

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 408**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**A61K 35/407** (2015.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2014 PCT/EP2014/068317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15028577**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014 E 14780421 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3039123**

54 Título: **Procedimiento para la producción de células progenitoras hepáticas adultas**

30 Prioridad:

**28.08.2013 US 201361870983 P**

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

**03.06.2020**

73 Titular/es:

**PROMETHERA BIOSCIENCES S.A. / N.V. (100.0%)  
Watson & Crick Hill Rue Granbonpré 11  
1435 Mont-Saint-Guibert, BE**

72 Inventor/es:

**SOKAL, ETIENNE;  
SNYKERS, SARAH;  
BARAN, TUBA y  
GELLYNCK, KRIS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 764 408 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

Procedimiento para la producción de células progenitoras hepáticas adultas

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a células progenitoras hepáticas adultas que se generan usando células hepáticas primarias y a su uso para el tratamiento médico de enfermedades hepáticas o para seleccionar compuestos de interés médico.

10

## CAMPO DE LA INVENCÓN

El hígado es un órgano clave en la regulación de la homeostasis del organismo y es el sitio de muchas rutas metabólicas vitales. La disfunción de una sola proteína dentro de una ruta metabólica compleja podría ser altamente perjudicial. La alta presencia de enzimas hepáticas importantes aumenta sustancialmente el riesgo de aparición de diversas enfermedades hepáticas. En total existen 200 errores congénitos diferentes del metabolismo hepático que afectan a 1 niño de 2500 nacimientos vivos. Los tratamientos actuales, y tratamiento a largo plazo, no son lo bastante eficaces. El trasplante de hígado ortotópico (OLT) es altamente intrusivo, irreversible, limitado mediante la escasez de injertos de donantes y requiere cirugía más avanzada. El trasplante de células hepáticas (LCT) puede ejercer eficacia sólo de corto a medio plazo debido a la calidad de preparaciones de hepatocitos. Las mejoras adicionales en la tolerancia hacia la crioconservación, injerto permanente y alta funcionalidad de las células infundidas, serían un gran avance (Sokal EM, 2011; Russo FP y Parola M, 2012; Allameh A y Kazemnejad S, 2012; Parveen N *et al.*, 2011).

15

20

25

30

Esta mejora podría presentarse mediante el uso de células madre o progenitoras, en particular células progenitoras hepáticas que se han identificado en la bibliografía usando tejidos hepáticos de diferentes organismos, como también en tejidos hepáticos fetales o adultos (Schmelzer E *et al.*, 2007; Sahin MB *et al.*, 2008; Azuma H *et al.*, 2003; Herrera MB *et al.*, 2006; Najimi M *et al.*, 2007; Darwiche H y Petersen BE, 2010; Shiojiri N y Nitou M, 2012; Tanaka M y Miyajima A, 2012). Las células de este tipo pueden proporcionar, siguiendo la exposición a estímulos hepatogénicos *in vitro* y/o después de la administración *in vivo*, células con características morfológicas y funcionales normalmente asociadas a diferenciación hepática tal como actividades enzimáticas de fase I/II.

35

40

Estas células progenitoras hepáticas o células similares a hepatocitos que se generan a partir de las mismas pueden usarse en trasplante celular como también para someter a ensayo fármacos en el desarrollo de nuevos fármacos, puesto que representan un sustituto de hepatocitos humanos primarios en el metabolismo de fármacos y selección farmacológica o toxicológica *in vitro* (Dan YY, 2012; Hook LA, 2012). Sin embargo, es actualmente imposible de determinar cuáles de las células progenitoras hepáticas hasta ahora identificadas son las mejores para la terapia de una enfermedad dada o para su uso. Esto es en gran parte debido a la gran variabilidad de procedimientos usados para caracterizar células y su capacidad de diferenciación, variabilidad de modelos de trasplante y procedimientos inconsistentes para determinar el efecto del injerto de células *in vivo*.

45

50

Los esferoides de hepatocitos u organoides hepáticos, que son agregados de hepatocitos esféricos, multicelulares mayores de 50 µm de diámetro, pueden proporcionar una construcción de tejido tridimensional útil para el trasplante de células e hígados bioartificiales. Varios procedimientos, tal como el cultivo de hepatocitos en superficies de plástico no adherentes para el auto-ensamblaje y cultivo rotacional por medio de frascos centrifugadores, se han empleado para la formación de esferoides a partir de hepatocitos mamíferos (Lu Y *et al.*, 2012; Saito R *et al.*, 2011; Soto-Gutierrez A *et al.*, 2010; Mitaka T y Ooe H, 2010; Tostoes RM *et al.*, 2012). Estas estructuras pueden generarse proporcionando soporte adecuado al crecimiento tri-dimensional de las células, en particular imitando sus interacciones con el microentorno hepático y especialmente con la matriz extracelular (ECM).

55

60

Existen pruebas considerables a partir de estudios *in vivo* de que las proteínas de matriz afectan a la activación, expansión, migración y diferenciación de células progenitoras hepáticas adultas, sin embargo la información del papel que desempeñan las proteínas específicas de ECM en actividades *in vivo* e *in vitro* está todavía limitada (Zhu C *et al.*, 2013). Algunas pruebas de la expresión de receptores específicos de ECM en células progenitoras hepáticas se han publicado (Najimi M *et al.*, 2007; Miyazaki M *et al.*, 2007). Sin embargo, no existen pruebas de cómo las células progenitoras hepáticas u otras células poco diferenciadas de origen hepático que presentan una combinación específica de marcadores hepáticos, marcadores mesenquimales y actividades metabólicas específicas del hígado pueden producirse en cultivo celular y que forman agrupaciones celulares tri-dimensionales sin hacer uso de soluciones técnicas inadecuadas y/o complejas que implican células madre embrionarias o pluripotentes, tecnologías de ADN recombinante o productos químicos.

65

El documento WO-A-2007/071339 y Scheers I *et al.*, 2012 se refieren a un procedimiento para obtener células madre / progenitoras hepáticas humanas. Seoung Woo Lee MD *et al.*, 2010 informaron del uso de la diálisis de albúmina para tratar la insuficiencia hepática en el caso de insuficiencia hepática aguda sobre crónica.

Sivasubramaniyan K *et al.*, 2013 identificaron SUSD2 (dominio Sushi que contiene proteína 2) como un marcador novedoso y específico para el aislamiento prospectivo de BM-MSC humanas (células madre mesenquimatosas de médula ósea).

## 5 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en la observación de que condiciones de cultivo celular específicas permiten obtener células progenitoras hepáticas adultas novedosas con perfil de expresión específico y características biológicas mejoradas y que pueden usarse para producir o bien composiciones farmacéuticas a base de células que pueden administrarse para el tratamiento de enfermedades hepáticas, o células metabólicamente activas y hepato-activas que pueden usarse para la caracterización de la eficacia, el metabolismo y/o la toxicidad de un compuesto.

Éstas células, denominadas células H2Stem, representan una población celular que tiene características morfológicas y funcionales que son distintas de aquéllas identificadas en células progenitoras hepáticas adultas anteriormente descritas que se aíslan o se producen de otro modo a partir de donadores humanos, en particular con respecto al alto nivel de expresión de proteínas que proporcionan actividades metabólicas específicas del hígado (por ejemplo actividad CYP3A4) en combinación con al menos un marcador mesenquimatoso (por ejemplo, seleccionado de vimentina, CD90, CD73, CD29, CD44, alfa actina de músculo liso) y al menos un marcador hepático (por ejemplo, seleccionado de albúmina, HNF-3b, HNF-4). Además, en algunas realizaciones, marcadores intracelulares adicionales pueden proporcionar criterios relevantes para la caracterización de células H2Stem, tal como la presencia significativa de células que expresan citoqueratina 19.

Las células H2Stem que se obtienen o que pueden obtenerse mediante los procedimientos de la invención se definen como una población celular que es positiva para al menos un marcador mesenquimatoso (opcionalmente seleccionado de ASMA, vimentina, CD90, CD73, CD44, y CD29), que es positiva para al menos un marcador hepático (opcionalmente seleccionado de HNF-4, HNF-3B, y albúmina), y son positivas para al menos una actividad metabólica específica del hígado (opcionalmente seleccionada de secreción de urea, conjugación de bilirrubina y actividad CYP3A4). Adicionalmente, las células H2Stem pueden comprender además una o más de las siguientes propiedades adicionales: que comprenden al menos el 20 %, entre el 20 % y el 90 %, o entre el 20 % y el 40 % de células positivas para citoqueratina 19 (cuando se mide mediante citometría de flujo), que es positiva para un marcador para proteína que contiene dominio Sushi 2, que presenta una morfología meso-epitelial cuboidal (es decir, una morfología similar a células epiteliales derivadas del mesodermo), y/o que son capaces de formar agrupaciones celulares tri-dimensionales que presentan actividades metabólicas específicas del hígado.

Una realización principal de la invención comprende una población celular humana aislada que comprende al menos el 60 % de células progenitoras hepáticas adultas humanas, caracterizada porque dichas células se miden positivas para:

- (a) al menos un marcador hepático seleccionado de albúmina, HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 y CYP3A4;
- (b) al menos un marcador mesenquimatoso seleccionado de vimentina, CD90, CD73, CD44 y CD29;
- (c) al menos una actividad específica del hígado seleccionada de secreción de urea, conjugación de bilirrubina, secreción de alfa-1-antitripsina y actividad CYP3A4;
- (d) proteína que contiene dominio Sushi 2 (SUSD2);
- (e) citoqueratina-19 (CK-19);
- (f) citoqueratina-18 (CK-18) y/o alfa actina de músculo liso (ASMA); y
- (g) al menos una actividad específica del hígado seleccionada de actividad sulfotransferasa, actividad triptófano-2,3-dioxigenasa, actividad carboxilasa hepática, metabolismo de amoníaco y almacenamiento de glucógeno,

en la que dichas células se miden negativas para uno o más de CD140b, CD45, CD117, CD31, CD133 y CD326, en la que dichas células tienen una morfología meso-epitelial cuboidal.

En algunas realizaciones, la célula progenitora hepática adulta puede caracterizarse además mediante una serie de marcadores negativos, en particular las células H2Stem pueden medirse negativas para uno o más de CD140b, CD45, CD117, CD31, CD133 y CD326. En realizaciones adicionales, las células H2Stem pueden medirse también positivas para una o más de las siguientes actividades y marcadores: citoqueratina-18 (CK-18); alfa actina de músculo liso (ASMA); una o más proteínas secretadas relacionadas con la coagulación (tal como fibrinógeno alfa, fibrinógeno beta, fibrinógeno gamma, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, y factor XIII); una o más actividades específicas del hígado adicionales (tal como actividad sulfotransferasa, actividad triptófano-2,3-dioxigenasa, actividad carboxilasa hepática, metabolismo de amoníaco y almacenamiento de glucógeno).

Las actividades biológicas, los marcadores y las características morfológicas/funcionales enumeradas anteriormente pueden estar presentes en células H2Stem en diversas combinaciones diferentes. En algunas

realizaciones, las células H2Stem se miden:

- 5 (a) positivas para albúmina, vimentina, CD90, CD73, secreción de urea, conjugación de bilirrubina, secreción de alfa-1-antitripsina, actividad CYP3A4, proteína que contiene dominio Sushi 2, citoqueratina-19 y actividad carboxilasa hepática; y también  
(b) negativas para CD140b.

También pueden determinarse criterios adicionales para células H2Stem de las realizaciones anteriores en cualquier combinación funcional y técnica, por ejemplo mediante medición positiva para:

- 10 - al menos un marcador hepático adicional seleccionado de HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 y CYP3A4;  
- al menos un marcador mesenquimatoso adicional seleccionado de CD44 y CD29;  
15 - al menos una actividad específica del hígado adicional seleccionada de actividad sulfotransferasa, actividad triptófano-2,3-dioxigenasa, metabolismo de amoníaco y almacenamiento de glucógeno;  
- al menos uno de citoqueratina-18 (CK-18) y alfa actina de músculo liso (ASMA); y/o  
- al menos una proteína secretada relacionada con la coagulación seleccionada de fibrinógeno alfa, fibrinógeno beta, fibrinógeno gamma, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, y factor XIII.

20 En algunas de las realizaciones anteriores, las células H2Stem pueden medirse negativas para al menos un marcador adicional seleccionado de CD45, CD117, CD31, CD133 y CD326.

