55 Como se usa en el presente documento, el término polipéptido "recombinante" se refiere a un polipéptido que se produce por expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos.

60 Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se genera preferentemente por expresión a partir de un ácido nucleico codificante en una célula huésped. Se puede usar cualquier célula huésped, dependiendo de los

requisitos individuales de un sistema particular. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células de plantas, levaduras y sistemas de baculovirus.

Las lamininas humanas recombinantes, tales como la LN-111 o LN-521 humana recombinante pueden adquirirse de Biolamina, Sundbyberg, Suecia.

En una realización de la invención, la laminina se recubre en el soporte, tal como una placa de 0,5 a 50 microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ), preferentemente de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ , más preferentemente a 5  $\mu\text{g/ml}$ .

10 Como se usa en el presente documento, el término "matriz" se refiere a un componente / material (natural, sintético o una combinación de los mismos) que forma una red polimérica que proporciona a células cultivadas *in vitro* (por ejemplo, en un recipiente de cultivo tal como un recipiente de plástico plano) ambientes fisiológica y morfológicamente relevantes similares a uno *in vivo* para una biología celular más realista y mejores interacciones intercelulares para el cultivo de células, facilitando la unión celular, el crecimiento y la diferenciación.

15 En una realización, la matriz comprende una laminina tal como la laminina-111 humana recombinante (LN-111) o la laminina-521 humana recombinante (LN-521) o una mezcla de las mismas.

En otra realización, la matriz comprende una mezcla de una laminina y otro componente (tal como proteínas de matriz que incluyen colágeno I y fibronectina).

20 Como se usa en el presente documento, el término "población" se refiere a una población de células, donde la mayoría (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, preferentemente al menos aproximadamente el 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 70 % e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %) del número total de células tiene las características especificadas de las células de interés para al menos uno de los marcadores de interés (por ejemplo, una población de células similares a hepatocitos humanos comprende al menos aproximadamente el 60 %, preferentemente al menos aproximadamente el 70 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 % de las células que tienen las funciones hepáticas y que expresan los marcadores expresados típicamente por las células similares a hepatocitos humanos enumerados a continuación, tales como, por ejemplo, el factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (HNF4 $\alpha$ )).

25 Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a una proteína, glicoproteína u otra molécula expresada en la superficie de una célula o en una célula, y que se puede usar para ayudar a identificar la célula. Un marcador generalmente puede ser detectado por procedimientos convencionales. Entre los ejemplos específicos, no limitativos, de procedimientos que pueden utilizarse para la detección de un marcador de superficie celular se encuentra la inmunocitoquímica, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y el análisis enzimático, además de los procedimientos de RT-PCR y biología molecular para detectar el ARNm de la proteína.

35 Como se usa en el presente documento, el término "pluripotente" se refiere a las células con la capacidad de dar lugar a la progenie que puede experimentar diferenciación, en condiciones apropiadas, en tipos de células que presentan colectivamente características asociadas con linajes celulares de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre pluripotentes pueden contribuir a los tejidos de un organismo prenatal, postnatal o adulto. Se puede utilizar una prueba estándar aceptada en la técnica, como la capacidad para formar un teratoma en ratones SCID de 8-12 semanas de edad, para establecer la pluripotencia de una población celular. Sin embargo, la identificación de varias características de células madre pluripotentes también se puede utilizar para identificar células pluripotentes.

40 En una realización de la invención, las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes humanas.

50 Más específicamente, las células madre pluripotentes humanas pueden expresar al menos algunos, y opcionalmente todos, los marcadores de la siguiente lista no limitativa: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1 -60, TRA-1 -81, TRA-2-49/6E, ALP, Sox 2, cadherina E, UTF-1, Oct4, Lin28, Rex1 y Nanog.

55 En una realización de la invención, las células madre pluripotentes humanas son células madre pluripotentes inducidas humanas(hiPSC).

60 Como se usa en el presente documento, el término "célula madre pluripotente inducida" se refiere a una célula madre pluripotente derivada artificialmente de una célula no pluripotente. Una célula no pluripotente puede ser una célula de menor potencia de autorrenovación y diferenciación que una célula madre pluripotente. Las células de

menor potencia pueden ser, pero no se limitan a, células madre somáticas, células progenitoras específicas de tejido, células primarias o secundarias. Las iPSC se han obtenido de manera reproducible mediante la reprogramación de diferentes tipos de células a través de la expresión forzada de la combinación de factores de transcripción OCT4, SOX2, c-MYC y KLF4 o mediante una combinación alternativa de factores, sustituyendo KLF4 y c-MYC por o agregando NANOG y LIN28 o cualquier procedimiento conocido por el experto para mejorar el proceso de reprogramación (mediante el uso de moléculas pequeñas como los inhibidores de ADN metiltransferasa (DNMT), ARNm, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "reprogramación" se refiere al proceso de cambiar el destino de una célula diana por el de un tipo de célula diferente, causado por la expresión de un pequeño conjunto de factores (o factores de reprogramación) en las células diana.

En la técnica, se han descrito procedimientos para generar células madre pluripotentes inducidas basado en vectores de expresión que codifican factores de reprogramación, véanse por ejemplo, los documentos WO2007/69666, EP2096169-A1 o WO2010/042490.

Los vectores de expresión para la expresión ectópica de los factores de reprogramación pueden ser, por ejemplo, un vector plásmido, un vector cósmido, un vector de cromosoma artificial bacteriano (BAC), un vector basado en transposones (como PiggyBac) o un vector viral.

Alternativamente, los factores de reprogramación, por ejemplo, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc o el correspondiente ADN o ARN codificante, se introducen en las células diana sin la integración del material genético exógeno en el ADN huésped, es decir, sin la introducción de la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula. Un vector de expresión tal como un vector plásmido puede administrarse en dichas células para la expresión ectópica del factor de reprogramación, en forma de ADN desnudo. Alternativamente, los ARN que codifican dichos factores de reprogramación, ya sean modificados químicamente o no, pueden introducirse en las células para reprogramarlos (véase, por ejemplo, Warren L, y col., 2010, Cell Stem Cell. 5 de nov.;7(5):618-30). Otros vectores de expresión se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 2009115295.

En una realización, las hiPSC se derivan de células obtenidas de un sujeto sano. En otra realización, las hiPSC se derivan de células obtenidas de un sujeto con una enfermedad hepática tal como una enfermedad hepática metabólica hereditaria y las células similares a hepatocitos muestran un fenotipo de la enfermedad.

Alternativamente, puede obtenerse una población de células de linaje hepatocitario de interés a partir de la diferenciación de células multipotentes, tales como células madre mesenquimales, en una matriz para la diferenciación hepática constituida por una laminina de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "multipotente" se refiere a células capaces de diferenciarse en al menos dos tipos de células diferenciadas terminalmente.

Como se usa en el presente documento, el término "células madre mesenquimales" generalmente se refiere a células estromales encontradas en un tejido diferenciado (especializado) y que son capaces de hacer copias idénticas de sí mismas (autorrenovación) durante el tiempo de vida del organismo y tienen un potencial de diferenciación multipotente (como la diferenciación en osteoblastos, adipocitos, condroblastos). Preferentemente, las células madre mesenquimales humanas que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención incluyen, por lo tanto, cualquier célula madre humana multipotente adecuada (es decir, células con capacidad de autorrenovación y multipotencia) derivadas de cualquier tejido adecuado mediante cualquier procedimiento de aislamiento apropiado. Por ejemplo, las células madre mesenquimales humanas que se pueden utilizar en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células inducibles adultas multilíneas (MIAMI) (D'Ippolito y col., J. Cell Sci., 2004, 117): 2971-2981), MAPC (también conocido como MPC) (Reyes y col., Blood, 2001, 98: 2615-2625), células madre derivadas de sangre de cordón umbilical (Kogler G y col., J. Exp. Med., 2004, 200(2): 123-135), mesoangioblastos (Sampaoli M y col., Nature, 2006, 444(7119): 574-579; Dellavalle A y col., Nat. Cell Biol., 2007, 9: 255-267) y células madre amnióticas (De Coppi P y col., Nat Biotechnol 2007, 25:100-106). Además, los bancos de sangre del cordón umbilical (por ejemplo, Établissement Français du Sang, en Francia) proporcionan fuentes seguras y fáciles de conseguir de dichas células para el trasplante.

Alternativamente, puede obtenerse una población de células de linaje hepatocitario a partir de la diferenciación de células aisladas de hígados humanos adultos (por ejemplo, células progenitoras de hepatocitos) en una matriz para la diferenciación hepática constituida por una laminina. Como otra alternativa, puede obtenerse una población de células de linaje hepatocitario de interés a partir de la conversión de células somáticas, tales como fibroblastos, en

una matriz para la diferenciación hepática constituida por una laminina.

Como se usa en el presente documento, los términos "células de linaje hepatocitario" o "células similares a hepatocitos" (HLC) se refieren a células obtenidas mediante la diferenciación de células pluripotentes, células endodérmicas u otro tipo de células, tales como células multipotentes, de la manera descrita. Las células diferenciadas tienen al menos una entre una variedad de características fenotípicas distintivas de progenitores de hepatocitos conocidos, hepatoblastos, hepatocitos fetales y maduros, como se proporciona más adelante en esta descripción. El uso de este término no implica ninguna limitación particular con respecto al fenotipo celular, marcadores celulares, función celular o capacidad proliferativa, a menos que se requiera explícitamente. Las células de linaje hepatocitario expresan marcadores hepáticos que incluyen, entre otros, el factor nuclear hepatocitario alfa 4 (HNF4 $\alpha$ ), albúmina (ALB), alfa-fetoproteína (AFP), citocromo P450 y citoqueratina 19 (CK19).

Procedimientos para determinar el nivel de expresión de los biomarcadores de la invención:

15 La determinación del nivel de expresión de marcadores, incluidos los marcadores hepáticos (por ejemplo, los genes HNF4 $\alpha$ , ALB, AFP, CK19) se puede realizar mediante una variedad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión determinado es un nivel de expresión relativo. Por ejemplo, la determinación comprende poner en contacto la muestra biológica con reactivos selectivos, como sondas o ligandos y detectar así la presencia o medir la cantidad, de ácidos nucleicos o polipéptidos de interés originalmente en dicha muestra biológica. El contacto puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado, como una placa, un plato de microtitulación, un tubo de ensayo, un pocillo, un vaso, una columna, etc. En realizaciones específicas, el contacto se realiza sobre un sustrato recubierto con el reactivo, como una matriz de ácido nucleico o una matriz de ligandos específica. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte adecuado que comprenda vidrio, plástico, nailon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de varias formas y tamaños, como un lámina, una membrana, una perla, una columna, un gel, etc. El contacto se puede realizar en cualquier condición adecuada para que se forme un complejo detectable, como un híbrido de ácido nucleico o un complejo anticuerpo-antígeno, entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra biológica.

En una realización particular, el nivel de expresión de los genes biomarcadores puede determinarse determinando la cantidad de ARNm.

Los procedimientos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las células de interés tales como las HLC de la invención se extrae primero de acuerdo con procedimientos estándar, por ejemplo, utilizando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas de unión a ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta luego mediante hibridación (por ejemplo, análisis por hibridación Northern) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Se prefiere la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real es particularmente ventajosa.

En otra realización, el nivel de expresión de los genes biomarcadores puede determinarse determinando la cantidad de proteína codificada por dichos genes.

Dichos procedimientos comprenden poner en contacto la muestra biológica con un ligando de unión capaz de interactuar selectivamente con la proteína presente en dicha muestra. El ligando de unión es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal.

Por ejemplo, el nivel de una proteína biomarcadora tal como HNF4 $\alpha$ , ALB, AFP y CK19 puede medirse mediante técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas estándar, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competencia, reacción directa o tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones Western; pruebas de aglutinación; inmunoensayos de marcado enzimático y mediados, como los ELISA; ensayos tipo biotina / avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación.

Las condiciones del cultivo celular pueden incluir uno o más componentes adicionales para proporcionar un entorno de apoyo durante la diferenciación dirigida en el tipo de célula diana diferenciada (por ejemplo, células de linaje hepatocitario). Los procedimientos para obtener una población de células diana diferenciadas incluyen además una etapa de inducción de la diferenciación. La inducción de la diferenciación se puede lograr cambiando la composición de los factores de crecimiento en el medio de cultivo en una o más etapas de la diferenciación como se describe a continuación.

Por consiguiente, en un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para inducir la diferenciación



hepática humana que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una población de células endodérmicas humanas definitivas (DE), y (ii) cultivar la población en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatoblastos humanos.

La invención también se refiere a un procedimiento para obtener células similares a hepatoblastos humanos que comprende las etapas de:

- 10 (i) proporcionar una población de células DE humanas, y (ii) cultivar la población en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatoblastos humanos.

Como se usa en el presente documento, el término "células endodérmicas definitivas" se refiere a las células que expresan marcadores bioquímicos característicos, que incluyen pero no se limitan a Sox 17 y FoxA2 y no expresan nanog.

Como se usa en el presente documento, los términos "células similares a hepatoblastos" (HB) o "células progenitoras hepáticas" son intercambiables y se refieren a células que expresan marcadores bioquímicos característicos, que incluyen, entre otros, factor nuclear hepatocitario 4 alfa (HNF4 $\alpha$ ), citoqueratina 19 (CK19 ) y citocromo P450 3A7 (CYP3A7) y que no expresan o no expresan sustancialmente alfa-fetoproteína (AFP) y que no expresan albúmina (ALB), alfa-1 antitripsina (AAT), citocromo P450 3A7 (CYP3A7) y difosfato de uridina (UDP)-glucuronosil transferasa 1A1 (UGT1A1).

Como se usa en el presente documento, el término "no sustancialmente" se refiere a una población de células similares a hepatoblastos que expresan un bajo nivel de una proteína de interés tal como AFP. Por consiguiente, dichas células solo pueden expresar una cantidad baja o una cantidad de proteína AFP no detectable por ELISA, como varios picogramos (pg) que está por debajo del límite de detección (LDD) para AFP por ELISA. Sin embargo, debe observarse además que puede detectarse una baja cantidad de ARNm de AFP mediante RT-PCR (pero dicha cantidad es insuficiente para detectar al final la expresión de la proteína AFP).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "medio de inducción hepática" o "medio de cultivo que induce la diferenciación hepática" se refieren a un medio de cultivo que es capaz de inducir la diferenciación del endodermo definitivo en células similares a hepatoblastos (y por lo tanto, capaz de inducir la expresión de marcadores hepáticos tales como HNF4 $\alpha$ , CK19 y CYP3A7).