25 En una realización aún adicional, las células H2Stem presentan morfología específica y/o características funcionales. En particular, las células H2Stem de las realizaciones anteriores pueden ser adherentes y pueden presentar morfología meso-epitelial cuboidal. Además, las células H2Stem de las realizaciones anteriores pueden ser capaces además de formar agrupaciones celulares tri-dimensionales en suspensión (denominadas células H3Stem). Tal como se resume en la figura 1, tanto las células H2Stem como H3Stem pueden diferenciarse además en células que presentan actividades específicas del hígado fuertes que son células adherentes (denominadas células H2Screen) y agrupaciones celulares tri-dimensionales en suspensión (denominadas células H3Screen).

30 En efecto, las células H2Stem de cualquiera de las realizaciones anteriores pueden usarse para proporcionar poblaciones de células aisladas, adicionales, agrupadas de manera colectiva con el nombre de progenie de H2Stem, que comprenden células H2Stem tal como se han definido anteriormente que se obtienen pasando las mismas en condiciones de cultivo celular. En particular, la progenie de H2Stem resulta del mantenimiento, proliferación y/o diferenciación de células H2Stem en condiciones de cultivo celular (o después del implante en un modelo animal), tal como se requiere para el uso deseado, y en particular como agrupaciones de células tri-dimensionales (progenie de H2Stem tridimensional). Estas estructuras tri-dimensionales no sólo presentan actividades metabólicas específicas del hígado mejoradas y mantienen una combinación de marcadores celulares específicos, sino que también proporcionan progenie de H2Stem en un formato que es particularmente adecuado para establecer formulaciones para usos terapéuticos y selección de alto rendimiento.

35 Por tanto, las realizaciones de población de células anteriores incluyen la progenie de H2Stem aislada que comprende células que presentan la actividad biológica, los marcadores, las características morfológicas y/o funcionales enumeradas anteriormente en una gran mayoría (por ejemplo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 %). En una realización preferente, una población de células H2Stem comprende al menos el 60 %, o entre el 60 % y el 99 % o entre el 70 % y el 90 % de células que se miden:

- 40 (a) positivas para albúmina, vimentina, CD90, CD73, secreción de urea, conjugación de bilirrubina, secreción de alfa-1-antitripsina, actividad CYP3A4, proteína que contiene dominio Sushi 2, citoqueratina-19 y actividad carboxilasa hepática; y  
45 (b) negativas para CD140b.

50 Además, tal progenie de H2Stem puede proporcionarse como células adherentes o que forman agrupaciones de células tri-dimensionales en suspensión, que preferentemente también presentan actividad dependiente de CYP fase I inducible y absorción de taurocolato, estrona-3-sulfato o 1-metil-4-fenilpiridinio. Además, tal población de células puede diferenciarse adicionalmente en células que presentan actividades específicas del hígado.

55 Las células H2Stem y la progenie de H2Stem pueden modificarse también por medio de uno o más agentes químicos, medio de cultivo celular, factores de crecimiento y/o vectores de ácidos nucleicos para cualquier uso in vivo o in vitro que requiera añadir o eliminar de manera apropiada cualquier propiedad de tales células.

60 En una realización principal adicional, la presente invención permite producir células H2Stem y progenie de H2Stem por medio de un procedimiento para obtener células progenitoras hepáticas adultas que comprende:

65

- (a) disociar hígado adulto o una parte del mismo para formar una población de células hepáticas primarias;
- (b) generar una preparación de las células hepáticas primarias de (a);
- (c) cultivar las células comprendidas en la preparación de (b) en un soporte que permite la adherencia y el crecimiento de las células en el mismo y la emergencia de una población de células que tienen morfología meso-epitelial cuboidal;
- (d) pasar las células de (c) al menos una vez; y
- (e) aislar una población de células obtenidas tras el pase de (d) que son positivas para al menos un marcador hepático y al menos un marcador mesenquimatoso, tienen al menos una actividad metabólica específica del hígado y mantienen una morfología meso-epitelial cuboidal.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener la población de células humanas aisladas tal como se ha descrito anteriormente que comprende:

- (a) disociar hígado adulto humano o una parte del mismo para formar una población de células hepáticas primarias;
- (b) generar una preparación de la población de células hepáticas primarias de (a);
- (c) cultivar las células comprendidas en la preparación de (b) en un medio de cultivo en un soporte que permite la adherencia y el crecimiento de las células en el mismo y la emergencia de una población de células que tienen morfología meso-epitelial cuboidal;
- (d) pasar las células de (c) que tienen morfología meso-epitelial cuboidal al menos una vez en dicho medio de cultivo de la etapa (c); y
- (e) aislar una población de células obtenidas tras el pase de la etapa (d) que mantienen una morfología meso-epitelial cuboidal, que son positivas para al menos un marcador hepático y al menos un marcador mesenquimatoso y que tienen al menos una actividad específica del hígado.

Los procedimientos de la presente invención se refieren al aislamiento de células hepáticas que pueden proporcionar células H2Stem (y por consiguiente para proporcionar también progenie de H2Stem) después de que se mantengan en condiciones de cultivo celular apropiadas. Estos procedimientos pueden aplicarse partiendo de células hepáticas primarias frescas de origen humano y/o de preparaciones criopreservadas de células hepáticas primarias. En algunas realizaciones de los procedimientos, estos procedimientos pueden por tanto implicar la medición de la positividad con respecto a uno o más marcadores en la etapa (e) y/o en la etapa (c).

En algunas de las realizaciones de los procedimientos, las células de la etapa (c) y/o la población de células de la etapa (e) se miden positivas para un marcador si al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 %, o entre el 60 % y el 99 %, o entre el 70 % y el 90 % de células en la población se determina que son positivas para ese marcador. En algunas de las realizaciones anteriores, las células de la etapa (c) y/o la población de células de la etapa (e) se miden negativas para un marcador si menos del 20 % o menos del 10 % de las células en la población se determina que son negativas para el marcador. En algunas de las realizaciones anteriores, la población de células de la etapa (e) comprende células adherentes o forma agrupaciones de células tri-dimensionales en suspensión, mientras que en otras realizaciones anteriores, la población de células de la etapa (e) presenta actividad dependiente de CYP fase I inducible y absorción de al menos uno de taurocolato, estrona-3-sulfato y 1-metil-4-fenilpiridinio. Las células de la etapa (c) y/o la población de células de la etapa (e) pueden modificarse también por medio de agentes químicos, medio de cultivo celular, factores de crecimiento y/o vectores de ácido nucleico para cualquier uso apropiado posterior *in vivo* o *in vitro*.

Por tanto, los procedimientos anteriores permiten la obtención de células H2Stem y progenie de H2Stem de las realizaciones anteriores. En algunas realizaciones de los procedimientos, las células de la etapa (c) y/o población de células de la etapa (e) pueden cultivarse en un soporte que puede revestirse con colágeno u otro péptido apropiado o proteína de matriz extracelular apropiada, pueden aislarse mediante medición al menos de la positividad para combinaciones específicas de marcadores hepáticos, marcadores mesenquimatosos y actividades metabólicas específicas del hígado. Entonces, dependiendo del uso deseado de células H2Stem y progenie de H2Stem, las células que se obtienen o que pueden obtenerse mediante este procedimiento pueden mantenerse en condiciones de cultivo celular que permiten su proliferación como células adherentes, suspensiones celulares o, mediante aplicación de condiciones específicas para mantenerlas, como células similares a hepatocitos o células hepato-activas. En particular, las agrupaciones de células tri-dimensionales (progenie de H2Stem tri-dimensional) que pueden formarse de una manera particularmente eficaz usando recipiente de baja adherencia disponible comercialmente (en la forma de placas o pocillos en forma de U) o en un biorreactor y pueden caracterizarse de acuerdo con sus características funcionales, dimensionales, morfológicas y/o antigénicas. El procedimiento de la invención puede comprender además una etapa (f) en la que la población de células de la etapa (e) se mantiene en una condición de cultivo celular para diferenciarlas en células que presentan actividades específicas del hígado.

Una progenie de H2Stem es una población celular que puede obtenerse mediante procedimientos de la invención y que comprende células que presentan la actividad biológica, los marcadores, las características

morfológicas y/o funcionales enumeradas anteriormente en una gran mayoría (por ejemplo al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %). En una realización preferente, una población de células H2Stem que puede obtenerse mediante los procedimientos de la invención comprende entre el 60 % y el 99 % o entre el 70 % o el 90 % de células que presentan las características enumeradas anteriormente en relación a la etapa step (e).

El procedimiento de la invención proporciona también progenie de H2Stem como células adherentes o que forman agrupaciones de células tri-dimensionales en suspensión, que preferentemente presentan también actividad dependiente de CYP fase I inducible y absorción de al menos uno de taurocolato, estrona-3-sulfato y 1-metil-4-fenilpiridinio. Además, tales poblaciones de células pueden diferenciarse además en células que presentan actividades específicas del hígado. Una población de células H2Stem que puede obtenerse mediante los procedimientos de la invención puede modificarse además por medio de agentes químicos, medio de cultivo celular, factores de crecimiento y/o vectores de ácidos nucleicos para cualquier uso apropiado *in vivo* o *in vitro*.

Los materiales biológicos que se obtienen cuando se generan células H2Stem o una progenie de H2Stem de acuerdo con la invención pueden usarse además para identificar entidades biológicas que pueden tener usos específicos, en particular distintas aplicaciones médicas. Estos materiales biológicos incluyen no sólo células H2Stem y progenie de H2Stem (o sub-población, líneas celulares y fracción de las mismas) que presentan características específicas (por ejemplo marcadores a base de proteína o ácido nucleico, actividades biológicas y/o morfología), sino también cualquier otra entidad que se obtiene cuando se producen preparaciones de células H2Stem o progenie de H2Stem a partir de cultivo de células hepáticas primarias. Los materiales biológicos de la invención incluyen, por ejemplo, medios de cultivo celular acondicionados y fracciones de estos medios que pueden contener proteínas, metabolitos, vesículas de membrana, antígenos y/o ácidos nucleicos que, junto o no con otras características que caracterizan las propias células (por ejemplo antígeno de superficie celular o actividades enzimáticas), pueden identificarse y usarse como marcadores para detectar células de interés médico o como compuestos que presentan actividades o distribución de interés médico, en particular en relación a enfermedades hepáticas. De hecho, el análisis comparativo de extractos de proteínas que se obtuvieron a partir de células H2Stem ha hecho posible identificar proteína que contiene dominio Sushi 2 como un marcador adicional para el cual son positivas las células H2Stem y que puede usarse para la caracterización de células H2Stem y progenie de H2Stem.

Las células H2Stem, progenie de H2Stem, materiales biológicos que se obtienen cuando se generan células H2Stem o una progenie de H2Stem, y composiciones que comprenden tales células o materiales biológicos (de manera colectiva "productos de H2Stem"), pueden ser útiles para un gran número de procedimientos y aplicaciones, o bien *in vivo* o *in vitro*. En particular, un producto de H2Stem puede usarse para tratar enfermedades (por ejemplo enfermedades hepáticas) y para estabilizar procedimientos y ensayos biológicos que requieren células que presentan características biológicas (tal como actividades metabólicas o enzimáticas, o un perfil antigénico) tan similares como sea posible a aquéllas observadas para hepatocitos primarios durante el periodo de tiempo deseado, una vez que se diferencian o bien *in vivo* o *in vitro*. Los productos de H2Stem preferentes son una progenie de H2Stem, un material biológico que se obtiene cuando se genera progenie de H2Stem, y una composición que comprende o bien progenie de H2Stem o tal material biológico. Más preferentemente, un producto de H2Stem es una progenie de H2Stem o una composición que comprende una progenie de H2Stem.

En particular, un producto de H2Stem puede usarse para la administración *in vivo* (en humanos o en animales, tal como en modelos animales), por ejemplo en forma de una composición farmacéutica que comprende tales células, para tratar una enfermedad hepática (tal como un error congénito del metabolismo hepático, un trastorno de la coagulación de la sangre hereditaria, colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1 / 2 / 3, deficiencia de alfa 1-antitripsina, defecto de transportadores de células hepáticas, porfiria, hígado graso u otra enfermedad hepática fibrótica, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad degenerativa hepática e insuficiencia hepática aguda o crónica). Estas composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse como productos de H2Stem que combinan células H2Stem (o una progenie de H2Stem dada) con un soporte (por ejemplo una matriz, una cápsula, un soporte o un dispositivo) y/o una solución (por ejemplo medio de cultivo celular o tampón) que es apropiado para el procedimiento de tratamiento deseado, administración y/o almacenamiento, como también en los medios preferentes para proporcionar tales composiciones farmacéuticas (por ejemplo dentro de un kit). Otros agentes de origen biológico (por ejemplo anticuerpos o factor de crecimiento) o de origen químico (por ejemplo fármacos, compuestos de conservación o etiquetado) que pueden proporcionar cualquier otro efecto útil pueden combinarse también en tales composiciones.

Un procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad comprende administrar un producto de H2Stem, tal como células H2Stem o una progenie de H2Stem dada, y preferentemente dentro de una composición, a un sujeto que lo necesita. En particular, un procedimiento de tratamiento de una enfermedad (por ejemplo una enfermedad hepática) en un paciente que lo necesita comprende administrar una cantidad eficaz de un producto de H2Stem al paciente.

Un producto de H2Stem puede usarse también para estudios *in vitro*, en particular para estudios farmacológicos para la evaluación de la eficacia, metabolismo, estabilidad y/o toxicidad de uno o más componentes exógenos tal como un producto biológico (tal como una proteína, un ácido nucleico, lípidos o un azúcar) o un compuesto químico (orgánico o inorgánico, incluyendo sales o metales). Este enfoque puede usarse por tanto para estudiar efectos de otras células (tal como bacterias u otras células, preferentemente de origen humano) sobre un producto de H2Stem, como también evaluar la infección y/o la replicación de virus específicos del hígado (por ejemplo virus de la hepatitis) que puede purificarse posteriormente o detectarse de otro modo.

Por tanto, la presente invención proporciona también procedimientos para la evaluación de la eficacia, el metabolismo, la estabilidad y/o la toxicidad de uno o más componentes exógenos, o bien *in vitro* o *in vivo*, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) proporcionar un producto de H2Stem;
- (b) exponer dicho producto de H2Stem a uno o más componentes exógenos seleccionados de compuestos químicos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, azúcares, metales, sales, virus, bacterias y células; y
- (c) detectar los efectos de dicho uno o más componentes exógenos sobre dicho producto de H2Stem y/o detectar la presencia, localización o modificación de dicho uno o más componentes exógenos después de la exposición a dicho producto de H2Stem.

Este procedimiento general puede incluir en algunas realizaciones etapas y características adicionales que se aplican a usos y/o tecnologías específicos. Por ejemplo, la etapa (c) tal como se ha definido anteriormente puede comprender detectar los efectos sobre la morfología celular, sobre la viabilidad celular, sobre la regulación por incremento o disminución de proteínas específicas y o no específicas del hígado y/o sobre la degradación, agregación, activación o inhibición de proteínas dentro de un producto de H2Stem. Además, la etapa (c) tal como se ha definido anteriormente puede comprender detectar la internalización de uno o más componentes exógenos de este tipo en, o la asociación física con, un producto de H2Stem. El producto de H2Stem puede proporcionarse por tanto a un animal en la etapa (a), y entonces se administra uno o más componentes exógenos a dicho animal en la etapa (b). Finalmente, la etapa (c) comprende detectar los efectos de dicho uno o más componentes exógenos en dicho producto de H2Stem o en dicho animal, y/o detectar la presencia, localización o modificación de dicho uno o más componentes exógenos después de la exposición a dicho producto de H2Stem en el animal.

Los procedimientos de uso de productos de H2Stem pueden implicar por tanto la exposición de la población de células, composición o material biológico en la etapa (b), de manera simultánea o secuencial en cualquier orden, a:

- (i) uno o más componentes exógenos que tienen un efecto sobre la morfología celular, la viabilidad celular, la regulación por incremento o disminución de proteínas específicas o no específicas del hígado, y/o que degradan, agregan, activan o inhiben proteínas dentro de un producto de H2Stem; y
- (ii) uno o más componentes exógenos que se pretende que bloqueen o eviten tales efectos dentro del producto de H2Stem.

En algunas realizaciones, este procedimiento se pretende que use cualquier producto de H2Stem y en particular una progenie de H2Stem como modelo de células hepáticas para determinar si, cuando se exponen a un componente exógeno que es agente patógeno, un componente exógeno adicional que es un fármaco candidato que selecciona como diana de manera específica el agente patógeno y/o sus efectos, tiene propiedades terapéuticas puesto que evita o bloquea cualquier efecto indeseable del agente patógeno (por ejemplo infección viral, apoptosis, transformación oncogénica, reducción de actividades específicas del hígado, etc.). En particular, el componente exógeno de (i) anteriormente, que es agente patógeno, comprende un agente infeccioso, tumorigénico, citotóxico o genotóxico y los demás componentes exógenos de (ii) anteriormente, que son un fármaco candidato que selecciona como diana de manera específica el agente patógeno y/o sus efectos, comprende una proteína, un ácido nucleico, una célula, un virus o un compuesto químico.

Una realización final de la invención proporciona un kit que comprende una población de células humanas o una composición tal como se ha descrito anteriormente, en el que dicho kit comprende además uno o más viales que contienen dicha población de células humanas, o dicha composición, y uno o más de los siguientes elementos: dispositivos, materiales desechables, soluciones, productos químicos, productos biológicos y/o instrucciones para usar elementos de dicho kit. El producto de H2Stem puede proporcionarse en un kit, por ejemplo, para los usos y procedimientos de las aplicaciones tal como se han descrito anteriormente, incluyendo para transferir un producto de H2Stem a una institución clínica y proporcionar medios para la administración del mismo a un paciente. Este kit puede comprender un producto de H2Stem y, opcionalmente, otros elementos que permiten usar y/o detectar el producto de H2Stem y sus actividades, como también para usar y/o detectar cualquier compuesto adicional relevante. Este kit puede comprender uno o más viales que contienen un producto de H2Stem (por ejemplo una progenie de H2Stem o una composición que comprende progenie de H2Stem) y uno o más de los siguientes elementos que van a seleccionarse de acuerdo con el uso específico: dispositivos, materiales desechables, soluciones, productos químicos, productos biológicos y/o instrucciones para usar los elementos de dicho kit.

La descripción detallada y los ejemplos proporcionan detalles adicionales sobre las células, las poblaciones de células, los procedimientos, las células que pueden obtenerse mediante estos procedimientos, y sobre realizaciones adicionales de la invención que se asocian a dichos procedimientos y productos de H2Stem.

5

## DESCRIPCIÓN DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de flujo que compara el proceso para la obtención de y el uso de células ADHLSC y células H2Stem. Tanto las células ADHLSC como las células H2Stem pueden prepararse partiendo de células primarias aisladas de hígado humano que pueden usarse directamente o preparando preparaciones criopreservadas de células hepáticas primarias humanas para el almacenamiento a largo plazo. Las células H2Stem con características específicas del hígado mejoradas y una morfología meso-epitelial cuboidal pueden usarse para la generación de progenie de H2Stem para aplicaciones apropiadas *in vivo* o *in vitro*, en condiciones de cultivo celular bi-dimensional (2D) o tri-dimensional (3D) (es decir mediante mantenimiento de células H2Stem y progenie de H2Stem como células adherentes o en frascos y otros recipientes con bajas propiedades de adherencia celular, respectivamente). La progenie de H2Stem tri-dimensional se forma mediante agrupaciones de células que se caracterizan por medio de marcadores específicos y/o actividades biológicas. Inicialmente, las células H2Stem pueden usarse para generar, con o sin una expansión intermedia como células adherentes (por ejemplo en un sustrato tal como colágeno), una progenie de H2Stem que está caracterizada como o bien células similares a hepatocitos adherentes, diferenciadas (células H2Screen) o agrupaciones tri-dimensionales que comprenden células progenitoras hepáticas (células H3Stem). Cada uno de estos dos tipos de progenie de H2Stem puede usarse adicionalmente para generar progenie de H2Stem tri-dimensional que comprende células metabólicamente muy activas que se definen respectivamente como células H3Screen-1 y células H3Screen-2, de acuerdo con los dos protocolos alternativos para generarlas. Las células H3Screen-2 pueden generarse también directamente a partir de progenie de H2Stem (es decir sin la etapa de obtención de células H3Stem) mediante cultivo de progenie de H2Stem en condiciones tri-dimensionales y en un medio de cultivo celular que proporciona diferenciación específica del hígado, *in vitro*. Dependiendo de las condiciones de cultivo celular en las que se mantienen las células H3Screen, estas células pueden formar formatos alternativos de agrupaciones de células tri-dimensionales en suspensión (células H3Screen-2a y células H3Screen-1) o como células adherentes (células H3Screen-2b y células H3Screen-2c). El almacenamiento a largo plazo mediante criopreservación puede aplicarse a tanto células ADHLSC y células H2Stem si se necesita (es decir si la expansión, diferenciación y/o cultivo como progenie de H2Stem tri-dimensional no es inmediato sino que se aplica posteriormente en el proceso), como también a una progenie de H2Stem específica en un estado estructural o de diferenciación dado.

Figura 2: Características que distinguen células ADHLSC adherentes, no diferenciadas o hepatocitos humanos primarios de células H2Stem adherentes, no diferenciadas y progenie de H2Stem cuando se cultivan en un sustrato tal como colágeno. Morfológicamente, las células ADHLSC no diferenciadas aparecen como una población homogénea de células alargadas, mientras que las células H2Stem aparecen como una población homogénea de células meso-epiteliales, cuboidales (A). Cuando se analizan mediante inmunocitoquímica usando un anticuerpo anti-CK-19, aparecen hepatocitos humanos primarios (como células ADHLSC) que expresan poco CK-19, mientras que las células H2Stem aparecen como altamente positivas para CK-19, con núcleos rodeados por filamentos (B) más oscuros fuertemente positivos para CK-19. Las células se fotografiaron con un aumento de 10X (A) o 40x para (B).

Figura 3: Morfología de células H2Stem que se obtienen mediante cultivo de células hepáticas primarias en condiciones de cultivo celular apropiadas. Se tomaron imágenes usando el equipo Cell-IQ cada hora en la misma posición en la placa de los días 1 a 8 y se ha realizado una selección de imágenes en las horas indicadas para mostrar la transición morfológica de células hepáticas primarias a una agrupación de células H2Stem proliferativas, adherentes. Las células se fotografiaron con un aumento de 20x.

Figura 4: Características que distinguen células ADHLSC adherentes, diferenciadas de células H2Screen adherentes, no diferenciadas cuando se cultivaron en un sustrato tal como colágeno. Morfológicamente, después de la diferenciación como células adherentes, las células ADHLSC aparecen como una población de células no-granular, homogénea poligonal (A, panel izquierdo, etapa temprana), mientras que una progenie de H2Stem que comprende células H2Screen aparecen como una población homogénea de células granulares, cuboidales/poligonales con soporte estromal que, en una etapa más avanzada de cultivo celular y diferenciación, pueden formar agrupaciones celulares distribuidas dentro de estructuras estromales grandes (A, panel derecho, etapa tardía). En estas imágenes posteriores, la caja blanca 1 indica áreas de células con morfología similar a hepatocitos y canaliculos biliares comienzan a aparecer; la caja blanca 2 indica un área con células binucleadas y matriz extracelular. Las células se fotografiaron con un aumento de 20x). Las células ADHLSC diferenciadas y células H2Screen se caracterizaron de acuerdo con su actividad CYP3A4 (B) y secreción de urea (C). El nivel basal de actividad es  $10^{-9}$  pmol/célula/4h y 5 pg/célula/24h, respectivamente. Niveles de secreción de urea más altos para células H2Screen, cuando se

65

compararon con células ADHLSC, se midieron también realizando los ensayos durante periodos más cortos (2-6 horas). La inmunohistoquímica (D) confirma además la fuerte expresión de H2Screen, cuando se comparó con control negativo (anticuerpo no primario), de albúmina intracelular y CK-19, como también del transportador de eflujo MRP2 (en la superficie de contacto entre células; véase las flechas).

5  
Figura 5: Morfología de distintas formas de progenie de H2Stem que consiste en agrupaciones de células tri-  
dimensionales. Las células H3Stem forman inicialmente agrupaciones de aproximadamente 50-100  
10  $\mu\text{m}$  con un núcleo más denso de células que posteriormente pueden formar estructuras más grandes (hasta 1000 $\mu\text{m}$  o más) y que comprenden 100000 o más de tales células (A). Las células H3Screen-1 que se obtienen a partir de células H2Screen aparecen como agrupación de células granulares cuboidales/poligonales, similares a hepatocitos rodeadas por estroma de soporte (B). Las células H3Screen-2a consisten también en agrupaciones tri-dimensionales de células granulares cuboidales/poligonales similares a hepatocitos rodeadas por estroma de soporte que pueden obtenerse realizando diferenciación *in vitro* usando placas de baja unión (C) o en pocillos de baja unión, en forma de U donde se obtienen células H3Screen-2a tri-dimensionales más uniformes (D; también células H3Stem forman estructuras similares cuando se usa el mismo enfoque para cultivarlas). Finalmente, cuando las células H3Screen se cultivan en un sustrato como colágeno, las células H3Screen-2b resultantes aparecen como agrupaciones adherentes de células que son similares a hepatocitos y se distribuyen dentro de estroma de soporte y estructuras granulares intracelulares extensas (E; la caja blanca en el panel 1 está aumentada en el panel 2). Las células se fotografiaron con un aumento de 10x (panel 1 de E).