Como se usa en este documento, el término "medio de cultivo" se refiere a cualquier medio capaz de soportar el crecimiento y la diferenciación de células endodérmicas definitivas en células progenitoras hepáticas. Las formulaciones de medios preferidas que apoyarán el crecimiento y la diferenciación de las células endodérmicas definitivas en células progenitoras hepáticas incluyen un medio químicamente definido (MQD).

Como se usa en el presente documento, el término "medio químicamente definido" (MQD) se refiere a una solución nutritiva para cultivar células que contiene solo componentes específicos, preferentemente componentes de estructura química conocida. Un medio químicamente definido es un medio sin suero y sin alimentador. Como se usa en este documento, "sin suero" se refiere a un medio de cultivo que no contiene suero agregado. Como se usa en este documento, "sin alimentador" se refiere a un medio de cultivo que no contiene células alimentadoras agregadas.

El medio de cultivo puede ser un medio a base de agua que incluye una combinación de sustancias como sales, nutrientes, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas como citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, todos los cuales son necesarios para la supervivencia celular. Por ejemplo, un medio de cultivo puede ser un medio de cultivo de tejido sintético como el RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) o el CMRL-1066 (Laboratorio de investigaciones médicas de Connaught) para uso humano, complementado con los aditivos necesarios en caso necesario, como se describe más adelante (sección Ejemplos) como el B27. El suplemento B-27 (Invitrogen) contiene, entre otros constituyentes, SOD, catalasa y otros antioxidantes (GSH) y ácidos grasos únicos, como el ácido linoleico, el ácido linolénico y los ácidos lipoicos.

La etapa de cultivo de células DE con el medio de inducción hepática se llevará a cabo durante el tiempo necesario para la producción de células similares a hepatoblastos. La duración de esta etapa de cultivo puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, durante el cultivo, el experto en la técnica puede monitorizar las

- células cultivadas para detectar la ausencia de al menos una expresión de los marcadores expresados únicamente por células endodérmicas definitivas (DE) (por ejemplo, Sox17 y FoxA2) y / o por la expresión de marcadores expresados específicamente por células similares a hepatoblastos (por ejemplo, HNF4 $\alpha$ , CK19, CYP3A7). Cuando no se puede detectar la expresión de uno o varios marcadores específicos de células DE y / o se detecta la expresión de uno o varios marcadores específicos de células similares a hepatoblastos, se puede detener el cultivo con el medio de inducción hepática. La monitorización de estos marcadores se puede realizar mediante, por ejemplo, el análisis por RT-PCR del ARN extraído de células cultivadas con cebadores específicos, el análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos de los marcadores y FACS o cualquier procedimiento para detectar el ARNm correspondiente a las proteínas.
- 5 Típicamente, la etapa ii) se puede llevar a cabo durante 3 a 10 días, preferentemente 6 días.
- 10 Si es necesario, el medio de cultivo se puede renovar, parcial o totalmente, a intervalos regulares. Típicamente, el medio de cultivo de la invención se puede reemplazar por medio de cultivo fresco cada dos días, durante 6 días.
- 15 Las células similares a hepatoblastos producidas por el procedimiento anterior se pueden aislar y / o purificar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo FACS.
- 20 El término "factor de crecimiento familiar de FGF", como se usa en relación con el procedimiento para obtener células humanas similares a hepatoblastos, se refiere a cualquier sustancia de origen natural (por ejemplo, una proteína) capaz de estimular el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación celular mediante la unión con un receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Al unirse a un FGFR, la sustancia aumenta, por ejemplo, la fosforilación de tirosina de dicho receptor.
- 25 En una realización de la descripción, el medio de inducción hepática es un medio químicamente definido que comprende proteína 4 morfogenética ósea (BMP4) y un FGF.
- 30 En una realización preferida de la descripción, el medio de inducción hepática es un medio químicamente definido que comprende proteína 4 morfogenética ósea (BMP4) y factor 10 de crecimiento familiar (FGF10).
- 35 La proteína FGF10 humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Uniprot O15520. Típicamente, el FGF10 se agrega al medio de cultivo de la invención en una concentración que oscila entre 1 y 50 ng/ml, preferentemente a aproximadamente 10 ng/ml. El FGF10 puede adquirirse de Peprotech o Miltenyi Biotec.
- 40 La proteína BMP4 humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Uniprot P12644. Típicamente, la BMP4 se agrega al medio de cultivo de la invención en una concentración que oscila entre 1 y 50 ng/ml, preferentemente a aproximadamente 10 ng/ml. La BMP4 puede adquirirse de R&D systems.
- 45 En otra realización de la descripción, el medio de inducción hepática es un medio químicamente definido que comprende proteína 4 morfogenética ósea (BMP4) y FGF2 (también conocido como factor básico de crecimiento de fibroblastos).
- 50 La proteína FGF2 humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Uniprot P09038. Típicamente, el FGF2 se agrega al medio de cultivo de la invención en una concentración que oscila entre 1 y 50 ng/ml, preferentemente a aproximadamente 10 ng/ml. El FGF2 puede adquirirse de Peprotech o Miltenyi Biotec.
- 55 En algunas realizaciones de la invención, el cultivo de la población de células DE puede incluir adicionalmente el paso de la población de células DE antes o durante el proceso de diferenciación. El proceso de paso de la población de células puede repetirse una o más veces, y puede incluir células disociadas soportadas por la matriz de unión, diluyendo las células disociadas en los medios. Por consiguiente, la etapa ii) puede comprender además una etapa de paso de al menos una vez y/o el recuento celular.
- En algunas realizaciones de la invención, para aumentar la clonogenicidad, las células pueden tratarse con un inhibidor de ROCK 4 horas antes de la disociación y 24 horas después del recubrimiento.
- Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de proteína quinasa asociada a Rho (ROCK)" se refiere a un compuesto (natural o sintético) que inhibe la actividad de ROCK1 y / o ROCK2, tal como la actividad de

la quinasa.

En una realización particular de la invención, el inhibidor de ROCK es Y27632 (Watanabe y col. Nature Biotechnology 25, 681 - 686 (2007)).

5

Típicamente, la concentración de Y27632 en el medio de cultivo puede ser de 1 a 100 ng/ml, preferentemente alrededor de 10 ng/ml.

En una realización de la invención, dicha laminina se selecciona del grupo que consiste en LN-111, LN-211, LN-332, 10 LN-411, LN-421, LN-511 y LN-521.

En la invención, dicha laminina es una laminina humana.

En una realización de la invención, dicha laminina es una laminina humana recombinante.

15

En una realización de la invención, la laminina se recubre en el soporte, tal como una placa de 0,5 a 50 microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ), preferentemente de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ , más preferentemente a 5  $\mu\text{g/ml}$ .

El soporte es típicamente una superficie en un recipiente de cultivo.

20

En una realización de la invención, el soporte se selecciona del grupo que consiste en una placa, un portaobjetos, un matraz y similares. En una realización preferida de la invención, el soporte tiene al menos una porción de una superficie recubierta con una matriz de la invención, tal como LN-111 humana recombinante o LN-521 humana recombinante.

25

La invención también se refiere a un procedimiento para inducir la diferenciación hepática humana que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una población de células pluripotentes humanas, y (ii) cultivar la población en un soporte recubierto 30 con una laminina en un medio de inducción endodérmica para producir una población de células DE humanas.

La invención también se refiere a un procedimiento para células DE humanas que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una población de células pluripotentes humanas, y (ii) cultivar la población en un soporte recubierto 35 con una laminina en un medio de inducción endodérmica para producir una población de células DE humanas.

La invención también se refiere a un procedimiento para inducir la diferenciación hepática humana que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una población de células pluripotentes humanas, (ii) cultivar la población en un soporte recubierto 40 con una laminina en un medio de inducción endodérmica para producir una población de células DE humanas, y (iii) cultivar dicha población de células DE humanas en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción hepática para producir una población de células humanas similares a hepatoblastos tempranos.

La invención se refiere además a un procedimiento para obtener células similares a hepatoblastos humanos que 45 comprende las etapas de:

(i) proporcionar una población de células pluripotentes humanas, (ii) cultivar la población en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción endodérmica para producir una población de células DE humanas, y (iii) 50 cultivar dicha población de células DE humanas en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatocitos humanos.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "medio de inducción endodérmica" o "medio de cultivo que induce la diferenciación endodérmica" se refieren a un medio de cultivo que es capaz de inducir la diferenciación de 55 células madres pluripotentes en células endodérmicas definitivas (y por lo tanto, capaz de inducir la expresión de marcadores endodérmicos, tales como Sox 17 y FoxA2).

En una realización preferida de la descripción, el medio de inducción endodérmica es un medio químicamente definido que comprende al menos activina A y opcionalmente WNT3A.

60

La activina A se conoce bien en la técnica y es un polipéptido dimérico que ejerce un rango de efectos celulares a través de la estimulación de la vía activina / nodal (Vallier y col., Cell Science 118: 4495-4509 (2005)). La proteína de activina A humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de GeneBank NP\_002183. La activina está disponible en fuentes comerciales (por ejemplo, Stemgent Inc. MA USA o Miltenyi Biotec).

Típicamente, la concentración de activina A en el medio de cultivo puede ser de 10 a 1000 ng/ml, preferentemente alrededor de 100 ng/ml.

10 La proteína WNT3A humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Uniprot P56704. Típicamente, la concentración de WNT3A en el medio de cultivo puede contener de 10 a 100 ng/ml de WNT3A, preferentemente alrededor de 50 ng/ml. La WNT3A puede adquirirse de Miltenyi Biotec.

La etapa de cultivo de células pluripotentes con el medio de inducción endodérmica se llevará a cabo durante el tiempo necesario para la producción del endodermo definitivo (DE). La duración de esta etapa de cultivo puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, durante el cultivo, el experto en la técnica puede monitorizar las células cultivadas para la expresión de marcadores expresados específicamente por el endodermo definitivo (DE) (por ejemplo, Sox 17 y FoxA2). Cuando se detecta la expresión de uno o varios marcadores específicos de células DE, se puede detener el cultivo con el medio de inducción hepática. La monitorización de estos marcadores se puede realizar mediante, por ejemplo, el análisis por RT-PCR del ARN extraído de células cultivadas con cebadores específicos, el análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos de los marcadores, ELISA y FACS o cualquier procedimiento para detectar el ARN / proteína / actividad correspondiente al marcador específico.

25 Típicamente, la etapa ii) se puede llevar a cabo durante 1 a 10 días, preferentemente 5 días.

Si es necesario, el medio de cultivo de la descripción se puede renovar, parcial o totalmente, a intervalos regulares. Típicamente, el medio de cultivo de la descripción se puede reemplazar por un medio de cultivo fresco de la descripción cada dos días, durante 5 días.

30 Las células similares a hepatoblastos producidas por el procedimiento anterior se pueden aislar y / o purificar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo FACS.

En una realización de la invención, dicha laminina se selecciona del grupo que consiste en LN-111, LN-211, LN-332, LN-411, LN-421, LN-511 y LN-521.

En la invención, dicha laminina es una laminina humana.

40 En una realización de la invención, dicha laminina es una laminina humana recombinante.

En una realización de la invención, la laminina se recubre en el soporte, tal como una placa de 0,5 a 50 microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ), preferentemente de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ , más preferentemente a 5  $\mu\text{g/ml}$ .

El soporte es típicamente una superficie en un recipiente de cultivo.

45 En una realización de la invención, el soporte se selecciona del grupo que consiste en una placa, un portaobjetos, un matraz y similares. En la invención, el soporte tiene al menos una porción de una superficie recubierta con una matriz de la invención, tal como LN-111 humana recombinante o LN-521 humana recombinante.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de células de hepatocitos fetales humanos que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una población de células pluripotentes humanas, (ii) cultivar la población en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción endodérmica para producir una población de células DE humanas, (iii) cultivar dicha población de células DE humanas en un soporte recubierto con una laminina en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatoblastos humanos, y (iv) cultivar la población de células similares a hepatoblastos humanos en un medio de maduración hepática para producir una población de células similares a hepatocitos fetales.

60 Como se usa en este documento, los términos "células similares a hepatocitos fetales" o "hepatoblastos

diferenciados" se usan en este documento de manera intercambiable y se refieren a células que expresan marcadores bioquímicos característicos, que incluyen pero no se limitan a HNF4 $\alpha$ , CYP3A7, AFP y CK19, y pueden expresar algunas proteínas hepáticas maduras, incluidas, pero no limitadas a, ALB, AAT, UGT1A1 y citocromo P450 3A4 (CYP3A4).

5

Como se usa en el presente documento, las expresiones "medio de maduración hepática" o "medio de cultivo que estimula la maduración hepática" se refieren a un medio de cultivo que es capaz de inducir la maduración de células similares a hepatoblastos a células similares a hepatocitos fetales.

10 En una realización preferida de la descripción, el medio de inducción hepática es un medio químicamente definido que comprende HGF y OSM.

Como se usa en el presente documento, el término "factor de crecimiento hepático" (HGF) se refiere a un factor de crecimiento que regula el crecimiento celular, la motilidad celular y la morfogénesis mediante la activación de una cascada de señalización de tirosina quinasa después de la unión al receptor proto-oncogénico c-MET. La proteína HGF humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Uniprot P14210.

15

Típicamente, el HGF se agrega al medio de maduración hepática a una concentración que varía de 1 a 100 ng/ml, preferentemente de 5 a 50 ng/ml, e incluso más preferentemente de alrededor de 20 ng/ml. El HGF puede adquirirse de Peprtech.

20

Como se usa en el presente documento, el término "oncostatina M" (OSM) se refiere a una citoquina que inhibe la proliferación de varias líneas de células tumorales. La proteína OSM humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Uniprot P13725.

25

Típicamente, la oncostatina M se agrega al medio de maduración hepática a una concentración que varía de 1 a 100 ng/ml, preferentemente de 5 a 50 ng/ml, e incluso más preferentemente de alrededor de 20 ng/ml. La OSM puede adquirirse de Miltenyi Biotec.