Figura 6: Distintos tipos de progenie de H2Stem pueden proporcionar progenie de H2Stem tri-dimensional que tiene tamaño homogéneo de acuerdo con los diferentes enfoques. El diagrama de flujo resume las etapas para la obtención de tales preparaciones de células (A). Una progenie de H2Stem específica se usa para sembrar células, en un volumen y concentración dados, en cada uno de los frascos de cultivo celular de unión ultra-baja, añadiendo 5 ml de medio de cultivo celular fresco con igual frecuencia. Por otra parte pueden usarse placas de microtitulación de cultivo celular redondas/en forma de U, de unión ultra-baja, que contienen 96 pocillos para sembrar y hacer crecer estas células con el fin de obtener una estructura a modo de esfera para cada pocillo. La progenie de H2Stem tri-dimensional resultante puede usarse dentro del mismo pocillo (sustituyendo el medio de cultivo celular y/o añadiendo reactivos) o después de transferir y combinar el contenido de 2, 5, 10 o más pocillos en un recipiente apropiado. La foto en el cuadro de texto en la parte inferior del diagrama de flujo en (A) muestra una preparación combinada de este tipo de células H3Screen-2a, pero es representativa de otra progenie de H2Stem tri-dimensional que o bien no está diferenciada (células H3Stem) o están diferenciadas (células H3Screen-1) y se obtienen usando el mismo enfoque. La morfología de estructuras a modo de esfera que comprende células H3Stem o células H3Screen-2a que se generan usando las placas de microtitulación de cultivo celular redondas/en forma de U, de unión ultra-baja puede compararse (B). Debido a la diferenciación que proporciona células más grandes, las estructuras a modo de esfera que comprenden células H3Screen-2a son más grandes que las estructuras a modo de esfera que comprenden un número equivalente de células H3Stem.

Figura 7: Comparación de expresión de proteína y actividades de enzimas hepáticas en diferentes categorías de progenie de H2Stem, y en una preparación de hepatocitos humanos primarios. La actividad CYP3A4 durante un periodo de 4 horas se compara (A). El análisis de inmunotransferencia tipo Western (B) muestra que, en presencia de cantidades similares de proteína en los extractos (tal como se confirma usando un anticuerpo anti-beta actina como control), las células H2Stem presentan baja cantidad de proteínas SULT1 y de proteínas UGT1A que se expresan más en células H3Stem y (en particular para SULT1) en células H3Screen-2a. Son visibles bandas múltiples para SULT1 mientras que el anticuerpo que se ha usado es una preparación comercial de un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce un epítipo común para diferentes isoformas de SULT1A humanas (sulfotransferasa 1A1, 1A2 y 1A3) y es parcialmente reactiva de manera cruzada con otros miembros de la familia de SULT de origen humano (véase la descripción para anticuerpo de SULT1 H-55; Santa Cruz n.º de cat. sc-32928). Los datos sobre expresión de proteínas se confirman de manera cualitativa sometiendo a ensayo las correspondientes actividades enzimáticas (C). La capacidad de células H3Stem y células H3Screen-2a para absorber tres sustratos químicos específicos (taurocolato, estrona-3-sulfato, 1-metil-4-fenilpiridinio) mediante sus respectivos transportadores (polipéptido de co-transporte de taurocolato de sodio, NTCP; polipéptido de transporte de anión orgánico, OATP; transportador de catión orgánico, OCT) se ha determinado en tales células en dos momentos, con un perfil cinético de la absorción que confirma cómo H3Screen-2b muestra un proceso genuinamente activo y no un proceso simple de difusión pasiva, para tales compuestos (D). Se obtuvieron datos cualitativamente comparables en metabolización basal e inducida de fármacos mediante enzimas de fase I (fenoacetina mediante CYP1A2; bupropiona mediante CYP2B6; diclofenaco mediante CYP2C9; midazolam mediante CYP3A4) después de 4 horas, mediante comparación de H3Stem y H3Screen-2a con hepatocitos primarios.

Figura 8: Otras actividades específicas del hígado y otros marcadores caracterizan la progenie de H2Stem. La actividad carboxilasa hepática (actividad CES1) se ha comparado con células ADHLSC, línea de células de referencia HepG2, hepatocitos primarios, células H2Stem y células H3Stem durante el

periodo de tiempo indicado (A). La secreción de alfa-antitripsina (AAT) se ha comparado usando ELISA entre células ADHLSC y células H2Stem (B).

Figura 9: El proteoma de células ADHLSC y células H2Stem puede caracterizarse mediante análisis de componente principal, *Principal Component Analysis*, (PCA), identificando grupos de proteínas que están sobre/sub-representadas en estas poblaciones de células progenitoras hepáticas adultas específicas cuando se comparan con otras. El proteoma global de distintas preparaciones celulares está representado gráficamente (véanse puntos para distintas preparaciones de células ADHLSC y estrellas para distintas preparaciones de células H2Stem). Este enfoque permite concluir que diferentes preparaciones de células ADHLSC y células H2Stem pueden agruparse todavía por tipo de célula (A). Este análisis de base proteómica sobre la presencia combinada (o ausencia) de proteínas específicas (o isoformas de proteínas) tal como se establece mediante un enfoque de este tipo puede validarse adicionalmente mediante estudios de base transcriptómica, RT-PCR o mediante tecnologías a base de anticuerpo (tal como citometría de flujo, inmunotransferencia de tipo Western, inmunocitoquímica). Este enfoque puede aplicarse también para identificar marcadores que distinguen células H2Stem (o un tipo de progenie de H2Stem) de otras poblaciones de células *in vivo* y/o *in vitro*, como también para la evaluación de actividades metabólicas específicas del hígado o características específicas de células H2Stem entre preparaciones diferentes de células H2Stem o progenie de H2Stem.

Figura 10: Pueden usarse proteínas de superficie celular como biomarcadores para distinguir células H2Stem de células ADHLSC. Una proteína de superficie celular denominada proteína que contiene dominio Sushi 2 (SUSD2) se expresa de manera muy fuerte cuando se comparan extractos de proteína de células H2Stem y ADHLSC mediante inmunotransferencia de tipo Western, usando un anticuerpo anti-SUSD2 y (como control para la cantidad de proteínas totales en la muestra) un anticuerpo anti-beta actina (A). Cuando el análisis se realiza mediante FACS para comparar la expresión de SUSD2 con otro marcador de superficie celular tal como CD140b y el punto de corte entre células de expresión y de no expresión se coloca en la intensidad en la que el 3 % de las células es positiva para el control negativo de isotipo, la diferencia en la expresión de SUSD2 aparece más reducida, especialmente cuando se compara la positividad de CD140b que permite claramente diferenciar entre células H2Stem de baja expresión y células ADHLSC de alta expresión (B). Sin embargo, los detalles de la distribución de intensidad de señal para el fluoróforo específico en células positivas (PE-pos) muestra que aquellas células ADHLSC que expresan SUSD2 realmente la expresa a niveles mucho más bajos que las células H2Stem, mientras que los datos de CD140b muestran que este marcador se expresa de manera claramente fuerte sólo en una gran mayoría de células ADHLSC.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Una realización principal de la invención comprende células H2Stem y progenie de H2Stem caracterizadas mediante combinaciones novedosas, actividades biológicas y marcadores que pueden identificarse en su superficie, intracelular y/o secretados en el medio de cultivo celular. Estas características, junto con características morfológicas y funcionales, se determinaron en asociación con los procedimientos para producir células H2Stem y progenie de H2Stem en condiciones de cultivo celular, que definen los criterios positivos (o negativos) que caracterizan tales células, en particular para un procedimiento que comprende:

- (a) disociar hígado adulto o una parte del mismo para formar una población de células hepáticas primarias;
- (b) generar preparaciones de las células hepáticas primarias de (a);
- (c) cultivar las células comprendidas en las preparaciones de (b) en un soporte que permite la adherencia y el crecimiento de las células en el mismo y la emergencia de una población de células que tienen morfología meso-epitelial cuboidal;
- (d) pasar las células de (c) al menos una vez; y
- (e) aislar la población de células que se obtiene después del pase de (d) que son positivas para al menos un marcador hepático y un marcador mesenquimatoso y para al menos una actividad metabólica específica del hígado y mantener una morfología meso-epitelial cuboidal.

Con respecto a la etapa (a) del procedimiento, la etapa de disociación implica obtener hígado adulto o una parte del mismo que contiene, junto con hepatocitos completamente diferenciados, una cantidad de células primarias que pueden usarse para producir células H2Stem. Las células primarias hepáticas se aíslan de manera preferente de tejidos hepáticos humanos que pueden obtenerse de hígado adulto.

El término "hígado" se refiere al órgano hepático. El término "parte del hígado" se refiere generalmente a una muestra de tejido derivada de cualquier parte del órgano hepático, sin ninguna limitación en cuanto a la cantidad de dicha parte o la región del órgano hepático donde se origina. Preferentemente, todos los tipos de células presentes en el órgano hepático pueden estar representados también en dicha parte del hígado. La cantidad de la parte de hígado puede seguir al menos en parte las consideraciones prácticas con respecto a la necesidad de obtener bastantes células hepáticas primarias para poner en práctica de manera razonable el procedimiento de la invención. Por tanto, una parte de hígado puede representar un porcentaje del órgano hepático (por ejemplo al menos el 1 %, 10 %, 20 %, 50 %, 70 %, 90 % o más, normalmente p/p). En otros ejemplos no limitativos, una

parte de hígado puede definirse en peso (por ejemplo al menos 1 g, 10 g, 100 g, 250 g, 500 g o más). Por ejemplo, una parte de hígado puede ser un lóbulo hepático, por ejemplo el lóbulo derecho o lóbulo izquierdo, o cualquier segmento o muestra de tejido que comprende un gran número de células que se extirpa durante una operación de hígado dividido.

5

El término "hígado adulto" se refiere a hígado de sujetos que son postnatales, es decir cualquier momento después del nacimiento, preferentemente a término completo, y puede ser por ejemplo al menos al menos 1 día, 1 semana, 1 mes o más de 1 mes de edad después del nacimiento, o al menos 1, 5, 10 años o más. Por tanto, un "hígado adulto", o hígado maduro, puede encontrarse en sujetos humanos que se describirían por el contrario en los términos convencionales de "bebé", "niño", "adolescente" o "adulto". El hígado o parte del mismo se obtiene a partir de un "sujeto" o "donante", que se refiere de manera intercambiable a un animal vertebrado, preferentemente a un mamífero, más preferentemente a un ser humano. En otra realización, el hígado adulto o parte del mismo puede ser de un n sujeto animal no humano, preferentemente un sujeto mamífero no humano (por ejemplo un roedor o cerdo).

10

15

Un donante puede estar vivo o muerto, tal como se determina mediante criterios aceptados clínicamente, tal como los criterios de "corazón-pulmón" (que implican una cesación irreversible de funciones circulatorias y respiratorias) o los criterios de "muerte cerebral" (que implican una cesación irreversible de todas las funciones de todo el cerebro, incluyendo el tallo encefálico). La colecta puede implicar procedimientos conocidos tal como biopsia, resección o escisión. La colecta de tejido hepático de un donante humano vivo puede necesitar que sea compatible con el sustento de vida adicional del donante. El hígado o parte del mismo puede obtenerse a partir de un donante, especialmente donante humano, que tiene circulación sostenida, por ejemplo, un corazón palpitante y funciones respiratorias sostenidas, por ejemplo, pulmones en respiración o ventilación artificial. Sólo una parte del hígado puede retirarse normalmente de un donante humano vivo (por ejemplo, mediante biopsia o resección), de manera que se mantenga un nivel adecuado de funciones hepáticas normales en el donante, tal como se requieren mediante normas legales y éticas.