30

La etapa de cultivo de células similares a hepatoblastos con el medio de maduración hepática se llevará a cabo durante el tiempo necesario requerido para la producción de células similares a hepatocitos fetales. La duración de esta etapa de cultivo puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, durante el cultivo, el experto en la técnica puede monitorizar las células cultivadas para detectar la ausencia de expresión de marcadores de células madre pluripotentes (por ejemplo, Sox 2 y Nanog), la ausencia de expresión de marcadores específicos de endodermo definitivo (DE) (por ejemplo, Sox 17 y FoxA2), la expresión de marcadores específicos de hepatoblastos y/o la expresión de marcadores expresados específicamente por células similares a hepatocitos fetales (por ejemplo, AFP y ALB). Cuando se detecta la expresión de uno o varios marcadores específicos de células similares a hepatocitos fetales, se puede detener el cultivo con el medio de maduración hepática. La monitorización de estos marcadores se puede realizar mediante, por ejemplo, el análisis por RT-PCR del ARN extraído de células cultivadas con cebadores específicos, el análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos de los marcadores, ELISA y FACS o cualquier procedimiento para detectar el ARN / proteína / actividad correspondiente al marcador específico.

35

40

45 Típicamente, la etapa ii) se puede llevar a cabo durante 3 a 60 días, preferentemente 30 días.

Si es necesario, el medio de cultivo de la descripción se puede renovar, parcial o totalmente, a intervalos regulares. Típicamente, el medio de cultivo de la invención se puede reemplazar por un medio de cultivo fresco de la descripción cada dos días, durante 30 días.

50

Las células similares a hepatocitos fetales producidas mediante el procedimiento anterior se pueden aislar y / o purificar a través de cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo FACS.

En una realización de la invención, dicha laminina se selecciona del grupo que consiste en LN-111, LN-211, LN-332, LN-411, LN-421, LN-511 y LN-521.

55

En la invención, dicha laminina es una laminina humana.

En una realización de la invención, dicha laminina es una laminina humana recombinante.

60

En una realización de la invención, la laminina se recubre en el soporte, tal como una placa de 0,5 a 50 microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ), preferentemente de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ , más preferentemente a 5  $\mu\text{g/ml}$ .

El soporte es típicamente una superficie en un recipiente de cultivo.

5

En una realización de la invención, el soporte se selecciona del grupo que consiste en una placa, un portaobjetos, un matraz y similares. En la invención, el soporte tiene al menos una porción de una superficie recubierta con una matriz de la invención, tal como LN-111 humana recombinante o LN-521 humana recombinante.

10 Poblaciones de células similares a hepatoblastos humanos de acuerdo con la descripción y composiciones farmacéuticas que las comprenden

En otro aspecto, la descripción se refiere a una población de células similares a hepatoblastos humanos obtenidas mediante un procedimiento tal como se ha definido anteriormente.

15

La descripción también se refiere a una población de células similares a hepatoblastos humanos obtenidas mediante un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, donde dichas células expresan el factor nuclear hepatocitario 4 alfa (HNF4 $\alpha$ ) y no expresan o no expresan sustancialmente alfa-fetoproteína (AFP).

20 La descripción se refiere a una población de células similares a hepatoblastos humanos obtenidas mediante un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, donde dichas células expresan HNF4 $\alpha$ , citoqueratina 19 (CK19) y citocromo P450 3A7 (CYP3A7) y no expresan o no expresan sustancialmente AFP, albúmina (ALB), alfa-1 antitripsina (AAT), citocromo P450 3A4 (CYP3A4), difosfato de uridina (UDP)-glucuronosil transferasa 1A1 (UGT1A1).

25

En otro aspecto más, la descripción se refiere a una población de células similares a hepatocitos fetales humanos obtenidas mediante un procedimiento tal como se ha definido anteriormente.

30 La descripción también se refiere a una población de células similares a hepatocitos fetales humanos obtenidas mediante un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, donde dichas células expresan HNF4 $\alpha$ , CK19, CYP3A7, AFP, ALB, AAT y UGT1A1 y citocromo P450 3A4 (CYP3A4).

En una realización, las células similares a hepatocitos humanos (es decir, hepatoblastos o células similares a hepatocitos fetales o hepatocitos maduros) muestran un fenotipo normal.

35

En otra realización, las células similares a hepatoblastos humanos (es decir, hepatoblastos o células similares a hepatocitos fetales) muestran una mutación genética, en particular una mutación genética que afecta a proteínas clave dentro de las células similares a hepatoblastos humanos y que está asociada con una enfermedad hepática. Debe observarse que la mutación genética o el defecto que es responsable del fenotipo de la enfermedad puede

40 corregirse *in vitro* o *ex vivo*. Hay varias técnicas disponibles para corregir mutaciones genéticas o defectos en células aisladas de mamíferos.

Modificación genética de células similares a hepatoblastos humanos de la descripción

45 El término "genéticamente modificado" indica que las células similares a hepatocitos humanos (es decir, hepatoblastos o células similares a hepatocitos fetales o hepatocitos maduros) comprenden una molécula de ácido nucleico no presente de forma natural en células progenitoras hepáticas humanas tempranas no modificadas o una molécula de ácido nucleico presente en un estado no natural en dichas células progenitoras hepáticas tempranas humanas (por ejemplo, ampliadas). La molécula de ácido nucleico puede haberse introducido en dichas células o en  
50 un ancestro de las mismas (como iPS, que contiene una mutación genética asociada a una enfermedad hepática).

Se pueden utilizar varios enfoques para modificar genéticamente células similares a hepatocitos humanos, como la administración de genes mediada por virus, la administración de genes no mediada por virus, el ADN desnudo, los tratamientos físicos, etc. Para este fin, generalmente se incorpora el ácido nucleico en un vector, como un virus  
55 recombinante, un plásmido, fago, episoma, cromosoma artificial, etc.

En una realización particular de la descripción, las células similares a hepatocitos (HLC) o las células madre pluripotentes, se modifican genéticamente mediante un vector viral (o un virus recombinante) o un procedimiento no viral. En esta realización, el ácido nucleico heterólogo se introduce, por ejemplo, en un virus recombinante que luego  
60 se utiliza para infectar células similares a hepatocitos humanos (HLC). Se pueden utilizar diferentes tipos de virus

recombinantes, en particular el lentivirus.

En la descripción, dicho lentivirus codifica una proteína inmortalizadora, como SV40T, hTERT, CDK4, etc.

5 En la descripción, dicho lentivirus codifica una proteína de tipo salvaje (presentando dicha proteína generalmente una mutación genética asociada a la enfermedad en pacientes que padecen una enfermedad hepática) como la proteína de tipo salvaje antitripsina  $\alpha 1$  (AAT) o la familia UDP glucuronosiltransferasa 1, polipéptido A1 (UGT1A1). Otras mutaciones genéticas implicadas en enfermedades hepáticas han sido descritas previamente.

10 En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés (por ejemplo, una proteína inmortalizadora o una proteína de tipo salvaje usada para corregir un fenotipo de enfermedad) está unida operativamente a un promotor.

Alternativamente, dicho lentivirus codifica una proteína reportera o una proteína marcadora. Dicha proteína  
15 marcadora, que puede ser una proteína fluorescente o una proteína expresada en la superficie celular, permite la rápida identificación y el aislamiento de células similares a hepatocitos humanos (HLC) de interés.

La proteína marcadora puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en:

20 una proteína fluorescente, en particular la proteína fluorescente verde (GFP) o sus derivados, por ejemplo, la proteína fluorescente verde mejorada, las proteínas fluorescentes azules (EBFP, EBFP2, Azurita, mKalamal), las proteínas fluorescentes cian (ECFP, Cerúleo, CyPet) y las proteínas fluorescentes amarillas (YFP, EYFP, Citrina, Venus, YPet); y

25 cualquier proteína expresada en la superficie celular que no se expresa de forma natural por las HLC.

Como se usa en el presente documento, el término "enlazado operativamente" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico está "enlazada operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia  
30 nucleica de secuencia. Por ejemplo, un promotor está "enlazado operativamente" a una secuencia de codificación si el promotor causa la transcripción de la secuencia de codificación. En general, enlazado operativamente significa que las secuencias de ácido nucleico enlazadas son contiguas.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN que determina el  
35 sitio de iniciación de la transcripción para un ARN polimerasa. Un promotor puede comprender un promotor de ARN polimerasa III que puede proporcionar altos niveles de expresión constitutiva a través de una variedad de tipos de células y será suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia localizada distalmente, que es una secuencia enlazada al extremo 3' de la secuencia promotora en una célula. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, promotores constitutivos, regulados, específicos de tejido o ubicuos, que pueden ser de origen celular, viral o  
40 sintético.

En una realización, el promotor es un promotor constitutivo tal como el factor-1 alfa de elongación humano (EF-1 alfa), etc.

45 En otra realización, el promotor es un promotor específico del hígado tal como 1-antitripsina humana, albúmina, etc.

En otra realización, el promotor es una secuencia endógena (constitutiva o específica). En ese caso, la proteína de interés está enlazada al promotor endógeno mediante una tecnología de edición del genoma basada en el uso de una nucleasa artificial (por ejemplo: CRISPR/cas, ZFN, TALEN).

50

En otra realización, la modificación génica de células similares a hepatoblastos humanos se realiza mediante la tecnología de edición del genoma para modificar la secuencia génica endógena.

Es importante destacar que las células de linaje hepatocitario (HLC) son el objetivo de la enfermedad en una  
55 variedad de condiciones a menudo conocidas como "enfermedades hepáticas" (también denominadas "patología asociada con daño hepático"). Estos términos se refieren a cualquier enfermedad o condición clínica caracterizada por daño hepático, lesión, disfunción, defecto o anomalía. Por tanto, el término abarca, por ejemplo, lesiones, enfermedades degenerativas y enfermedades genéticas.

60 Las enfermedades hepáticas se están convirtiendo en una de las causas más comunes de mortalidad en los países

en desarrollo. Este grupo de enfermedades que atacan a las células del linaje hepatocitario, como los hepatocitos que representan las células hepáticas dominantes, abarca trastornos metabólicos hereditarios (como el síndrome de Crigler-Najjar tipo I, la enfermedad por almacenamiento de glucógeno, los defectos del ciclo de la urea, la hipercolesterolemia familiar, la tirosinemia y la enfermedad de Wilson), insuficiencia hepática crónica, así como 5 insuficiencia hepática aguda que puede ser causada por infección viral (en particular, infección por VHB o VHC), tóxicos (alcohol) y drogas o trastorno autoinmune (hepatitis autoinmune crónica, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria).

En otro aspecto, la descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende la población de 10 células similares a hepatoblastos humanos (por ejemplo, células similares a hepatoblastos o células similares a hepatocitos fetales) de acuerdo con la invención.

La composición farmacéutica puede incluir generalmente uno o más portadores, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes, disolventes y/o estabilizadores farmacéuticamente aceptables y aprobados. Dichas 15 sustancias auxiliares pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH o similares. Los portadores adecuados son típicamente moléculas grandes, de metabolismo lento, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos o similares. Esta composición farmacéutica puede contener aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona u otros 20 aditivos tales como antioxidantes o gases inertes, estabilizadores o proteínas recombinantes (por ejemplo, albúmina de suero humano) o vitaminas adecuadas para la administración *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otras reacciones perjudiciales 25 cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un portador no sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material envolvente o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

#### Procedimientos de cribado de la descripción

30 En otro aspecto, las células similares a hepatocitos humanos (es decir, hepatoblastos o células similares a hepatocitos fetales) de la descripción obtenidas de pacientes sanos o enfermos también pueden utilizarse ventajosamente para aplicaciones de cribado en la industria farmacéutica.

35 Dichas pruebas de cribado pueden utilizarse para buscar nuevos fármacos con aplicaciones clínicas o para pruebas de toxicología que evalúen la hepatotoxicidad de compuestos como los compuestos farmacéuticos candidatos. Las células similares a hepatoblastos humanos de acuerdo con la invención pueden ser útiles, por ejemplo, para generar modelos celulares de enfermedades hepáticas como se ha descrito anteriormente.

40 Por consiguiente, la descripción proporciona un procedimiento de cribado de un compuesto útil en el tratamiento de una enfermedad hepática que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una población de células similares a hepatoblastos humanos o células similares a hepatocitos fetales producida mediante un procedimiento de la invención con un compuesto de ensayo, y (b) determinar el 45 efecto del compuesto de ensayo en dichas células similares a hepatoblastos humanos o células similares a hepatocitos fetales.

Un aspecto adicional de la descripción se refiere a un procedimiento de cribado de compuestos que tienen un efecto hepatoprotector o hepatotóxico o hepatoproliferativo donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

50 (a) poner en contacto una población de células similares a hepatoblastos humanos o células similares a hepatocitos fetales producidas mediante un procedimiento de la invención con un compuesto de ensayo y; (b) comparar la supervivencia de las células de la etapa a) con la de una población de dichas células como se define anteriormente, cultivadas en ausencia de dicho compuesto de ensayo.

55 El término "hepatotóxico" se refiere a un compuesto que provoca una disminución en la supervivencia de las células progenitoras hepáticas. Se considera que un compuesto tiene un efecto hepatotóxico si el número de células viables cultivadas en presencia de dicho compuesto es menor que el número de células viables cultivadas en ausencia de dicho compuesto.

60



El término "hepatoprotector" se refiere a un compuesto que produce un aumento de la supervivencia de las células progenitoras hepáticas. Se considera que un compuesto tiene un efecto hepatoprotector si el número de células viables cultivadas en presencia de dicho compuesto es mayor que el número de células viables cultivadas en ausencia de dicho compuesto.

5

Típicamente, el efecto hepatoprotector se puede probar en ausencia de factores hepatotróficos. Alternativamente, el efecto hepatoprotector puede analizarse en presencia de un fármaco hepatotóxico conocido. Los fármacos hepatotóxicos conocidos incluyen, pero no se limitan a, amiodarona, metotrexato y nitrofurantoina.

10 El término "hepatoproliferativo" se refiere a un compuesto que produce un aumento de la proliferación de las células progenitoras hepáticas. Se considera que un compuesto tiene un efecto hepatoproliferativo si el número de células proliferativas cultivadas en presencia de dicho compuesto es mayor que el número de células viables cultivadas en ausencia de dicho compuesto. Típicamente, el efecto hepatoproliferativo se puede probar en ausencia de factores de crecimiento.