20

25

Sujeto a las normas éticas y legales, puede necesitarse o no que el donante esté muerto cerebralmente (por ejemplo, la eliminación de todo el hígado o parte del mismo, que no sería compatible con la supervivencia adicional de un donante humano, puede permitirse en seres humanos con muerte cerebral). La colecta de hígado o parte del mismo de tales donantes es ventajosa, puesto que el tejido no sufre anoxia sustancial (pérdida de oxigenación), que normalmente resulta de isquemia (cesación de circulación). En el momento de la colecta del tejido pueden haber cesado la circulación y/o las funciones respiratorias, sin ventilación artificial. Mientras que el hígado o parte del mismo de estos donantes puede haber sufrido al menos algún grado de anoxia, el hígado de donantes cadavéricos puede usarse para la obtención de células H2Stem en condiciones de cultivo celular, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas o más después del cese de la circulación del donante.

30

35

Los tejidos recolectados tal como anteriormente pueden enfriarse hasta aproximadamente temperatura ambiente o hasta una temperatura inferior a la temperatura ambiente, pero normalmente se evita la congelación del tejido o partes del mismo, especialmente donde tal congelación daría como resultado la nucleación o el crecimiento de cristales de hielo. Por ejemplo, el tejido puede conservarse a cualquier temperatura entre aproximadamente 1 °C o aproximadamente 4 °C y temperatura ambiente, y puede conservarse de manera ventajosa a aproximadamente 4 °C, por ejemplo en hielo. El tejido puede enfriarse durante todo o parte del tiempo isquémico, es decir el tiempo después del cese de la circulación en el donante. Es decir, el tejido puede someterse a isquemia caliente, isquemia fría o una combinación de isquemia caliente y fría. El tejido recolectado puede conservarse así durante, por ejemplo hasta 48 horas antes del procesamiento, preferentemente durante menos de 24 horas, por ejemplo más preferentemente durante menos de 12 horas (por ejemplo, menos de 6, 3, o 1 hora). Puede ser ventajoso que el tejido recolectado no necesite conservarse en, por ejemplo sumergido completamente o al menos parcialmente en, un medio adecuado y/o puede que no sea necesario que se perfunda con el medio adecuado, antes del procesamiento posterior del tejido. Un experto puede seleccionar un medio adecuado que puede soportar la supervivencia de las células del tejido durante el periodo antes del procesamiento.

40

45

50

El procedimiento de la invención comprende disociar tejido de hígado adulto tal como se ha descrito anteriormente para formar una población de células primarias. El término "disociar" tal como se usa en el presente documento se refiere generalmente a la disrupción parcial o completa de la organización celular de un tejido u órgano, es decir, disrupción parcial o completa de la asociación entre células y componentes celulares de un tejido u órgano, para obtener una suspensión de células (una población celular) a partir de dicho tejido u órgano. La suspensión puede comprender células solitarias o individuales, como también células unidas físicamente para formar agrupaciones o grupos de dos o más células. La disociación preferentemente no provoca o provoca una reducción tan pequeña como sea posible de la viabilidad celular. Un procedimiento adecuado para la disociación del hígado o parte del mismo para obtener una población (suspensión) de células primarias a partir del mismo puede ser cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a digestión enzimática, separación mecánica, filtración, centrifugación y combinaciones de los mismos. En particular, el procedimiento para la disociación del hígado o parte del mismo puede comprender la digestión

55

60

65

enzimática del tejido hepático para liberar células hepáticas y/o la disrupción mecánica o separación del tejido hepático para liberar células hepáticas.

5 Los procedimientos para la disociación del hígado o parte del mismo tal como anteriormente se documentan en la bibliografía como la técnica de perfusión con colagenasa usada ampliamente en dos o más etapas, que se ha adaptado y modificado de manera diversa para su realización con hígados completos o segmentos de hígado. El tejido hepático se perfunde con una solución de tampón libre de cationes divalentes, calentada previamente a 37 °C, que contiene un agente de quelación de cationes (por ejemplo EDTA o EGTA). Las soluciones de tampón pueden comprender soluciones salinas (por ejemplo HEPES, medio de Williams E) o cualquier otra solución salina equilibrada que puede incluir también sales tales como NaCl y KCl, entre otras. Esto conduce a la disrupción de las estructuras desmosómicas que mantienen juntas las células. El tejido se perfunde entonces con la solución de tampón que contiene catión (cationes) divalente(s), tal como Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, y enzimas de degradación de matriz que actúan para digerir el tejido.

15 Las células hepáticas primarias se liberan normalmente mediante disrupción mecánica suave y/o presionando a través de filtros, para completar mecánicamente el proceso de disociación celular. Tales filtros pueden tener tamaños de tamiz que permiten el paso de células a través de aproximadamente 0,1 mm, 0,25 mm, 0,50 mm, 1 mm o más. Una sucesión de filtros con tamaños de tamiz progresivamente más pequeños puede usarse para disociar de manera gradual el tejido y liberar las células. Las células disociadas se lavan con un tampón que contiene inhibidor de proteasa, suero y/o plasma para inactivar colagenasa y otras enzimas usadas en el proceso de perfusión, y entonces se separan de la mezcla mediante precipitación de las mismas con centrifugación con baja velocidad (por ejemplo con entre 10 x g y 500 x g). La mayor parte de, si no todas, las células viables pueden precipitarse, mientras que las células muertas y residuos celulares se eliminan sustancialmente y posteriormente se lavan con solución de tampón enfriada con hielo para purificar la suspensión celular. El número y la calidad de las células hepáticas primarias puede variar dependiendo de la calidad del tejido, las composiciones de diferentes soluciones que se usan y el tipo y concentración de enzima. La enzima es frecuentemente colagenasa, sin embargo puede usarse también pronasa, tripsina, hialuronidasa, termolisina y combinaciones de las mismas. La colagenasa puede consistir en una combinación poco purificada de enzimas y/o puede mostrar actividad proteasa, que puede provocar reacciones inesperadas que afectan a la calidad y la cantidad de células viables que a su vez pueden evitarse mediante selección de preparaciones enzimáticas de suficiente pureza y calidad. Otros procedimientos de recolección de células hepáticas primarias pueden excluir técnicas de digestión enzimática y pueden implicar perfusión de hígado con soluciones que contienen sacarosa seguido de disrupción mecánica.

35 Con respecto a la etapa (b) del procedimiento, la preparación de células primarias hepáticas que se obtiene después de la disociación de tejido hepático puede ser normalmente una población heterogénea de células hepáticas primarias, que comprende células que pertenecen a cualquier tipo de célula constituyente del hígado, incluyendo células progenitoras o madre, que pueden estar presentes en un parénquima hepático y o en un no parénquima del mismo. Los tipos de célula que constituyen el hígado a modo de ejemplo incluyen hepatocitos, colangiocitos, células de Kupffer, células estrelladas hepáticas y células endoteliales hepáticas, además de células madre o progenitoras.

45 El término "hepatocito" engloba células hepáticas parenquimatosas, epiteliales, que incluyen pero no se limitan a hepatocitos de diferentes tamaños o ploidía (por ejemplo, diploide, tetraploide, octaploide).

El término "célula primaria" incluye células presentes en una suspensión de células obtenidas a partir de un tejido u órgano de un sujeto, por ejemplo hígado, mediante disociación de células presentes en tal tejido u órgano explantado con técnicas apropiadas.

50 Los procedimientos de la invención pueden empezar preferentemente desde una población celular representativa de la mayor parte de, si no todos, los tipos de células hepáticas por el alcance de obtener las células progenitoras hepáticas adultas deseadas en condiciones de cultivo celular. Una población de células de partida adecuada para la obtención de células H2Stem puede comprender hepatocitos en diferentes proporciones (0,1 %, 1 %, 10 %, o más de células totales), de acuerdo con el procedimiento de disociación del hígado y/o cualquier procedimiento para fraccionar o enriquecer la preparación inicial para hepatocitos y/u otros tipos de célula basándose en las propiedades físicas (dimensión, morfología), viabilidad, condiciones de cultivo celular o expresión de marcador de superficie celular mediante aplicación de cualquier técnica adecuada.

60 La población de células primarias tal como se define y se obtiene en el presente documento mediante disociación del hígado (o parte del mismo) puede usarse inmediatamente para establecer cultivos celulares como células hepáticas primarias frescas o, preferentemente, pueden almacenarse como preparaciones crioconservadas de células hepáticas primarias usando tecnologías comunes para su conservación a largo plazo. De hecho, el uso de preparaciones de células crioconservadas parece tener un efecto positivo sobre la eficacia con la que se producen posteriormente células H2Stem y progeñie de H2Stem en el cultivo celular. Las células en estas muestras pueden congelarse en un medio de cultivo celular o una solución para conservar células u órganos (por ejemplo Viaspan, Cryostor, Celsior) que se complementan o no con otros compuestos tal como factores de

crecimiento, suero, soluciones tampón, glucosa, albúmina, etilen glicol, sacarosa, dextrosa, DMSO o cualquier otro agente crioprotector. Cada preparación crioconservada puede contener al menos  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  células o más por criovial o bolsa, en el alcance de producción y aislamiento de cantidad más alta de células H2Stem en condiciones de cultivo celular después de descongelar de manera apropiada la muestra y, si es necesario, lavar las células con tampón o medio de cultivo celular apropiado para eliminar medio de cultivo celular residual o una solución para conservar células u órganos.

Con respecto a la etapa (c) del procedimiento, la preparación de células primarias hepáticas puede cultivarse directamente en un soporte completamente sintético (por ejemplo plástico o cualquier sustancia polimérica) o un soporte sintético revestido previamente con células alimentadoras, extractos de proteína o cualquier otro material de origen biológico que permita la adhesión y la proliferación de células primarias similares y la emergencia de una población de células progenitoras hepáticas adultas que tienen una morfología meso-epitelial cuboidal. Preferentemente, las células procedentes de la población de células primarias que se han adherido a dicho sustrato, se cultivan durante al menos 7 días, preferentemente al menos 10 o al menos 12 días. Más preferentemente, las células procedentes de la población de células primarias se cultivan en el intervalo de 7 y 12 días para obtener una población de células adherentes que esté suficientemente enriquecida para que pueda proporcionar de manera viable células H2Stem.

El término "cultivar" se refiere generalmente a condiciones para el mantenimiento y/o crecimiento de células y, en particular, de H2Stem y/o de progenie de H2Stem en cultivo celular. Los elementos tal como el soporte donde las células se cultivan y que permite la adhesión celular (o, cuando se necesite, que permite el crecimiento de agrupaciones celulares en suspensión), la composición del medio de cultivo celular, la densidad a la que las células se siembran y se mantienen, la concentración de  $O_2$  y  $CO_2$ , pueden adaptarse para el cultivo de células H2Stem y progenie de H2Stem, tal como se detalla a continuación en la descripción detallada y en los ejemplos.

El término "célula progenitora hepática" se refiere a una célula no especializada y competente para la proliferación que se produce usando células en cultivo que se aíslan del hígado y que o la progenie de las que pueden dar lugar a al menos un tipo de célula relativamente más especializados. Una célula progenitora hepática da lugar a descendientes que pueden diferenciarse a lo largo de uno o más linajes para producir células más especializadas de manera creciente (sin embargo preferentemente hepatocitos o células hepato-activas), pudiendo ser tales descendientes ellos mismos células progenitoras, o incluso para producir células hepáticas diferenciadas de manera terminal (por ejemplo células completamente especializadas, en particular células que presentan características morfológicas y funcionales de manera similar a aquellos hepatocitos humanos primarios).

Dado que los tejidos hepáticos que se usan en los procedimientos de la invención proceden de hígado adulto, las células H2Stem pueden definirse como células progenitoras hepáticas adultas que tienen una morfología meso-epitelial cuboidal con citoplasma grande y transparente, membrana irregular sin salientes, que desarrollan contactos y uniones intercelulares y que presentan inhibición del crecimiento por contacto. Después de la emergencia y proliferación como colonia o agrupaciones de células adherentes (véase la figura 3), las células H2Stem pueden caracterizarse además mediante tecnologías que permiten detectar marcadores relevantes ya en esta fase (es decir, tras el pase de células tal como se indica en la etapa (d)) y que se caracterizaron inicialmente en un fase más tardía, tal como se describe a continuación en la etapa (e) como que eran un marcador hepático y al menos un marcador mesenquimatoso y al menos una actividad específica del hígado.