15

Compuestos de ensayo de la descripción

En una realización, el compuesto de ensayo puede seleccionarse del grupo que consiste en péptidos, proteínas, peptidomiméticos, moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros o ácidos nucleicos. Por ejemplo, el compuesto de ensayo de acuerdo con la descripción puede seleccionarse de una biblioteca de compuestos sintetizados previamente o de una biblioteca de compuestos cuya estructura se determina en una base de datos o de una biblioteca de compuestos que se han sintetizado *de novo*.

En una realización particular, el compuesto de ensayo puede seleccionarse de pequeñas moléculas orgánicas. Como se usa en el presente documento, el término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.); las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta 2000 Da y más preferentemente hasta aproximadamente 1000 Da.

30 En otra realización, el compuesto de ensayo puede seleccionarse del grupo que consiste en una biblioteca de ácidos nucleicos, que incluye, pero no se limita a, ARNsh, ARNm, ARNm.

Modelos animales

35 La disponibilidad de células similares a hepatoblastos que pueden derivarse de ES o iPS humanas permite además diseñar modelos *in vitro* e *in vivo* de enfermedades hepáticas humanas y virus hepatotrópicos, en particular hepatitis B o C. Más específicamente, se puede proporcionar un modelo *in vivo* de enfermedades hepáticas humanas y virus hepatotrópicos mediante la repoblación del hígado de un mamífero no humano con células progenitoras hepáticas humanas tempranas.

40

Por consiguiente, la descripción se refiere además al uso de células similares a hepatocitos humanos (es decir, células similares a hepatoblastos o células similares a hepatocitos fetales) obtenidas mediante un procedimiento de acuerdo con la descripción para producir un huésped mamífero no humano que comprende hepatocitos humanos funcionales.

45

Un procedimiento adecuado para producir un mamífero no humano quimérico que comprende hepatocitos humanos funcionales puede comprender la etapa que consiste en inyectar en el hígado dichas células similares a hepatocitos humanos de mamíferos no humanos (es decir, células similares a hepatoblastos o células similares a hepatocitos fetales) de acuerdo con la descripción. Para favorecer el injerto de las HLC, el mamífero no humano puede recibir

50 un tratamiento antimacrófago para controlar la defensa no adaptativa. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, administrando difosfonato de diclorometileno, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal de difosfonato de diclorometileno de liposoma encapsulado. Otras estrategias para favorecer el injerto de las HLC pueden depender de la estimulación de la regeneración del hígado antes de la inyección celular. Esto puede realizarse, por ejemplo, realizando una lesión hepática (por ejemplo, hepatectomía parcial, embolización química, irradiación hepática, hepatotoxinas, transgén) o administrando cualquier compuesto que estimule la proliferación de hepatocitos (factor de crecimiento de hepatocitos, hormona T3).

En otra estrategia, el injerto de las HLC también puede favorecerse al inhibir el potencial proliferativo de los hepatocitos endógenos en un hígado regenerado (animales jóvenes o hígado lesionado). Esto se puede llevar a

60 cabo, por ejemplo, administrando retrorsina (inyección intraperitoneal), mitomicina C (inyección intraperitoneal) o

hidrocloruro de propranolol (agua potable). Finalmente, el injerto de las HLC puede favorecerse administrando compuestos vasodilatadores. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, administrando trinitrato de glicerilo.

La descripción se refiere además a un mamífero no humano quimérico que comprende hepatocitos humanos 5 funcionales obtenidos u obtenibles mediante el procedimiento de la descripción.

El mamífero no humano de la descripción puede ser cualquier mamífero no primate en el que se puedan introducir y mantener hepatocitos humanos. Esto incluye, pero no se limita a, caballos, ovejas, vacas, gatos, perros, ratas, hámsters, conejos, jerbos, cobayas y ratones. Preferentemente, el animal huésped es un roedor, más 10 preferentemente aún un ratón. También puede ser un primate no humano (Macacus).

El mamífero no humano puede ser en particular un mamífero inmunocomprometido que generalmente será incapaz de preparar una respuesta inmune completa contra las células xenogénicas (hepatocitos humanos). Los huéspedes mamíferos inmunocomprometidos adecuados para la implantación existen o pueden crearse, por ejemplo, mediante 15 la administración de uno o más compuestos (por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus) o debido a un defecto genético que resulta, por ejemplo, en una incapacidad para sufrir un reordenamiento de ADN en la línea germinal en los loci codificadores de inmunoglobulinas y receptores de antígeno de células T.

La funcionalidad de los hepatocitos humanos puede controlarse mediante la observación de los marcadores 20 sustitutos de la actividad hepatocitaria, incluidos los productos fisiológicos de hepatocitos humanos distinguibles de sus mamíferos no humanos, en particular roedores, análogos por criterios inmunológicos o cuantitativos, por ejemplo, expresión de albúmina sérica humana o los niveles séricos de bilirrubina en animales deficientes para la actividad UGT1A1 (también conocida como bilirrubinemia), etc. Estos marcadores pueden utilizarse para determinar la presencia de células sin sacrificar el receptor.

25 El mamífero no humano quimérico que comprende hepatocitos humanos funcionales puede utilizarse en particular como un modelo *in vivo* de infección por hepatitis B humana.

Procedimientos y usos terapéuticos

30 Un campo de aplicación importante es la terapia celular o la medicina regenerativa. La medicina regenerativa se puede utilizar para curar potencialmente cualquier enfermedad que resulte de un mal funcionamiento, daño o falla del tejido, ya sea regenerando los tejidos dañados *in vivo* mediante la implantación directa *in vivo* de una composición farmacéutica que comprende células similares a hepatocitos (por ejemplo, células similares a 35 hepatoblastos) de la descripción.

La descripción también se refiere a una población de células humanas comprometidas en el linaje hepatocitario, pero no totalmente diferenciadas para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano. La descripción también se refiere a una población de células humanas comprometidas en el linaje hepatocitario, pero 40 no totalmente diferenciadas para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática.

Otro aspecto de la descripción se relaciona, por tanto, con una población de células similares a hepatocitos (por ejemplo, células similares a hepatoblastos) de la descripción para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano. En una realización, dicha población de células similares a hepatoblastos humanos es una población 45 de dichas células que expresan el factor nuclear 4 alfa hepatocitario (HNF4 $\alpha$ ) y no expresan o no expresan sustancialmente alfa-fetoproteína (AFP) como se ha descrito anteriormente.

Más particularmente, un aspecto de la descripción se relaciona con una población de células similares a hepatocitos (por ejemplo, células similares a hepatoblastos) de la descripción para su uso en el tratamiento de una enfermedad 50 hepática. En una realización, dicha población de células similares a hepatoblastos humanos es una población de dichas células que expresan el factor nuclear 4 alfa hepatocitario (HNF4 $\alpha$ ) y no expresan o no expresan sustancialmente alfa-fetoproteína (AFP) como se ha descrito anteriormente.

La descripción también se refiere a un procedimiento para tratar una enfermedad hepática que comprende la etapa 55 de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una población de células similares a hepatocitos (por ejemplo, células similares a hepatoblastos) de la descripción a un paciente que la necesite.

En el contexto de la descripción, los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan en el presente documento, se refieren a un procedimiento cuyo objetivo es retrasar o impedir el inicio de una patología, revertir, aliviar, inhibir, 60 ralentizar o detener la progresión, agravación o deterioro de los síntomas de la patología, facilitar la mejoría de los

síntomas de la patología y / o curar la patología.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a cualquier cantidad de una población de células similares a hepatoblastos humanos de acuerdo con la descripción (o una composición farmacéutica de la misma) que sea suficiente para lograr el propósito deseado.

Las dosis eficaces y los regímenes de administración pueden determinarse fácilmente mediante una buena práctica médica basada en la naturaleza de la patología del sujeto, y dependerá de una serie de factores que incluyen, entre otros, el alcance de los síntomas de la patología y el alcance del daño o la degeneración del tejido u órgano de interés y las características del sujeto (por ejemplo, edad, peso corporal, género, salud general y similares).

Para terapia, las poblaciones de células similares a hepatoblastos humanos y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la descripción pueden administrarse a través de diferentes vías. Los expertos en la técnica pueden optimizar la dosis y el número de administraciones de una manera conocida.

En una realización, las células similares a hepatoblastos humanos de la descripción pueden ser útiles para la terapia autóloga regenerativa de un paciente que padece una enfermedad hepática que necesita terapia regenerativa debido a trastornos específicos o tratamientos asociados a dichos trastornos, incluyendo, sin limitación, Crigler-Najjar de tipo 1 (CN1) debido al déficit en un gen identificado que puede reemplazarse *in vitro*.

En una realización, la descripción se refiere a células similares a hepatoblastos humanos de la descripción para su uso como un producto de terapia celular para implantar en un paciente humano, como un injerto alogénico o, después de la corrección genética, como un injerto autólogo (es decir, las células tienen el mismo genotipo que las células del paciente).

En una realización, las células similares a hepatoblastos humanos de la descripción pueden ser útiles para hígados modificados por bioingeniería: ya sea por infusión junto con otras células de linaje hepático en un hígado descelularizado, por generación del hígado humano funcionalizado y vascularizado de las iPSCs humanas mediante trasplante de brotes hepáticos creados *in vitro* (Takebe y col., Nature 2013, 499), por impresión 3D o cualquier otro procedimiento para generar tejido hepático. En otra realización, las células similares a hepatoblastos humanos de la invención pueden ser útiles para hígados bioartificiales, ya sea infundiéndolos en dispositivos extracorpóreos o incrustándolos en una biomatriz o hidrogel (como alginato, hidroxipropilmetilcelulosa silanizada) antes de la infusión en el cuerpo.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

**FIGURAS:**

Figura 1: Diferenciación hepática de células madre pluripotentes humanas en platos recubiertos con LN111. (A) Protocolo para diferenciar células humanas pluripotentes en células similares a hepatocitos. (BD) La diferenciación hepática se monitorizó a lo largo del tiempo mediante análisis por RT-qPCR para la expresión del ARNm del marcador de pluripotencia (panel B, SOX2), de marcadores endodérmicos (panel C, SOX17, FOXA2) y marcadores hepáticos (panel D, HNF4a, AAT, AFP, ALB, CK19, CYP3A4, CYP3A7, UGT1A1). (E) Secreción de proteínas hepáticas AFP en sobrenadantes celulares mediante ELISA. Los datos representan la media ± SEM. LN111: resultados con hiPSC diferenciados en platos revestidos con LN111; Matrigel: resultados con hiPSC diferenciados en platos recubiertos con Matrigel®. Figura 2: Trasplante de HLCS en los hígados de ratas Gunn. Niveles de bilirrubina sérica en ratas Gunn. La bilirrubinemia se monitorizó con el tiempo en ratas Gunn inmunodeprimidas con tacrolimus que recibieron IDHB 24 horas después de una hepatectomía parcial de dos tercios. Las ratas de control recibieron los mismos procedimientos quirúrgicos, pero no fueron trasplantadas. Figura 3: Diferenciación hepática de células madre pluripotentes humanas en platos recubiertos con LN521. La diferenciación hepática se monitorizó a lo largo del tiempo mediante análisis por RT-qPCR para la expresión de ARNm de marcadores endodérmicos (SOX17) y marcadores hepáticos (HNF4a, AAT, AFP, ALB y CK19).

EJEMPLO 1: Uso de LN-111 como matriz para diferenciar células pluripotentes en células de linaje hepatocitario y uso de células similares a hepatoblastos obtenidas de este modo en terapia.

Material y procedimientos

Este estudio se realizó de acuerdo con la normativa francesa y europea.

Mantenimiento de hiPSC: Las líneas BBHX8 hiPSC [46] se mantuvieron en pocillos de cultivo recubiertos con Matrigel (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) en mTeSR1 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % con cambios de medio diarios. Las células se pasaron cada 5-7 días con reactivo de disociación de célula suave (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canadá).

Diferenciación hepática *in vitro*: La diferenciación hepática de células madre pluripotentes humanas se realizó siguiendo un protocolo de tres etapas basado en estudios anteriores [16, 20, 40] con algunas modificaciones. Primero, para la diferenciación endodérmica definitiva, las células se recolectaron mediante TrypLE (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), se contaron con un contador automático de células ADAM (Labtech, Palaiseau, Francia) y luego, se recubrieron en placas (Costar; Corning Life Sciences, Acton, MA) recubiertas previamente con 5 µg/ml de laminina 111 (Biolamina, Sundbyberg, Suecia) o 2 mg/ml de Matrigel (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) a una densidad celular de 75 x 10<sup>3</sup> células / cm<sup>2</sup>. Se cultivaron en RPMI 1640 complementado con un suplemento sin suero B27 (Life technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) (RPMI/B27), 100 ng/ml de activina A (Miltenyi Biotec, París, Francia), 50 ng/ml de Wnt3A (R&D systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) y 10 µM de inhibidor de Rock (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) durante 1 día. El inhibidor de Rock y Wnt3A se omitieron del medio en los siguientes 2 días y 3 días, respectivamente. Los siguientes 4 días, las células se cultivaron en RPMI 1640/B27 que contenía 100 ng/ml de activina A y las células se cambiaron diariamente. En segundo lugar, para la especificación hepática, las células se cultivaron durante 2 días en RPMI/B27 complementado con 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 10 (Miltenyi Biotec, París, Francia) y 10 ng/ml de proteína morfogenética ósea (BMP) 4 (R&D systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) con cambio de medio diario. Las células se dividieron luego utilizando TrypLE en 3 placas previamente recubiertas con 5 µg/ml de laminina 111 o 2 mg/ml de Matrigel a una densidad celular de 70 x 10<sup>3</sup> células / cm<sup>2</sup>. Se cultivaron en RPMI/B27 complementado con 10 ng/ml de FGF10, 10 ng/ml de BMP-4 y 10 µM de inhibidor de rock durante 1 día y el inhibidor de rock se omitió del medio al día siguiente. Finalmente, para la maduración hepática, las células se cultivaron en medio de cultivo de hepatocitos (Lonza, Bâle, Suiza) complementado con 20 ng/ml de factor de crecimiento hepatocitario (HGF) (Miltenyi Biotec, París, Francia) y 20 ng/ml de oncostatina M (OSM) (Miltenyi Biotec, París, Francia) (medio de maduración) durante 4 días. Los días siguientes, se omitió el HGF del medio de cultivo y el medio se cambió cada 2 días.