Entre las tecnologías para identificar tales marcadores y medirlos como que son positivos o negativos, se prefieren inmunocitoquímica o análisis de medios de cultivo celular, puesto que permiten la detección de marcadores incluso con la baja cantidad de células H2Stem que están disponibles en esta etapa, sin destruirlas (como sería en el caso de la inmunotransferencia de tipo Western o la citometría de flujo). En particular, la detección de células positivas para citoqueratina-19 (tal como se muestra en la figura 2B), o de proteínas hepáticas secretadas, incluyendo albúmina o enzimas como alfa-1-antitripsina (véase la figura 8B), puede realizarse en esta fase, junto o no a la detección de otros marcadores relevantes tal como se describe a continuación, incluyendo proteína de superficie celular (tal como SUSD2, CD90, CD73, CD29, CD44 y/o transportadores específicos del hígado), proteínas intracelulares (tal como vimentina o ASMA) y enzimas hepáticas y actividades relacionadas (tal como carboxilasa hepática, tirosina transferasas, triptofano-2,3-dioxigenasa, secreción de urea, CYP3A4 o cualquier otra actividad de citocromo P450 fase I).

Las células H2Stem emergen a partir de una población primaria de células hepáticas que se colocan en placa en un sustrato que permite la adhesión de células en un entorno *in vitro* que puede fomentar la supervivencia y/o el crecimiento de tales células. Este entorno puede evitar un intercambio indeseado de materia entre dicho entorno (es decir el recipiente de cultivo celular) y los alrededores (por ejemplo evitando la contaminación del entorno del laboratorio), mientras que puede permitir un intercambio continuo o intermitente de otros componentes útiles entre recipientes de cultivo (por ejemplo mediante un intercambio ocasional de una parte o todo el medio de cultivo, el intercambio continuo de gases).

Los recipientes de cultivo pueden ser frascos de cultivo celular, botellas, placas con pocillos, biorreactores y placas de distintos formatos pero que muestran una o más superficies de sustrato compatibles con la adhesión celular, de manera que las células colocadas en placa puedan contactar con este sustrato para que se mantengan adheridos los cultivos celulares. En general, un sustrato que permite la adherencia de las células en el mismo puede ser cualquier sustrato sustancialmente hidrofílico, siendo vidrio o un material polimérico sintético (tal como policarbonatos, poliestirenos, poliortoésteres, polifosfatos, poliésteres, nailons o mezclas de los mismos) que generalmente se conforman y se tratan para proporcionar superficies de sustrato hidrofílicas y de ese modo potenciar la posibilidad de unión eficaz de células (tal como se muestra en los ejemplos usando materiales comerciales CellBind). El tratamiento de superficie puede tomar la forma de un revestimiento de superficie o puede implicar la generación de grupos químicos sobre la superficie de polímero que tienen una afinidad general para el agua o de otro modo muestran polaridad suficiente para permitir adsorción estable a otro grupo polar. Estos grupos funcionales conducen a la hidrofiliidad y/o un aumento del oxígeno de superficie y son propiedades reconocidas por fomentar el crecimiento celular en superficies de sustrato así modificadas. Tales grupos químicos pueden incluir grupos tal como aminas, amidas, carbonilos, carboxilatos, ésteres, hidroxilos o sulfhidrilos que pueden introducirse también tratándolos con tecnologías a base de frecuencia de onda específicas.

La adhesión celular puede facilitarse mediante revestimiento de las superficies de plástico tratadas con una capa de matriz. El revestimiento puede implicar policonaciones adecuados (por ejemplo, poliomitina o polilisina) o, preferentemente, uno o más componentes de matriz extracelular: fibrina, laminina, colágeno no fibroso/fibroso (preferentemente colágeno tipo 1), glicosaminoglicanos (por ejemplo, heparina o heparan sulfato) o proteínas tal como fibronectina, gelatina, vitronectina, elastina, tenascina, agregano, agrina, sialoproteína ósea, proteína de matriz de cartílago, fibrinógeno, fibulina, mucinas, entactina, osteopontina, plasminógeno, restrictina, serglicina, osteonectina, versicano, trombospondina 1 o moléculas de adhesión celular incluyendo cadherinas, conexinas, selectinas, por ellos mismos o en diversas combinaciones. Los ejemplos preferentes pueden incluir composiciones de colágeno, que comprenden o no otros componentes de matriz extracelular). Como alternativa, los péptidos sintéticos que son fragmentos o de otro modo se derivan de las proteínas enumeradas anteriormente, geles, estructuras moleculares y otras estructuras tri-dimensionales que se forman a partir de materiales sintéticos y/o materiales biológicos pueden usarse en este alcance.

La suspensión de células primarias puede ponerse en contacto con la superficie adherente durante un periodo de tiempo (por ejemplo al menos 2, 4, 6, 12, 24 horas o más) que es suficiente para permitir que las poblaciones de células hepáticas primarias se unan a sustratos adherentes, antes de retirar cualquier materia no adherente del sistema de cultivo (por ejemplo, células no viables o muestras y residuos celulares) descartando medio del sistema de cultivo y opcionalmente lavando, una vez o de manera repetida, las células adherentes. Entonces, el sistema de cultivo se dota de cualquier medio adecuado o tampón isotónico (por ejemplo, PBS). Mediante esto, las células de la población de células hepáticas primarias, que se han adherido a la superficie, se seleccionan para el cultivo posterior y pueden contarse con el fin de evaluar la densidad de colocación en placa que puede expresarse como número de células colocadas en placa por cm<sup>2</sup> de dicha superficie (por ejemplo entre 10 y 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>).

La preparación de células primarias, directamente en la colocación en placa o después del lavado de las células, se mantiene en un medio líquido, que fomenta su supervivencia y/o crecimiento de las células. El medio puede añadirse al sistema antes, junto con o después de la introducción de las células al mismo. El medio puede ser fresco (es decir no usado previamente para el cultivo de células) o puede comprender al menos una fracción que se ha acondicionado mediante el cultivo anterior de células de origen hepático (o de cualquier otro origen) en el mismo. En particular, el medio puede ser cualquier medio de cultivo adecuado para cultivar células progenitoras hepáticas tal como se ha descrito en la bibliografía y puede intercambiarse de manera regular (por ejemplo, cada hora, 3 horas, 12 horas, 24 horas o más) con un medio fresco que presenta las mismas características o una característica diferente (por ejemplo composición, pH). El volumen completo del medio puede cambiarse o, como alternativa, puede cambiarse sólo parte del medio, de manera que se conserva una fracción del medio acondicionado mediante el cultivo previo de las células. Como alternativa, el medio no se intercambia hasta que las células se transfieren a otro recipiente de cultivo, prolongando el cultivo de las células de modo que la mayor parte de las células que no interesan (por ejemplo hepatocitos y otras células completamente diferenciadas de origen hepático) se separan y mueren, y el medio fresco puede añadirse simplemente de manera regular.

Las células primarias, adherentes se cultivan en presencia de un medio de cultivo líquido para el crecimiento de células adherentes que se basan en medios químicos definidos con adición de suero bovino, humano u otro suero animal que, además de proporcionar nutrientes y/o promotores del crecimiento, pueden fomentar también el crecimiento/adherencia o la eliminación/separación de tipos celulares específicos.

Las formulaciones de medios basales (disponibles, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC; o de Invitrogen, Carlsbad, California) pueden usarse para cultivar las células primarias en los mismos, que incluyen pero no se limitan a medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo alfa modificado (alpha-MEM), medio esencial basal (BME), medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), medio BGJb, mezcla de nutrientes F-12 (Ham), Liebovitz L-15,

DMEM/F-12, medio Eagle modificado esencial (EMEM), RPMI-1640, medio 199, Waymouth's MB 752/1 o medio E de Williams, y modificaciones y/o combinaciones de los mismos. Las composiciones de estos medios basales y criterios para adaptar las concentraciones de medios y/o complementos de medios como sea necesario para las células cultivadas se conocen generalmente. Una formulación de medio basal preferente puede ser aquella  
5 comercialmente disponible tal como medio E de Williams, IMDM o DMEM, que se informa que sostienen el cultivo *in vitro* de células hepáticas adultas.

Tales formulaciones de medios basales contienen ingredientes necesarios para el desarrollo de células mamíferas, que se conocen de por sí tal como sales inorgánicas (en particular sales que contienen Na, K, Mg, Ca, Cl, P y posiblemente Cu, Fe, Se y Zn), tampones fisiológicos (por ejemplo, HEPES, bicarbonato), nucleótidos, nucleósidos y/o bases de ácido nucleico, ribosa, desoxirribosa, aminoácidos, vitaminas, antioxidantes (por ejemplo, glutatión) y fuentes de carbono (por ejemplo glucosa, piruvato). Pueden usarse complementos para suministrar a las células los oligoelementos necesarios y sustancias necesarias para el crecimiento y expansión óptimos. Tales complementos incluyen insulina, transferrina, sales de selenio y combinaciones de los mismos. Estos componentes pueden incluirse en una solución salina tal como solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), solución salina de Earle. Pueden añadirse complementos antioxidantes adicionales, por ejemplo  $\beta$ -mercaptoetanol. Mientras que muchos medios basales contienen ya aminoácidos, algunos aminoácidos pueden complementarse posteriormente, por ejemplo L-glutamina, que se conoce por ser menos estable que en solución. Un medio puede suministrarse además con compuestos antibióticos y/o antimicóticos, tal como, normalmente, mezclas de penicilina y estreptomina, y/u otros compuestos. De la manera más importante, los medios de cultivo celular pueden complementarse con plasma o suero de mamífero que contiene factores y componentes celulares que son necesarios para la viabilidad y expansión celular y que, en cierta condición, pueden sustituirse por componentes sintéticos.

El término "suero", tal como se define de manera convencional, se obtiene a partir de una muestra de sangre completa en primer lugar dejando que la coagulación tenga lugar en la muestra y posteriormente separando el coágulo así formado y los componentes celulares de la muestra de sangre del componente líquido (suero) mediante una técnica apropiada, normalmente mediante centrifugación. Un catalizador inerte, por ejemplo, perlas o polvo de vidrio, puede facilitar la coagulación. Ventajosamente, puede prepararse suero usando recipientes de separación de suero (SST), que contienen el catalizador inerte para mamíferos.

El suero o plasma puede obtenerse comercialmente y a partir de un organismo de la misma especie que es la especie de la cual se obtienen las células hepáticas primarias. Puede usarse suero o plasma humano para el cultivo de células hepáticas humanas primarias. Como alternativa, el medio comprende suero bovino o plasma, preferentemente suero o plasma (de ternera) bovino fetal, más preferentemente suero (de ternera) bovino fetal (FCS o FBS). El medio comprende entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 40 % (v/v) de suero o plasma o sustituto de suero, preferentemente entre aproximadamente el 5 % y el 20 % (v/v), por ejemplo, entre aproximadamente el 5 % y el 15 % (v/v), por ejemplo aproximadamente el 10 % (v/v). Un medio para el cultivo de células hepáticas humanas puede comprender una mezcla de plasma o suero humano, preferentemente suero humano, y plasma o suero bovino, preferentemente suero bovino.

Antes del almacenamiento o el uso, el plasma o suero puede irradiarse (por ejemplo irradiarse con rayos gamma) o inactivarse con calor. La inactivación con calor se usa en la técnica principalmente para eliminar el complemento. La inactivación con calor implica normalmente la incubación del plasma o suero a 56 °C durante de 30 a 60 minutos, por ejemplo, 30 minutos, con mezclado constante, después de lo cual se deja enfriar el plasma o suero gradualmente hasta temperatura ambiente. Opcionalmente, el plasma o suero puede esterilizarse también antes del almacenamiento o uso (por ejemplo mediante filtración a través de uno o más filtros con tamaño de poro inferior a 1  $\mu$ m).

Los componentes ordinarios de medios basales (antes de la adición de suero o plasma), por ejemplo, en particular, solución salina isotónica, tampones, sales inorgánicas, aminoácidos, fuentes de carbono, vitaminas, antioxidantes, indicadores de pH y antibióticos, no se consideran factores de crecimiento o factores de diferenciación en la técnica. Por otro lado, el suero o plasma es una composición compleja posiblemente que comprende uno o más de tales factores de crecimiento.

El término "factor de crecimiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia biológicamente activa que influye en la proliferación, crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración de diversos tipos de célula y puede efectuar cambios de desarrollo, morfológicos y funcionales en un organismo, o bien sólo o cuando se modula por otras sustancias. Un factor de crecimiento puede actuar normalmente mediante unión, como un ligando, a un receptor (por ejemplo, receptor de superficie o intracelular) presente en células. Un factor de crecimiento en el presente documento puede ser particularmente una entidad proteínica que comprende una o más cadenas de polipéptidos. El término "factor de crecimiento" engloba los miembros de la familia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), familia de proteínas morfogénicas óseas (BMP), familia de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), familia de factor de crecimiento beta transformante (TGF-beta), familia de factor de crecimiento nervioso (NGF), la familia de factor de crecimiento epidérmico (EGF), la familia de factor de crecimiento relacionado con insulina (IGF), la familia de factor de crecimiento de

hepatocitos (HGF), la familiar a interleucina-6 (IL-6) (por ejemplo oncostatina M), factores de crecimiento hematopoyéticos (HeGF), el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), angiopoyetina, familia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o glucocorticoides. Si el procedimiento se usa para células hepáticas humanas, el factor de crecimiento usado en el presente procedimiento puede ser un factor de crecimiento humano o recombinante. El uso de factores de crecimiento humanos y recombinantes en el presente procedimiento se prefiere puesto que se espera que tales factores de crecimiento provoquen un efecto deseable sobre la función celular.

El medio puede comprender una combinación de suero o plasma con uno o más factores de crecimiento añadidos de manera exógena, tal como se ha definido anteriormente, preferentemente en concentraciones en las que los factores de crecimiento particulares pueden inducir un efecto sobre células cultivadas *in vitro*. Por ejemplo, el medio puede comprender EGF e insulina, o EGF y dexametasona, o insulina y dexametasona o cualquiera de EGF, insulina y dexametasona. EGF puede usarse normalmente en concentraciones entre aproximadamente 0,1 ng/ml y 1 µg/ml y preferentemente entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, por ejemplo, en aproximadamente 25 ng/ml; insulina puede usarse normalmente en concentraciones entre aproximadamente 0,1 µg/ml y 1 mg/ml y preferentemente entre aproximadamente 1 µg/ml y 100 µg/ml, por ejemplo, en aproximadamente 10 µg/ml; dexametasona puede usarse normalmente en concentraciones entre aproximadamente 0,1 nM y 1 µM, preferentemente entre aproximadamente 1 nM y 100 nM, por ejemplo, en aproximadamente 10 nM.

Pueden usarse también hormonas en el cultivo celular, por ejemplo D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, insulina, estradiol, hidrocortisona, prolactina, progesterona, hirotropina, tiroxina, L-tironina. Las células hepáticas pueden beneficiarse también del cultivo con triyodotironina, acetato de α-tocoferol y glucagón. También pueden usarse lípidos y vehículos lipídicos para complementar los medios de cultivo celular. Tales lípidos y vehículos pueden incluir, pero no se limitan a ciclodextrina, colesterol, ácido linoleico conjugado con albúmina, ácido linoleico y ácido oleico conjugado con albúmina, ácido linoleico no conjugado, ácido linoleico-oleico-araquidónico conjugado con albúmina, ácido oleico no conjugado y conjugado con albúmina, entre otros. De manera similar puede usarse albúmina en formulaciones libres de ácidos grasos.

Las características morfológicas y fenotípicas de células H2Stem descritas en los ejemplos pueden permitir la obtención de tales células no sólo cuando las preparaciones crioconservadas de células hepáticas primarias tienen baja eficacia de colocación en placa, sino también sometiendo a ensayo y/o adaptando tecnologías conocidas para la preparación de células adherentes a partir de preparaciones heterogéneas de células primarias mediante selección y combinación de diferentes tecnologías, condiciones y/o materiales (por ejemplo el material polimérico sintético, el (los) componente(s) de la matriz extracelular, el medio de cultivo celular, la cantidad de oxígeno y/o CO<sub>2</sub> en el incubador, el tampón de lavado, etc.). En particular, el cultivo en condiciones hipóxicas (tal como se obtienen añadiendo un compuesto anti-oxidante en concentraciones de milimolar o inferiores), junto con una o más combinaciones de estos otros elementos puede aplicarse con el fin de obtener células H2Stem en mayor cantidad y/o de manera más rápida a partir del cultivo celular.

Esta etapa de cultivo de células hepáticas primarias tal como se ha definido anteriormente conduce a la emergencia y proliferación de células H2Stem en el cultivo y puede continuarse hasta que las células H2Stem hayan proliferado de manera suficiente. Por ejemplo, dicho cultivo puede continuarse hasta que la población de células haya logrado un cierto grado de confluencia (por ejemplo, al menos el 50 %, el 70 %, o al menos el 90 % o más confluyente). El término "confluencia" tal como se usa en el presente documento se refiere a una densidad de células cultivadas en la que las células entran en contacto entre sí, cubriendo sustancialmente todas las superficies disponibles para el crecimiento (es decir, completamente confluyente).

Con respecto a la etapa (d) del procedimiento, se cultivan células primarias en un medio de cultivo celular que sostiene su adherencia y la proliferación de y la emergencia de una población de células homogénea que, después de al menos un pase, se enriquece progresivamente de células H2Stem. Las células H2Stem pueden expandirse rápidamente para generar suficientes células para la obtención de progenie de H2Stem que tiene las propiedades deseadas (por ejemplo como células adherentes bi-dimensionales o agrupaciones de células tri-dimensionales, en un estado de densidad y/o diferenciación dado), con duplicación celular que puede obtenerse en el intervalo de 48-72 horas y mantenimiento de progenie de H2Stem con las propiedades deseadas para al menos 2, 3, 4, 5 o más pases.

Cuando se ha realizado el pase, las células cultivadas se separan y se disocian del sustrato de cultivo y entre sí. La separación y disociación de las células pueden llevarse a cabo tal como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo, mediante tratamiento enzimático con enzimas proteolíticas (por ejemplo, seleccionadas de tripsina, colagenasa, por ejemplo, tipo I, II, III o IV, dispasa, pronasa, papaína, etc.), tratamiento con queladores de iones bivalentes (por ejemplo, EDTA o EGTA) o tratamiento mecánico (por ejemplo, pipeteado repetido a través de una pipeta o punta de pipeta de orificio pequeño), o cualquier combinación de estos tratamientos.

Un procedimiento adecuado de separación y dispersión de células debería garantizar un grado deseado de separación y dispersión de células, mientras que se conserva una mayoría de células en el cultivo.

Preferentemente, La separación y disociación de las células cultivadas proporcionaría una proporción sustancial de células como células individuales, viables (por ejemplo, al menos el 50 %, el 70 %, el 90 % de las células o más). Las células restantes pueden presentarse en agrupaciones de células, cada una conteniendo un número relativamente pequeño de células (por ejemplo, en promedio, entre 1 y 100 células).

5 A continuación, las células así separadas y disociadas (normalmente como una suspensión celular en un tampón isotónico o un medio) pueden colocarse en placa de nuevo en un sustrato que permite la adherencia de las células en el mismo, y se cultivan posteriormente en un medio tal como se ha descrito anteriormente que sostiene la proliferación adicional de células H2Stem y de progenie de H2Stem. Estas células pueden cultivarse  
10 entonces mediante la nueva colocación en placa de las mismas en una densidad de entre 10 y 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>, y con una relación de división entre aproximadamente 1/16 y 1/2, preferentemente entre aproximadamente 1/8 y 1/2, más preferentemente entre aproximadamente 1/4 y 1/2. La relación de división indica la fracción de las células pasadas que se siembra en un recipiente de cultivo vacío (normalmente un recipiente de cultivo nuevo) de la misma área de superficie que el recipiente del que se obtuvieron las células. El tipo del recipiente de cultivo,  
15 como también de superficie que permite la adherencia celular en el recipiente de cultivo y los medios de cultivo celular, puede ser el mismo que el uso inicialmente y tal como se ha descrito anteriormente, o puede ser diferente. Preferentemente, se mantienen las células en CellBind o cualquier otro soporte apropiado que esté revestido con proteínas de matriz extracelular (tal como colágeno, y preferentemente colágeno tipo I) o péptidos sintéticos.

20 Con respecto a la etapa (e) anteriormente, el aislamiento de la población de células H2Stem se aplica a células que han mantenido una morfología meso-epitelial cuboidal, que son positivas para al menos un marcador hepático y al menos un marcador mesenquimatoso, y que tienen al menos una actividad específica del hígado, validando además los criterios para identificar inicialmente células H2Stem en la etapa (c) anteriormente, sin embargo que pueden establecerse más fácilmente teniendo en cuenta la cantidad más alta de células que están disponibles después del pase.

30 Los términos “aislar” o “aislamiento” se refieren tanto a la identificación física como al aislamiento de una población celular a partir de un cultivo celular o una muestra biológica que puede realizarse mediante aplicación de tecnologías de biología celular apropiadas que se basan o bien en la inspección de cultivos celulares y en la caracterización (y separación física cuando sea posible y se desee) de células que corresponden a los criterios, o en la clasificación automática de células de acuerdo con la presencia/ausencia de antígenos y/o tamaño celular (tal como mediante FACS). En algunas realizaciones, los términos “aislar” o “aislamiento” pueden comprender una etapa adicional de separación física y/o cuantificación de las células, especialmente llevando a cabo la  
35 citometría de flujo.

40 Los términos “población celular” y “población de células” se refieren generalmente a un grupo de células. A menos que se indique lo contrario, el término se refiere a un grupo de células que consiste esencialmente en o que comprende células tal como se define en el presente documento. Una población de células puede consistir esencialmente en células que tienen un fenotipo común o puede comprender al menos una fracción de células que tienen un fenotipo común. Se dice que las células tienen un fenotipo común cuando son sustancialmente similares o idénticas en una o más características demostrables, incluyendo pero sin limitarse a aspecto morfológico, el nivel de expresión de componentes o productos celulares particulares (por ejemplo, ARN o proteínas), actividad de ciertas rutas bioquímicas, capacidad de proliferación y/o cinéticas, potencial de  
45 diferenciación y/o respuesta a señales de diferenciación o comportamiento durante el cultivo *in vitro* (por ejemplo, adherencia o crecimiento de monocapa). Tales características demostrables pueden definir por tanto una población celular o una fracción de la misma. Una población de células puede ser “sustancialmente homogénea” si una mayoría sustancial de células tienen un fenotipo común. Una población de células “sustancialmente homogénea” puede comprender al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el  
50 90 %, al menos el 95 %, o incluso al menos el 99 % de células que tienen un fenotipo común, tal como el fenotipo que se refiere específicamente a células H2Stem (o a progenie de H2Stem). Además, una población celular puede consistir esencialmente en células que tienen un fenotipo común tal como el fenotipo de células H2Stem (es decir una progenie de H2Stem) si cualquier otra célula presente en la población no altera o no tiene un efecto material sobre las propiedades globales de la población de células y por tanto puede definirse como  
55 una línea celular.

60 En general, cualquier tecnología para identificar y caracterizar los marcadores celulares para un tipo de célula específico (por ejemplo marcadores mesenquimatosos, hepáticos, hematopoyéticos, epiteliales, endoteliales) o que tienen una localización específica (por ejemplo intracelular, en la superficie celular o secretado) que se han publicado en la bibliografía puede considerarse apropiada para caracterizar células H2Stem y progenie de H2Stem. Tales tecnologías pueden agruparse en dos categorías: aquéllas que permiten mantener la integridad celular durante el análisis y aquéllas a base de extractos (que comprenden proteínas, ácidos nucleicos, membranas, etc.) que se generan usando tales células. Los ejemplos contienen datos de cómo se han usado tales tecnologías para caracterizar células H2Stem y progenie de H2Stem, por ejemplo realizando un análisis de la presencia de antígenos de superficie celular antes de realizar un análisis más detallado y comparativo con  
65 otras células progenitoras hepáticas o células primarias hepáticas adultas con el fin de evaluar sus

características distintivas y actividades biológicas.

En el nivel de proteína, las tecnologías tal como citometría de flujo, FACS o inmunocitoquímica, permiten determinar la presencia/ausencia de proteínas de superficie o intracelulares en células H2Stem mediante el uso de anticuerpos u otros reactivos específicos de proteínas. La citometría de flujo es una tecnología preferente para caracterizar poblaciones de células de acuerdo con la presencia/ausencia combinada de marcadores de superficie o intracelulares, tal como se determina mediante técnicas de tinción individuales o múltiples, y/o evaluación del tamaño y la granularidad. La inmunocitoquímica también proporciona información relevante con respecto a las características morfológicas que se asocian a la presencia/ausencia combinada de marcadores de superficie, citoesqueléticos y/u otros marcadores intracelulares. De hecho, los ejemplos muestran que, en algunas realizaciones, un porcentaje significativo de células en una preparación de células H2Stem es positivo para citoqueratina-19, (CK-19) un marcador citoesquelético e intracelular. Este porcentaje puede estimarse que es al menos el 20 % o entre el 20 y el 40 % cuando se detecta mediante citometría de flujo pero puede ser más alta (es decir hasta el 90 % o más) cuando CK-19 se detecta mediante inmunocitoquímica (véase la figura 2B). Esta característica adicional (es decir positividad para CK-19) permite establecer e identificar una población celular que se produce mediante cultivo de células hepáticas primarias como células H2Stem.