Ensayo de inmunofluorescencia: Las células cultivadas se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % en PBS durante 15 minutos y se bloquearon con BSA al 3 % en PBS durante 15 minutos. Las células se incubaron con anticuerpos primarios durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios contra AAT humana (1:100), CK19 (1:50) y AFP (1:300) se adquirieron de DAKO (DakoCytomation, Trappes, Francia); los anticuerpos contra Oct4 humano (1:100), HNF4α (1:100) se adquirieron de TebuBio (Le Perray-en-Yvelines, Francia). Después de realizar varios lavados en PBS con Tritón al 0,1 %, con anticuerpos secundarios IgG anti-ratón, anti-cabra (ambos de Life Technologies) o anti-conejo (Abcam), conjugados con ALEXA 488, 555 o 647, diluido 1/1000 en PBS con BSA al 1 %, Tritón al 0,1 %, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se contrastaron posteriormente con DAPI, se diluyeron 1/10,000 en PBS, durante 1 minuto a temperatura ambiente y se leyeron en un microscopio de fluorescencia invertida (EvoFL de AMG). Para evaluar la proporción de células diferenciadas, se tomaron imágenes aleatorias de 10 diferenciaciones independientes y luego se contaron las células positivas para los marcadores de diferenciación junto con las células completas.

Citometría de flujo: Para la citometría de flujo, las células diferenciadas se incubaron durante 2 minutos con Accutase a 37 °C. Las células disociadas se fijaron con paraformaldehído al 0,25 % durante 30 minutos a 4 °C, luego se permeabilizaron con Tween-20 al 0,2 % en PBS durante 15 minutos a 37 °C. Las células se bloquearon con BSA / PBS al 3 % durante 30 min. / 4 °C en presencia o ausencia de anticuerpos primarios diluidos en BSA al 0,5 % en PBS. Después del lavado (con PBS), las células se incubaron con BSA / PBS al 3 % luego de una incubación de 20 minutos a 4 °C con un anticuerpo conjugado burro anti-ratón Alexa Fluor 488. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences).

Estudios en animales: Los animales se alojaron en las instalaciones para animales de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nantes (Nantes, Francia) y se mantuvieron bajo un ciclo de luz de 12 horas, alimentados a voluntad y recibieron atención humana de acuerdo con las directrices del Ministerio de agricultura francés. En el estudio se utilizaron ratas Gunn homocigotas (j/j) con 120 ± 30 g de peso (edad: 8 - 9 semanas de edad).

Ensayos de función hepática: Se extrajo sangre del seno retro-orbital. La bilirrubina total en suero y las alanina y aspartato aminotransferasas se midieron en el departamento de bioquímica de rutina del hospital de la Universidad de Nantes.

Histología e inmunohistoquímica: La histología y la inmunohistoquímica fueron realizadas por la plataforma MicroPiCell (Nantes). Las secciones de hígado embebidas en parafina (5  $\mu\text{m}$ ) se incubaron con anticuerpos humanos Hep Par-1 (Clon OCH1E5, Dako). Las secciones del hígado se contratiñeron con hematoxilina.

5

RT-qPCR: El ARNm total se aisló de células cultivadas utilizando el minikit RNeasy (QIAGEN) de acuerdo con las especificaciones del fabricante o TRIzol® (Lifetechnology, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm aislado se cuantificó utilizando un NanoDrop y se utilizó una cantidad total de 10 ng por reacción. Los análisis de las transcripciones se realizaron con un sistema de detección de secuencias ViiA7 (Life Technology, Carlsbad, CA, EE. UU.) utilizando el kit Power EXPRESS de un solo paso SYBR®GreenER®, (Life Technology, Carlsbad, CA, EE. UU.).

El procedimiento de PCR y el análisis de los datos de expresión génica relativa mediante el procedimiento de cuantificación de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , después de la normalización a los valores de GAPDH, se realizaron como se ha descrito anteriormente. El nivel de expresión de ARNm se define como el cambio de frecuencia en los niveles de ARNm en una muestra dada en relación con los niveles en células indiferenciadas. El nivel de expresión de ARNm se calcula de la siguiente manera: nivel de expresión de ARNm =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  donde  $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{diana}} - C_{t\text{GAPDH}})_{\text{muestra}} - (C_{t\text{diana}} - C_{t\text{GAPDH}})$ . Las amplificaciones específicas se verificaron mediante curvas de fusión de amplicón.

20 ELISA: La secreción de alfa-fetoproteína humana (AFP) (Calbiotech) y albúmina (Bethyl Laboratories) en el sobrenadante de cultivo se evaluó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Trasplante de hepatocitos: Las células se separaron ( $1 \times 10^7$  células) de las placas utilizando TrypLE, se lavaron, se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de suero fisiológico y se inyectaron con una aguja de mariposa de calibre 26 en el polo esplénico inferior de ratas Gunn que se habían sometido 24 horas antes a una hepatectomía parcial de dos tercios para crear un entorno óptimo para el trasplante celular [48]. Las ratas se inmunosuprimieron diariamente con tacrolimus a 0,2 mg/kg un día antes del trasplante celular durante 3 días y luego a 0,1 mg/kg.

Análisis estadístico: Los datos se expresan como valores medios  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism® 5.04 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). La importancia estadística se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos. Un valor de  $< 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## Resultados

35

Modificamos y combinamos los protocolos informados previamente [16, 20, 36, 40] para desarrollar un procedimiento compatible con las BPF en condiciones químicamente definidas sin xeno, sin alimentador y factores recombinantes para producir HLC a partir de hiPSC. La laminina-111 (LN111) se expresa en el hígado fetal [41] y la isoforma de laminina presente principalmente en Matrigel®. Establecimos la hipótesis de que la LN111 constituiría una matriz extracelular eficiente para iniciar y apoyar la diferenciación hepática de hiPSC. Nuestro protocolo de diferenciación de 3 etapas para producir HLC *in vitro* se describe en la Figura 1A. Usamos la línea celular humana iPSC BBHX8, como una línea celular representativa conocida por diferenciarse en HLC [40, 42]. Cuando las hiPSC estaban en una confluencia del 70 - 90 %, las células se recolectaron y se colocaron en platos recubiertos con LN111 recombinante. Para obtener un proceso de diferenciación hepática más reproducible, las células se recolectaron enzimáticamente y las suspensiones de células individuales se contaron y se colocaron en platos nuevos recubiertos con LN111, en lugar de usar los procedimientos estándar basados en la visualización empírica de la densidad celular para evaluar el tiempo y la división de la relación celular para iniciar la producción de las HLC. En el día 0, las hiPSC dieron positivo para marcadores pluripotentes (Nanog, Sox 2) (Figura 1B) y dieron negativo para endodermo definitivo (Sox 17, FoxA2) (Figura 1C) y marcadores hepáticos (HNF4a, ALB, AFP, Citocromo P450) (Figura 1D). Las células se trataron con activina A y factor básico de crecimiento de fibroblastos para generar un endodermo definitivo. Se utilizó una breve exposición a Wnt3a y al inhibidor de rock para mejorar la expresión del endodermo definitivo y la supervivencia celular después de la recolección celular enzimática, respectivamente [16, 36]. En el día 5, más del 80 - 90 % de las células expresaron fuertemente los marcadores endodérmicos definitivos SOX17 y FOXA2 y perdieron la expresión de genes pluripotentes (Figura 1B). Las células endodérmicas definitivas resultantes se cultivaron en presencia de FGF10 y BMP4, 2 factores críticos involucrados en las vías de señalización iniciales del desarrollo hepático embrionario temprano, como se ha descrito anteriormente [43]. Después de 3 días de tratamiento celular (día 8 de diferenciación), las células se pasaron enzimáticamente en nuevos platos recubiertos con LN111 para expandirlas y continuar la etapa de especificación hepática durante 3 días.

60 En el día 11, casi todas las células dan positivo para los marcadores expresados en progenitores hepáticos durante

las primeras etapas del desarrollo hepático (HNF4a, CK19 y CYP3A7) (Figura 1D). Dieron negativo para alfa-fetoproteína (AFP), un marcador de hepatoblastos, albúmina (ALB), AAT (alfa-1 antitripsina) y citocromo P450 3A4 (CYP3A4), que son marcadores de hepatocitos maduros. No expresaron SOX17 y tenían un nivel reducido de FOXA2. En conjunto, los resultados mostraron que tienen un fenotipo de hepatoblastos tempranos [44, 45]. Para dirigir la diferenciación en células similares a hepatoblastos (expresión de AFP), las células se cultivaron en presencia de OSM y HGF durante 4 días. Después del día 20, los hepatoblastos derivados de hiPSC expresaron HNF4a, CK19, AFP y CYP3A7 (una enzima CYP450 expresada en hepatocitos fetales) y adquirieron la expresión de algunos marcadores de hepatocitos maduros (ALB, AAT, UGT1A1, CYP3A4) y perdieron la expresión de FOXA2, tal como ha sido evaluado mediante los análisis por RT-qPCR (Figura 1D). De acuerdo con estos resultados, la secreción de AFP en el sobrenadante celular se confirmó mediante ensayos ELISA. Sin embargo, no detectamos la secreción de albúmina, probablemente debido a los bajos niveles de expresión del ARNm de albúmina (Figura 1E). Se obtuvieron resultados similares cuando las hiPSC se diferenciaron en platos recubiertos con Matrigel.

En conjunto, los resultados mostraron que la LN111 es tan eficiente como Matrigel para iniciar y apoyar la diferenciación hepática de hiPSC en nuestras condiciones de cultivo, pero con una matriz recombinante. Nuestro estudio amplió un estudio reciente que muestra que los platos recubiertos con LN111 permitían mantener la hiPSC en una etapa de células similares a hepatoblastos después del endodermo hiPSC y la especificación hepática en el plato recubierto con Matrigel [36]. Esto se corresponde con estudios anteriores que muestran que las HLC maduras poco *in vitro*. En el día 20 - 30, nuestras HLC no secretaron albúmina, probablemente porque no realizamos el cultivo en presencia de dexametasona o DMSO que aumenta la madurez de las HLC. Las HLC altamente maduras se asemejan a los hepatocitos primarios humanos que pueden producirse si se cultivaran en cultivo en 3D o en condiciones de cocultivo de micropatrones [34, 46].

Para investigar la eficacia terapéutica, los niveles séricos de bilirrubina se monitorizaron a lo largo del tiempo después del trasplante de IDHB (día 11 de diferenciación hepática en platos recubiertos con LN111) en ratas Gunn inmunodeprimidas. Como se muestra en la Figura 2, hubo una reducción progresiva de los niveles basales de bilirrubina en el grupo tratado después del trasplante de células en el transcurso de 60 días. A partir de entonces, la disminución de la bilirrubinemia sérica persistió a un nivel de  $28 \pm 5$  % a lo largo del estudio y fue estadísticamente significativo en comparación con los valores previos al trasplante ( $P < 0,05$ ). La bilirrubina sérica en el grupo tratado fue de  $57 \pm 5$   $\mu\text{M}$  en el momento del sacrificio frente a  $84 \pm 11$   $\mu\text{M}$  para valores previos al trasplante ( $p = 0,005$ ). A diferencia de las ratas tratadas, la bilirrubina sérica en el grupo de control no disminuyó y se mantuvo elevada con valores de hasta 150  $\mu\text{M}$ . Los análisis inmunoquímicos revelaron la presencia de células que expresan el antígeno hepatocítico humano específico Hep Par-1, lo que confirma que las IDHB trasplantadas tenían la capacidad de contribuir al parénquima hepático. Las células humanas representaron menos del 1 % del hígado y se distribuyeron por todo el parénquima hepático, aunque predominantemente en el área periportal y principalmente como células individuales. Esto coincide con la baja eficacia de injerto de los hepatocitos normales en el hígado de los animales, en los que no hay ventajas de crecimiento selectivo de las células trasplantadas [37, 47-50]. La histología del hígado, así como de otros órganos (no mostrados) de todos los animales fue normal. Los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) (marcadores establecidos de lesión hepatocitaria) en ratas tratadas fueron de  $1,59 \pm 0,21$   $\mu\text{kat/L}$  y de  $1,07 \pm 0,16$   $\mu\text{kat/L}$  en el día 10 posterior al trasplante, respectivamente y de  $2,07 \pm 0,85$   $\mu\text{kat/L}$  y de  $0,95 \pm 0,19$   $\mu\text{kat/L}$  en el momento del sacrificio, respectivamente. Estos valores no fueron diferentes de los valores preoperatorios (AST:  $2,44 \pm 1$   $\mu\text{kat/L}$  y ALT:  $1,46 \pm 0,75$   $\mu\text{kat/L}$ ) o los valores de las ratas de control en el día 10 después del trasplante (AST:  $1,59 \pm 0,12$   $\mu\text{kat/L}$  y ALT:  $1,03 \pm 0,12$   $\mu\text{kat/L}$ ) y en el momento del sacrificio (AST:  $1,61 \pm 0,53$   $\mu\text{kat/L}$  y ALT:  $1,13 \pm 0,33$   $\mu\text{kat/L}$ ). Los valores de gamma-glutamilttransferasa también fueron normales ( $< 0,05$   $\mu\text{kat/L}$ ) en estos puntos temporales. Estos resultados mostraron que el animal se recuperó bien de los procedimientos quirúrgicos. Para seguir la funcionalidad *in vivo* de las células humanas trasplantadas, medimos la AFP humana y la albúmina humana en sueros de animales a lo largo del tiempo. En un animal, pudimos detectar niveles significativos de AFP humana en suero (sobre el fondo del suero de las ratas de control) en el día 11 posterior al trasplante celular (16 ng/ml) y que progresivamente se hizo indetectable a partir de ese momento. En otros dos animales, pudimos detectar la aparición de albúmina humana sérica a los 5 meses después del trasplante, aunque a un nivel muy bajo (6 y 23 pg/ml). No se detectó ningún nivel detectable de albúmina humana y AFP humana en los sueros de otras ratas Gunn injertadas, probablemente debido al número muy bajo de células humanas en el hígado.

En resumen, demostramos por primera vez la eficacia de un regenerativo basado en hiPSC para el tratamiento de una enfermedad metabólica hepática hereditaria en ausencia de cualquier ventaja de crecimiento selectivo de las células trasplantadas sobre los hepatocitos de roedores residentes, que es la situación encontrada en el trasplante de hepatocitos en humanos [9]. Después del trasplante de células en ratas Gunn adultas ictéricas, demostramos una disminución significativa de larga duración en la hiperbilirrubinemia. La eficacia terapéutica fue equivalente a la obtenida con la terapia génica *ex vivo* en la rata Gunn utilizando hepatocitos primarios de corrección lentiviral [51].

Cabe destacar que fue tan eficiente como el trasplante de hepatocitos aislados de hígados humanos recién nacidos y más alto que el de los hepatocitos aislados de hígados humanos adultos, que son las células estándar más valiosas para la terapia de células humanas para el tratamiento de la rata Gunn. En el presente estudio, las hiPSC se diferenciaron en células similares a hepatoblastos que no expresaban UGT1A1 para el trasplante celular.

5 Nuestros resultados mostraron evidencias inequívocas de que se ha producido una maduración *in situ* para ganar la actividad de UGT1A1, que fue máxima a las 8 semanas después del trasplante. También pudimos detectar en algunos animales la expresión transitoria de la AFP sérica y la aparición de la producción de albúmina sérica. Nuestros resultados están en consonancia con estudios previos que muestran que los hepatocitos aislados del hígado fetal repueblan muy eficientemente el hígado huésped, donde adquirieron una maduración completa dentro de las 4 - 6 semanas [52, 53]. Recientemente, se ha informado que las hiPSC especificadas en hepatoblastos diferenciados (que expresan AFP y ALB) eran capaces de diferenciarse aún más en el hígado murino, donde perdieron la expresión de AFP [14, 23, 54]. Nuestro estudio indica ahora que las hiPSC especificadas en hepatoblastos eran capaces de repoblar el hígado de otras especies y adquirieron madurez *in situ* a un nivel suficiente para asegurar funciones hepáticas metabólicas en el contexto de una regeneración hepática normal.

15 Es importante destacar que el injerto hepático por las IDHB se mantuvo durante un largo período (6 meses) sin signos de formación de tumores (carcinoma o teratoma) y lesión hepática según lo evaluado por los análisis de los parámetros histológicos y sanguíneos. Al igual que los hepatocitos primarios normales trasplantados en hígados adultos [51], las IDHB repoblaron el hígado como células individuales, lo que sugiere que respondieron a los  
20 estímulos antiproliferativos una vez terminada la regeneración del hígado y el hígado volvió a la inactividad mitótica. Además, no se observó ningún teratoma 2 meses después de la inyección directa de IDHB en los testículos, lo que confirma la ausencia de hiPSC indiferenciada residual en la preparación celular de HLC.

Finalmente, nuestro estudio también proporciona un paso crucial hacia la aplicación clínica de la hiPSC para el  
25 tratamiento de enfermedades hepáticas hereditarias, ya que hemos producido las HLC mediante un protocolo de diferenciación hepática sin suero, sin xeno y químicamente definido que cumple con los criterios de producción de las BPF. Elegimos recolectar HLC en una etapa de progenitores hepáticos tempranos (expresión de HNF4-alfa y sin expresión de AFP) porque los progenitores hepáticos aislados de hígados fetales humanos tienen la capacidad de injertarse y migrar dentro del hígado del receptor trasplantado de manera más eficiente que los hepatocitos adultos.  
30 [55-57]. También se ha demostrado que las células endodérmicas derivadas de hiPSC tienen mayor capacidad de injerto que las células progenitoras hepáticas que expresan AFP y hepatocitos en proceso de maduración (que expresan albúmina) [31]. Por el contrario, no trasplantamos células similares al endodermo (día 5 de diferenciación) para reducir el riesgo de hiPSC residual indiferenciada o de células no totalmente diferenciadas en las preparaciones celulares finales. Loh y col. observaron que los progenitores hepáticos tempranos derivados de  
35 hiPSC no podían injertarse en hígados de neonatos murinos. Esta discrepancia con los estudios mencionados anteriormente y el nuestro puede estar relacionada con un protocolo de diferenciación hepática diferente que conduce a una capacidad de injerto diferente de las HLC producidas (por ejemplo, Loh y col. utilizaron varios inhibidores de moléculas pequeñas), para la diferenciación en el receptor del hígado (hígados de neonatos frente a hígados de adultos).

40 La recolección en el día 11 de la diferenciación hepática (fin de la etapa de especificación hepática) también simplificó y redujo el tiempo de cultivo y facilitará la estandarización, reproducibilidad y reducirá el coste de la producción masiva de células.

45 En conclusión, existe una demanda clínica de hepatocitos humanos para el tratamiento de enfermedades hepáticas hereditarias, incluida la CN-1. Los progenitores hepáticos tempranos derivados de hiPSC o de hESC, cultivados en placas recubiertas con laminina podrían ser una alternativa clínica segura a los trasplantes de hígado y hepatocitos humanos aislados de hígados cadavéricos. Aunque el estudio se centró en las terapias para la CN-1, también proporcionó un avance significativo en el tratamiento de otras enfermedades hepáticas hereditarias, como las  
50 enfermedades del ciclo de la urea. De hecho, estas enfermedades podrían tratarse con un trasplante alogénico de hepatocitos [9] y, por lo tanto, se podrían aplicar directamente al enfoque de la medicina regenerativa utilizando células madre pluripotentes humanas normales. Como el acceso a las HLC no será limitado, el trasplante de hepatocitos podría repetirse para mantener o lograr beneficios terapéuticos satisfactorios.

55 EJEMPLO 2: Uso de LN-521 como matriz para diferenciar células pluripotentes en células de linaje hepatocitario.

Curiosamente, la laminina-521 humana recombinante (LN-521) puede sustituir la LN-111 como matriz extracelular y se lograba una mejor diferenciación de hiPSC en endodermo definitivo y HLC según lo evaluado por los análisis de RT-qPCR de la expresión del gen de expresión de HNF4alpha, AFP, albúmina, AAT ( Figura 3).

60

## REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan en el presente documento como referencia a la presente descripción.

- [1] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 131 (2007) 861-872. [2] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, Il, J. Thomson, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, 318 (2007) 1917-1920.
- [3] P. Menasche, V. Vanneaux, J. R. Fabreguettes, A. Bel, L. Tosca, S. Garcia, V. Bellamy, Y. Farouz, J. Pouly, O. Damour, M.C. Perier, M. Desnos, A. Hagege, O. Agbulut, P. Bruneval, G. Tachdjian, J. H. Trouvin, J. Larghero, Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience, *European heart journal*, (2014). [4] S. Nedelec, B. Onteniente, M. Peschanski, C. Martinat, Genetically-modified human pluripotent stem cells: new hopes for the understanding and the treatment of neurological diseases?, *Curr Gene Ther*, 13 (2013) 111-119. [5] N. Dianat, C. Steichen, L. Vallier, A. Weber, A. Dubart-Kupperschmitt, Human pluripotent stem cells for modelling human liver diseases and cell therapy, *Curr Gene Ther*, 13 (2013) 120-132. [6] S.D. Schwartz, C. D. Regillo, B. L. Lam, D. Elliott, P. J. Rosenfeld, N. Z. Gregori, J. P. Hubschman, J. L. Davis, G. Heilwell, M. Spirm, J. Maguire, R. Gay, J. Bateman, R. M. Ostrick, D. Morris, M. Vincent, E. Anglade, L. V. Del Priore, R. Lanza, Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies, *Lancet*, (2014). [7] F. W. Pagliuca, J. R. Millman, M. Gurtler, M. Segel, A. Van Dervort, J. H. Ryu, Q. P. Peterson, D. Greiner, D. A. Melton, Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro, *Cell*, 159 (2014) 428-439. [8] A. Rezanian, J. E. Bruin, P. Arora, A. Rubin, I. Batushansky, A. Asadi, S. O'Dwyer, N. Quiskamp, M. Mojibian, T. Albrecht, Y. H. Yang, J. D. Johnson, T. J. Kieffer, Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells, *Nat Biotechnol*, 32 (2014) 1121-1133. [9] A. Dhawan, J. Puppi, R. D. Hughes, R. R. Mitry, Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7 (2010) 288-298. [10] J. H. Waelzlein, J. Puppi, A. Dhawan, Hepatocyte transplantation for correction of inborn errors of metabolism, *Current opinion in nephrology and hypertension*, 18 (2009) 481-488. [11] I. J. Fox, J. R. Chowdhury, S. S. Kaufman, T. C. Goertzen, N. R. Chowdhury, P. I. Warkentin, K. Dorko, B. V. Sauter, S. C. Strom, Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation, *N Engl J Med*, 338 (1998) 1422-1426. [12] C. Ribes-Koninckx, E. P. Ibars, M. A. Agrasot, A. Bonora-Centelles, B. P. Miquel, J. J. Vila Carbo, E. D. Aliaga, J. M. Pallardo, M. J. Gomez-Lechon, J. V. Castell, Clinical outcome of hepatocyte transplantation in four pediatric patients with inherited metabolic diseases, *Cell Transplant*, 21 (2012) 2267-2282. [13] K. Takayama, Y. Morisaki, S. Kuno, Y. Nagamoto, K. Harada, N. Furukawa, M. Ohtaka, K. Nishimura, K. Imagawa, F. Sakurai, M. Tachibana, R. Sumazaki, E. Noguchi, M. Nakanishi, K. Hirata, K. Kawabata, H. Mizuguchi, Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (2014) 16772-16777. [14] A. Carpentier, A. Tesfaye, V. Chu, I. Nimgaonkar, F. Zhang, S. B. Lee, S. S. Thorgeirsson, S. M. Feinstone, T. J. Liang, Engrafted human stem cell-derived hepatocytes establish an infectious HCV murine model, *J Clin Invest*, 124 (2014) 4953-4964. [15] S. Gerbal-Chaloin, N. Funakoshi, A. Caillaud, C. Gondeau, B. Champon, K. Si-Tayeb, Human Induced Pluripotent Stem Cells in Hepatology: Beyond the Proof of Concept, *Am J Pathol*, 184 (2014) 332-347. [16] M. Kajiwara, T. Aoi, K. Okita, R. Takahashi, H. Inoue, N. Takayama, H. Endo, K. Eto, J. Toguchida, S. Uemoto, S. Yamanaka, Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (2012) 12538-12543. [17] H. Basma, A. Soto-Gutierrez, G. R. Yannam, L. Liu, R. Ito, T. Yamamoto, E. Ellis, S. D. Carson, S. Sato, Y. Chen, D. Muirhead, N. Navarro-Alvarez, R. J. Wong, J. Roy-Chowdhury, J. L. Platt, D. F. Mercer, J. D. Miller, S. C. Strom, N. Kobayashi, I. J. Fox, Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes, *Gastroenterology*, 136 (2009) 990-999. [18] J. Cai, Y. Zhao, Y. Liu, F. Ye, Z. Song, H. Qin, S. Meng, Y. Chen, R. Zhou, X. Song, Y. Guo, M. Ding, H. Deng, Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells, *Hepatology*, 45 (2007) 1229-1239. [19] D.C. Hay, J. Fletcher, C. Payne, J.D. Terrace, R. C. Gallagher, J. Snoeys, J. R. Black, D. Wojtacha, K. Samuel, Z. Hannoun, A. Pryde, C. Filippi, I. S. Currie, S. J. Forbes, J. A. Ross, P. N. Newsome, J. P. Iredale, Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires Activin A and Wnt3a signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 12301-12306. [20] K. Si-Tayeb, F. K. Noto, M. Nagaoka, J. Li, M.A. Battle, C. Duris, P. E. North, S. Dalton, S.A. Duncan, Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells, *Hepatology*, 51 (2010) 297-305. [21] G.J. Sullivan, D.C. Hay, I. H. Park, J. Fletcher, Z. Hannoun, C. M. Payne, D. Dalgetty, J. R. Black, J. A. Ross, K. Samuel, G. Wang, G. Q. Daley, J. H. Lee, G. M. Church, S. J. Forbes, J. P. Iredale, I. Wilmut, Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells, *Hepatology*, 51 (2010) 329-335. [22] M. Baxter, S. Withey, S. Harrison, C. P. Segeritz, F. Zhang, R. Atkinson-Dell, C. Rowe, D. T. Gerrard, R. Sison-Young, R. Jenkins, J. Henry, A. A. Berry, L. Mohamet, M. Best, S. W. Fenwick, H. Malik, N. R. Kitteringham, C. E. Goldring, K. P. Hanley, L. Vallier, N. A. Hanley, Phenotypic and



- functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes, *J Hepatol*, (2014). [23] K. M. Loh, L. T. Ang, J. Zhang, V. Kumar, J. Ang, J. Q. Auyeong, K. L. Lee, S. H. Choo, C. Y. Lim, M. Nichane, J. Tan, M. S. Noghabi, L. Azzola, E. S. Ng, J. Durruthy-Durruthy, V. Sebastiano, L. Poellinger, A. G. Elefanty, E. G. Stanley, Q. Chen, S. Prabhakar, I. L. Weissman, B. Lim, Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations, *Cell stem cell*, 14 (2014) 237-252.
- 5 [24] K. Yusa, S. T. Rashid, H. Strick-Marchand, I. Varela, P. Q. Liu, D. E. Paschon, E. Miranda, A. Ordonez, N. R. Hannan, F. J. Rouhani, S. Darche, G. Alexander, S. J. Marciniak, N. Fusaki, M. Hasegawa, M. C. Holmes, J. P. Di Santo, D. A. Lomas, A. Bradley, L. Vallier, Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells, *Nature*, 478 (2011) 391-394. [25] S. E. Kim, S. Y. An, D. H. Woo, J. Han, J. H. Kim, Y. J. Jang, 10 J. S. Son, H. Yang, Y. P. Cheon, J. H. Kim, Engraftment potential of spheroid-forming hepatic endoderm derived from human embryonic stem cells, *Stem cells and development*, 22 (2013) 1818-1829. [26] S. Asgari, M. Moslem, K. Bagheri-Lankarani, B. Pournasr, M. Miryounesi, H. Baharvand, Differentiation and transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells, *Stem cell reviews*, 9 (2013) 493-504. [27] M. Vosough, E. Omidinia, M. Kadivar, M.A. Shokrgozar, B. Pournasr, N. Aghdami, H. Baharvand, Generation of Functional 15 Hepatocyte-Like Cells from Human Pluripotent Stem Cells in a Scalable Suspension Culture, *Stem cells and development*, 22 (2013) 2693-2705. [28] T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, H. Koike, M. Kimura, T. Ogaeri, R. R. Zhang, Y. Ueno, Y. W. Zheng, N. Koike, S. Aoyama, Y. Adachi, H. Taniguchi, Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature*, 499 (2013) 481-484. [29] Y. F. Chen, C. Y. Tseng, H. W. Wang, H. C. Kuo, V. W. Yang, O. K. Lee, Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced 20 pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol, *Hepatology*, 55 (2012) 1193-1203. [30] H. Y. Li, Y. Chien, Y. J. Chen, S. F. Chen, Y. L. Chang, C. H. Chiang, S. Y. Jeng, C. M. Chang, M. L. Wang, L. K. Chen, S. I. Hung, T. I. Huo, S. D. Lee, S. H. Chiou, Reprogramming induced pluripotent stem cells in the absence of c-Myc for differentiation into hepatocyte-like cells, *Biomaterials*, 32 (2011) 5994-6005. [31] H. Liu, Y. Kim, S. Sharkis, L. Marchionni, Y. Y. Jang, In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse 25 origins, *Science translational medicine*, 3 (2011) 82ra39. [32] S. Agarwal, K. L. Holton, R. Lanza, Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells, *Stem Cells*, 26 (2008) 1117-1127. [33] A. Soto-Gutierrez, N. Kobayashi, J.D. Rivas-Carrillo, N. Navarro-Alvarez, D. Zhao, T. Okitsu, H. Noguchi, H. Basma, Y. Tabata, Y. Chen, K. Tanaka, M. Narushima, A. Miki, T. Ueda, H. S. Jun, J. W. Yoon, J. Lebkowski, N. Tanaka, I. J. Fox, Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes, 30 *Nat Biotechnol*, 24 (2006) 1412-1419. [34] D. R. Berger, B. R. Ware, M.D. Davidson, S. R. Allsup, S. R. Khetani, Enhancing the functional maturity of iPSC-derived human hepatocytes via controlled presentation of cell-cell interactions in vitro, *Hepatology*, (2014). [35] K. G. Chen, B. S. Mallon, R. D. McKay, P. G. Robey, Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics, *Cell stem cell*, 14 (2014) 13-26. [36] K. Takayama, Y. Nagamoto, N. Mimura, K. Tashiro, F. Sakurai, M. Tachibana, T. Hayakawa, K. Kawabata, H. 35 Mizuguchi, Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes, *Stem cell reports*, 1 (2013) 322-335. [37] J. Birraux, O. Menzel, B. Wildhaber, C. Jond, T. H. Nguyen, C. Chardot, A step toward liver gene therapy: efficient correction of the genetic defect of hepatocytes isolated from a patient with Crigler-Najjar syndrome type 1 with lentiviral vectors, *Transplantation*, 87 (2009) 1006-1012. [38] P. A. Lysy, M. Najimi, X. Stephenne, A. Bourgois, F. Smets, E. M. Sokal, Liver cell transplantation for Crigler-Najjar 40 syndrome type I: update and perspectives, *World J Gastroenterol*, 14 (2008) 3464-3470. [39] T. H. Nguyen, N. Ferry, Gene therapy for liver enzyme deficiencies: What have we learned from models for Crigler-Najjar and Tyrosinemia, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 1 (2007) 155-177. [40] N. R. Hannan, C. P. Segeritz, T. Touboul, L. Vallier, Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells, *Nature protocols*, 8 (2013) 430-437. [41] P. Ekblom, P. Lonai, J. F. Talts, Expression and biological role of laminin-1, *Matrix Biol*, 22 (2003) 35-47. [42] S. 45 Pauklin, L. Vallier, The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity, *Cell*, 155 (2013) 135-147. [43] T. Touboul, N. R. Hannan, S. Corbineau, A. Martinez, C. Martinet, S. Branchereau, S. Mainot, H. Strick-Marchand, R. Pedersen, J. Di Santo, A. Weber, L. Vallier, Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development, *Hepatology*, 51 (2010) 1754-1765. [44] G. Lanzoni, T. Oikawa, Y. Wang, C. B. Cui, G. Carpino, V. Cardinale, D. Gerber, M. Gabriel, J. Dominguez-Bendala, M. 50 E. Furth, E. Gaudio, D. Alvaro, L. Inverardi, L. M. Reid, Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas, *Stem Cells*, 31 (2013) 2047-2060. [45] S.N. de Wildt, G. L. Kearns, J. S. Leeder, J.N. van den Anker, Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition, *Clinical pharmacokinetics*, 37 (1999) 485-505. [46] R. L. Gieseck Iii, N. R. Hannan, R. Bort, N. A. Hanley, R. A. Drake, G. W. Cameron, T. A. Wynn, L. Vallier, Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocytes by 3D-Culture, *PLoS one*, 9 (2014) e86372. [47] T. H. Nguyen, J. 55 Birraux, B. Wildhaber, A. Myara, F. Trivin, C. Le Coultre, D. Trono, C. Chardot, Ex vivo lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat, *Transplantation*, 82 (2006) 794-803. [48] T. H. Nguyen, J. Oberholzer, J. Birraux, P. Majno, P. Morel, D. Trono, Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes, *Mol Ther*, 6 (2002) 199-209. [49] S. Gupta, P. Rajvanshi, R. Sokhi, S. Slehria, A. Yam, A. Kerr, P. M. Novikoff, Entry and integration of 60 transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium, *Hepatology*, 29

- (1999) 509-519. [50] C. Guha, A. Sharma, S. Gupta, A. Alfieri, G. R. Gorla, S. Gagandeep, R. Sokhi, N. Roy-Chowdhury, K. E. Tanaka, B. Vikram, J. Roy-Chowdhury, Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation, *Cancer Res*, 59 (1999) 5871-5874. [51] T. H. Nguyen, M. Bellodi-Privato, D. Aubert, V. Pichard, A. Myara, D. Trono, N. Ferry, Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats, *Mol Ther*, 12 (2005) 852-859. [52] T. Cantz, D. M. Zuckerman, M. R. Burda, M. Dandri, B. Goricke, S. Thalhammer, W. M. Heckl, M. P. Manns, J. Petersen, M. Ott, Quantitative gene expression analysis reveals transition of fetal liver progenitor cells to mature hepatocytes after transplantation in uPA/RAG-2 mice, *Am J Pathol*, 162 (2003) 37-45. [53] J. S. Sandhu, P. M. Petkov, M. D. Dabeva, D. A. Shafritz, Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells, *Am J Pathol*, 159 (2001) 1323-1334. [54] S. Zhu, M. Rezvani, J. Harbell, A. N. Mattis, A. R. Wolfe, L. Z. Benet, H. Willenbring, S. Ding, Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts, *Nature*, 508 (2014) 93-97. [55] J. E. Allain, I. Dagher, D. Mahieu-Caputo, N. Loux, M. Andreoletti, K. Westerman, P. Briand, D. Franco, P. Leboulch, A. Weber, Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cell, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002) 3639-3644. [56] J. P. Delgado, V. Vanneaux, J. Branger, T. Touboul, L. Sentilhes, S. Mainot, P. Lainas, P. Leclerc, G. Uzan, D. Mahieu-Caputo, A. Weber, The role of HGF on invasive properties and repopulation potential of human fetal hepatic progenitor cells, *Exp Cell Res*, 315 (2009) 3396-3405. [57] D. Mahieu-Caputo, J. E. Allain, J. Branger, A. Coulomb, J. P. Delgado, M. Andreoletti, S. Mainot, R. Frydman, P. Leboulch, J. P. Di Santo, F. Capron, A. Weber, Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts, *Hum Gene Ther*, 15 (2004) 1219-1228. [58] M. Black, B. H. Billing, K. P. Heirwegh, Determination of bilirubin UDP-glucuronyl transferase activity in needle-biopsy specimens of human liver, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 29 (1970) 27-35. [59] M. Muraca, N. Blanckaert, Liquid-chromatographic assay and identification of mono- and diester conjugates of bilirubin in normal serum, *Clin Chem*, 29 (1983) 1767-1771.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso *in vitro* de una laminina humana (LN) como matriz para la diferenciación hepática.
- 5 2. Uso *in vitro* de una LN humana para inducir y/o mejorar la diferenciación de una población de células pluripotentes, una población de células multipotentes o una población de células endodérmicas definitivas (DE) en una población de células de linaje hepatocitario.
3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la LN se selecciona del grupo  
10 que consiste en laminina-111 (LN-111), laminina-211 (LN-211), laminina-332 (LN-332), laminina-411 (LN-411) , laminina-421 (LN-421), laminina-511 (LN-511) y laminina-521 (LN-521).
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la LN es una LN-111 humana recombinante o una LN-521 humana recombinante.  
15
5. Un procedimiento *in vitro* para inducir la diferenciación hepática humana que comprende las etapas de:  
  
(i) cultivar una población de células DE humanas en un soporte recubierto con una laminina humana en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatoblastos humanos, y  
20 (ii) cultivar dicha población de células similares a hepatoblastos humanos en un soporte recubierto con una laminina humana en un medio de maduración hepática para producir una población de células similares a hepatocitos fetales humanos.
- 25 6. Un procedimiento *in vitro* para inducir la diferenciación hepática humana que comprende las etapas de:  
  
(i) cultivar una población de células pluripotentes humanas en un soporte recubierto con una laminina humana en un medio de inducción endodérmica para producir una población de células DE humanas,  
30 (ii) cultivar dicha población de células DE humanas en un soporte recubierto con una laminina humana en un medio de inducción hepática para producir una población de células similares a hepatoblastos humanos, y  
(iii) cultivar dicha población de células similares a hepatoblastos humanos en un soporte recubierto con una laminina humana en un medio de maduración hepática para producir una población de células similares a hepatocitos fetales humanos.  
35
7. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el medio de inducción hepática es un medio químicamente definido que comprende proteína 4 morfogenética ósea (BMP4) y un factor de crecimiento de fibroblastos seleccionado de entre FGF10 y FGF2.
- 40 8. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde el medio de maduración hepática es un medio químicamente definido que comprende factor de crecimiento hepático (HGF) y oncostatina M (OSM).
9. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 6, donde el medio de inducción endodérmica  
45 es un medio químicamente definido que comprende al menos activina A y opcionalmente WNT3A.
10. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde el medio de inducción hepática y / o el medio de inducción endodérmico comprende además un inhibidor de ROCK.
- 50 11. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, donde las células similares a hepatoblastos humanos expresan el factor nuclear hepatocitario 4-alfa (HNF4α) y no expresan o no expresan sustancialmente alfa-fetoproteína (AFP).

A.

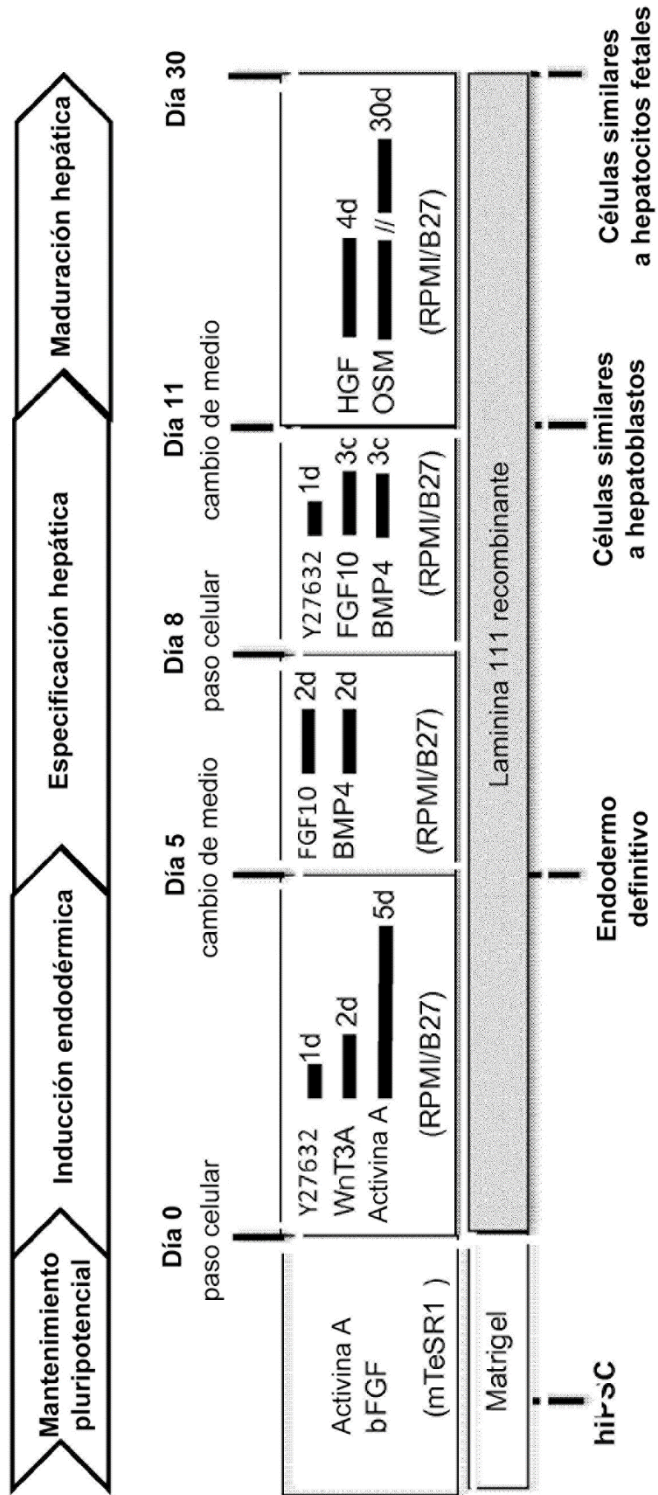
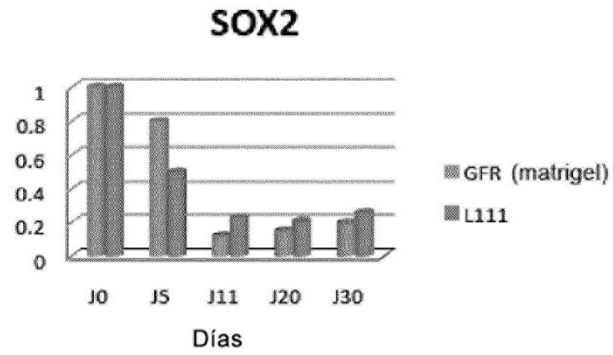


Figura 1A

B.

Marcador de pluripotencia



C.

Marcadores de endodermo

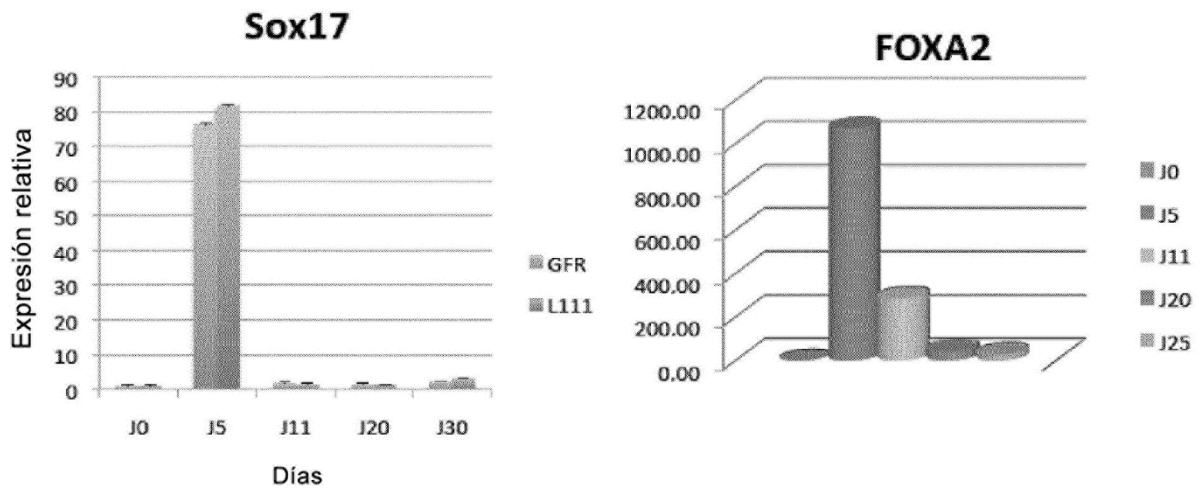


Figura 1B & 1C

**D.**  
**Marcadores de diferenciación hepática**

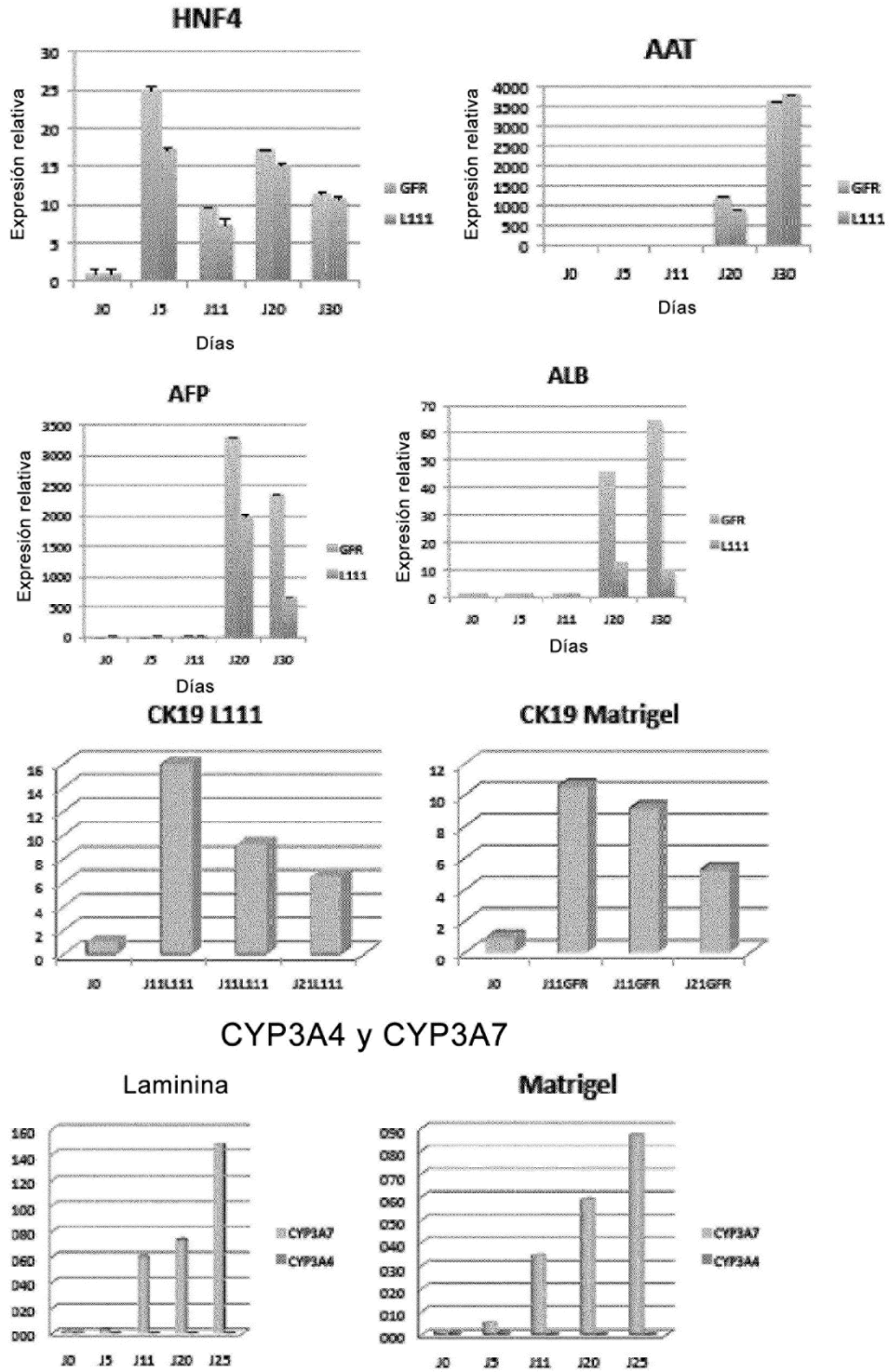
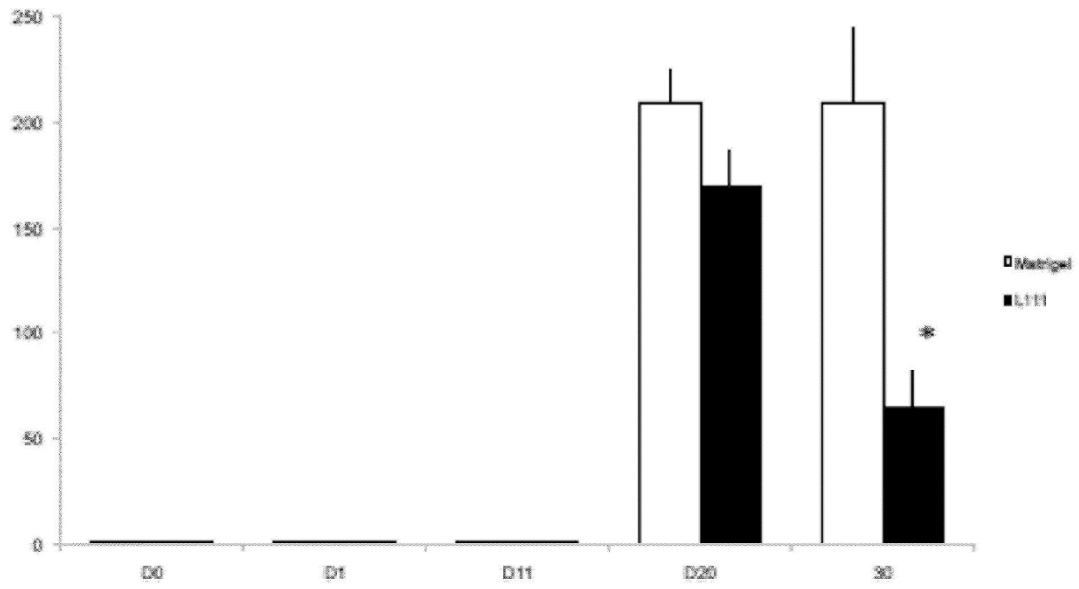


Figura 1D

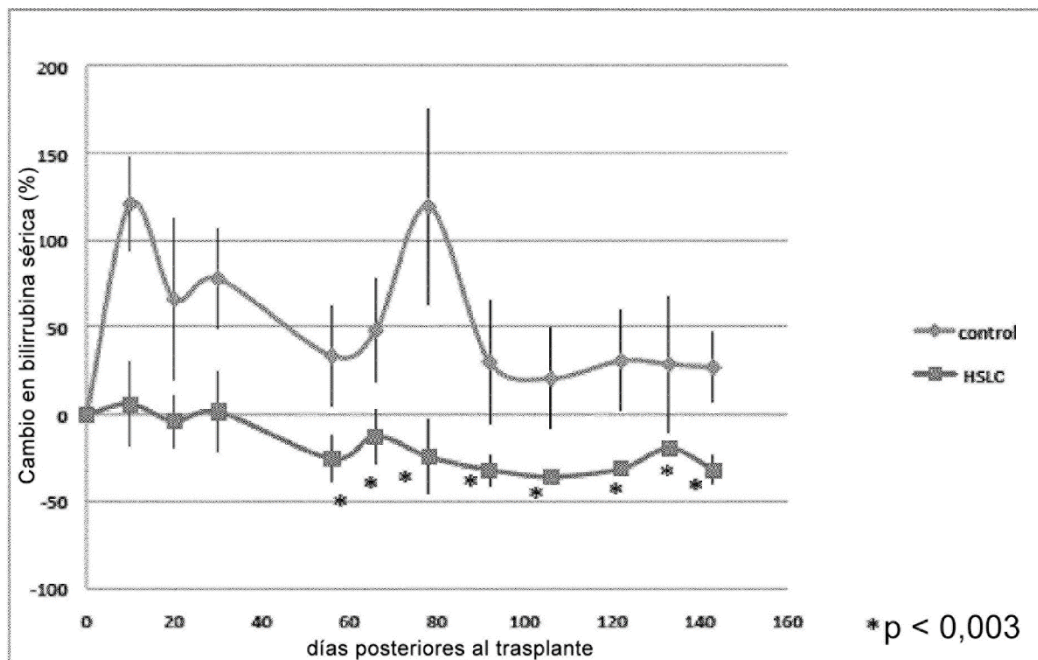
E.

AFP ng/24h/ml



\* p > 0,002 día 20 frente a día 30

Figura 1E



\* p < 0,003

Figura 2

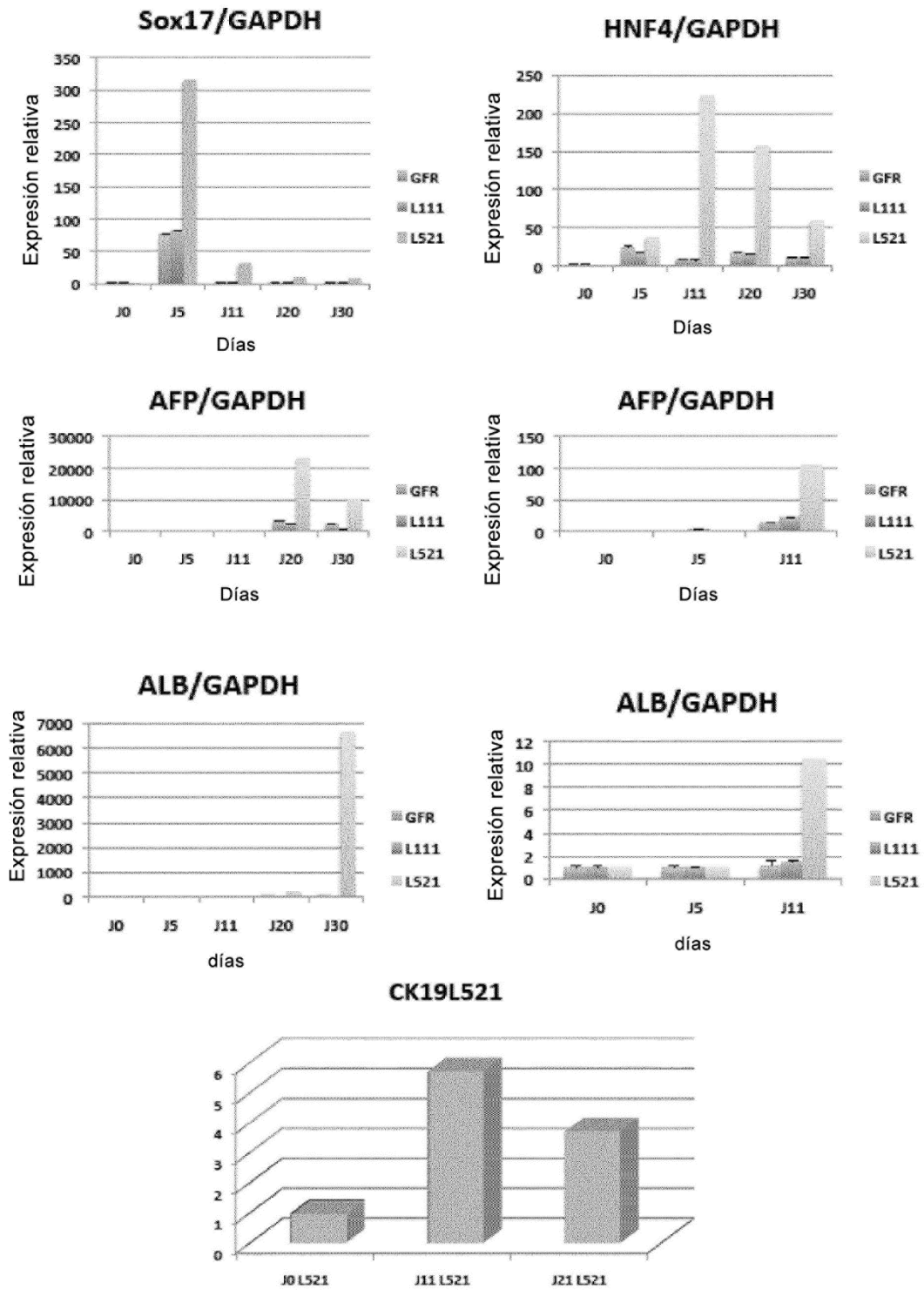


Figura 3