En particular, la presencia de al menos un marcador mesenquimatoso (en particular seleccionado de ASMA vimentina, CD90, CD 73) y de al menos un marcador hepático debería medirse mediante citometría de flujo, inmunocitoquímica o cualquier otra técnica (generalmente haciendo uso de anticuerpos, lectinas u otras proteínas y no requiriendo la extracción de proteínas o ácido nucleico) que permite evaluar el porcentaje de células que presentan el receptor. La positividad mediante citometría de flujo e inmunocitoquímica se define en el presente documento cuando al menos el 60 % de células presenta el marcador o receptor deseado (tal como se muestra en los ejemplos). De manera similar, la negatividad mediante citometría de flujo e inmunocitoquímica se define en el presente documento cuando al menos el 20 % de células presenta el marcador o receptor dado (tal como se muestra en los ejemplos). En algunas realizaciones, menos del 10 % de células presentan un marcador negativo dado, tal como en el caso de CD140b (véase la figura 10B).

En algunas realizaciones, cuando se mide un marcador dado, el agente que se usa para la detección de un marcador tal como se ha definido anteriormente o una proteína de superficie celular se inmoviliza en una fase sólida (por ejemplo una perla, una placa o un biomaterial), se etiqueta (por ejemplo se etiqueta de manera fluorescente) y/o reconoce mediante otro compuesto que está etiquetado (por ejemplo un anticuerpo secundario). Existen numerosos procedimientos mediante los cuales la etiqueta puede producir una señal detectable mediante medios externos, por ejemplo, de manera deseable mediante examinación visual o mediante radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. La etiqueta u otro componente del sistema que produce señales puede unirse también a un asociado de unión específico, otra molécula o a un soporte tal como perlas, usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como reticulación química o usando el sistema de biotina-estreptavidina. La etiqueta puede producir directamente una señal, y por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo fluorocromos (tal como FITC, PE, PC5, PC7, APC, o cualquier otro conocido por ser compatible con la citometría de flujo), absorben luz ultravioleta y luz visible. Otros tipos de etiqueta producen directamente una señal, tal como isotopos radiactivos y colorantes. Como alternativa, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal y el sistema de producción de señales incluiría entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible, que puede incluir sustratos, coenzimas, iones metálicos o sustancias que reaccionan con productos enzimáticos (por ejemplo detección quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano).

Las actividades metabólicas específicas del hígado de células H2Stem comprenden actividades biológicas generalmente asociadas con células hepáticas (y con hepatocitos en particular) y que distinguen células hepáticas de células presentes en otros tejidos y en particular comprenden actividades que implican unión, activación y/o degradación de proteínas u otros sustratos tal como se describe en la bibliografía y en los ejemplos. Estas actividades biológicas se establecen basándose en la detección de actividades metabólicas específicas del hígado que pueden ser actividades de unión a proteína/fármaco y, más preferentemente, actividades enzimáticas en sustratos dados, o en asociación a molécula específicas del hígado que se detectan mediante tecnologías de inmunotransferencia (inmunotransferencia de tipo Western o de tipo Northern), secuenciación, isoelectroenfoque, ELISA, o basándose en la internalización de compuestos sintéticos o naturales que se sabe que se transportan específicamente y se metabolizan dentro de las células hepáticas.

En el nivel de ácido nucleico, la secuenciación del genoma completo, PCR, o RT-qPCR puede usarse para caracterizar células H2Stem o progenie de H2Stem. Mediante esto, la PCR en tiempo real puede usarse para cuantificar la expresión del gen bajo investigación, basándose en el número de ciclos y habiéndolo normalizado frente a los ciclos obtenidos para 1 o más controles endógenos. En particular, la reacción de RT-PCR puede realizarse usando células H2Stem y cebadores y tampones apropiados, sin embargo el número de ciclos para obtener una señal no debería ser superior a 25, 30 o 35 ciclos.

En el nivel de actividad, la presencia de una actividad metabólica específica del hígado puede medirse mediante cualquier técnica apropiada que permita evaluar la presencia y/o el nivel de actividad de enzimas específicas del

hígado, sin embargo preferentemente debía permitir la cuantificación *in vitro* de la actividad enzimática real, con un límite de detección dado del producto final específico (como puede establecerse fácilmente con el soporte de la bibliografía y productos disponibles comercialmente) para la medición de actividades CYP450, detoxificación, almacenamiento de glucógeno, secreción de alfa1-antitripsina o albúmina, producción de bilis, producción de trombopoyetina, producción de angiotensinógeno, conversión de amoníaco en urea, síntesis de colesterol, glicogenólisis, glicogénesis y lipogénesis. En particular, la positividad para al menos una actividad metabólica específica del hígado se define en el presente documento cuando se mide la actividad que es superior estadísticamente al límite de detección del producto final (siendo al menos dos veces, cinco veces o diez veces más que el límite de detección) o que se aproxima al nivel de actividad de hepatocitos primarios (superior, idéntico o el 10 %, el 25 %, el 50 %, el 75 % o el 90 % inferior).

La bibliografía proporciona una extensa descripción de las tecnologías para la evaluación de actividades de citocromo P450 en hepatocitos humanos *in vitro*, en particular con respecto a los compuestos que inducen específicamente una actividad enzimática y los formatos que pueden usarse para la realización de estos experimentos (Baudoin R *et al.*, 2012; Gerets HH *et al.*, 2012; Gomez-Lechon MJ *et al.*, 2012; Halladay JS *et al.*, 2012; Hoffmann SA *et al.*, 2012; Lubberstedt M *et al.*, 2011; Smith CM *et al.*, 2012). Entre los diferentes inductores, puede evaluarse el metabolismo de fármacos en estas células usando midazolam, etoxiresorufina, benzoxiresorufina, bupropion, fenacetina, diclofenaco, tolbutamida, fenobarbital, rifampicina, cafeína, beta-naftoflavona, omeprazol, dextrometorfano, 3-metilcolantreno, repaglinida, u otros compuestos cito/hepatotóxicos conocidos como sondas. La detección y cuantificación de metabolitos puede asociarse con la actividad de enzimas hepáticas en compuestos específicos tal como CYP1A2 (mediante detección de paraxantina o acetaminofeno), CYP3A4 (mediante detección de 1-OH-midazolam u omeprazol sulfona), CYP2C6 (mediante detección de HO-bupropiona), CYP2C8 (mediante detección de hidroxil-repaglinida), CYP2C9 (mediante detección de 4'HO-diclofenaco), CYP2C19 (mediante detección de hidroxil-omeprazol o HO-mefenitoína), CYP2D6 (mediante detección de dextrorfano), CYP2E1 (mediante detección de 6-OH-cloroxazona), como también para otras actividades de citocromo P450 principal tal como CYP1A2, CYP2A6, CYP1B1, CYP2B6, CYP3A5, CYP3A7 o CYP7A1 (de manera singular o en combinaciones apropiadas).

Otras enzimas cuya expresión o (preferentemente) actividad puede establecerse en células H2Stem y progenie de H2Stem son las UDP-glucuronosiltransferasas (tal como UGT1A1, UGT2B4, UGT2B7), sulfotransferasas (que catalizan la conjugación con sulfato de varias moléculas endógenas farmacológicamente importantes y xenobióticos), tirosina transferasas, triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO2 o TDO), indolamina-2,3-dioxigenasas (IDO1 o IDO2), lisil oxidasa (LOX), glutatión S-transferasas (por ejemplo GSTalfa), proteínas resistentes a multifármacos (MDR o MRP-1/-2/-3), transportadores específicos del hígado (tal como OATP1B1), y otras enzimas de biotransformación de fase I/II/III. Además la producción y secreción de albúmina/urea, el metabolismo de amoníaco, el almacenamiento de glucógeno, la producción de bilis, la producción de trombopoyetina / angiotensinógeno y las tasas de eliminación de galactosa/sorbitol puede observarse también y compararse mediante aplicación de protocolos bien establecidos.

Cuando se obtiene una preparación de células H2Stem mediante los procedimientos de la invención, esta población de células o bien puede mantenerse y/o propagarse en condiciones que permitan un crecimiento y duplicación sin diferenciación o, después de uno o más pases en este estado, puede inducirse para diferenciarse en células similares a hepatocitos o células hepato-activas (véase la figura 1, figura 4A y figura 5B-E). En ambos casos, las células resultantes representan progenie de H2Stem. En el primer caso, las condiciones para mantener las células H2Stem como progenie de H2Stem no diferenciada pueden ser las mismas condiciones usadas para la obtención de la población original de células H2Stem con el fin de aumentar el número de células disponibles o, tal como se muestra en los ejemplos, generando agrupaciones de células tri-dimensionales (células H3Stem). En el segundo caso, pueden aplicarse las condiciones de cultivo celular bien establecidas para diferenciar células progenitoras hepáticas adultas en células que tienen características morfológicas, biológicas, funcionales típicas de células que se diferencian en hepatocitos.

Después de la etapa (e) de los procedimientos de la invención, una etapa (f) adicional opcional puede comprender mantener células H2Stem en condiciones de cultivo celular que permitan la diferenciación en células que presentan actividades específicas del hígado, que son por ejemplo células similares a hepatocitos o células hepato-activas (es decir, células progenitoras hepáticas adultas que han perdido su positividad para la mayor parte de, si no todos, los marcadores mesenquimatosos y son positivas para la mayor parte de, si no todas, las características morfológicas y funcionales de hepatocitos). Los ejemplos proporcionan detalles de cómo generar tales células similares a hepatocitos o células hepato-activas como progenie de H2Stem en la forma de células adherentes (como células H3Screen-2b, H3Screen-2c o H2Screen) o agrupaciones de células tri-dimensionales que pueden mantenerse fácilmente en suspensión (como células H3Screen-1 o como células H3Screen-2a).

En este último aspecto, los ejemplos muestran que las placas o frascos de cultivo celular de unión ultra-baja, e incluso de manera más apropiada placas de microtitulación de cultivo en forma de U/redondas de unión ultra-baja, proporcionan progenie de H2Stem tri-dimensional como agrupaciones de células en suspensión que muestran características funcionales y estructurales mejoradas que caracterizan a los hepatocitos, y en general

células hepato-activas. Las placas de microtitulación de cultivo en forma de U/redondas que comprenden 96 o 384 pocillos (o en cualquier otro formato disponible que contienen un número diferente de pocillos con base en forma de U y que permiten mantener los cultivos celulares en un volumen de medio de cultivo celular por debajo de 0,5 ml o, incluso mejor, por debajo de 0,25 ml) proporcionan progenie de H2Stem tri-dimensional como agrupaciones de células en suspensión con un tamaño y forma más regular que las hacen más apropiadas para usos *in vitro* e *in vivo*.

Por tanto, la población de células que se produce y se aísla en la etapa (e) anteriormente puede, en algunas realizaciones, mantenerse en condiciones de cultivo celular que permiten la formación de agrupaciones de células que representan progenie de H2Stem tri-dimensional específica. Esta etapa del procedimiento puede ser como una etapa (g) adicional (por ejemplo para la obtención de células H3Screen-1 a partir de células H2Screen), como una etapa (f1) alternativa (por ejemplo para la obtención de células H3Stem a partir de células H2Stem), o como etapa (f2) alternativa adicional que combina diferenciación *in vitro* y formación de progenie de H2Stem tri-dimensional (por ejemplo para la obtención de células H2Screen-2a directamente a partir de células H2Stem).

Los pases adicionales (por ejemplo, separación y dispersión de células, nueva colocación en placa, etc.) y el cultivo (por ejemplo, adición de medio o cambios tras la confluencia, etc.) pueden realizarse en condiciones sustancialmente idénticas o análogas a aquéllas del primer pase, tal como se ha descrito anteriormente o incluyendo modificaciones que se sugerirían en la bibliografía y/o para el uso específico de células H2Stem o progenie de H2Stem, en particular en forma de agrupaciones de células tri-dimensionales (progenie de H2Stem tri-dimensional). Por tanto, las condiciones para mantener y/o diferenciar células H2Stem o progenie de H2Stem en cultivo celular pueden optimizarse adicionalmente de acuerdo con los diferentes criterios tal como momento/medio para la diferenciación en células similares a hepatocitos o células hepato-activas, sistemas para mantener cultivos celulares tri-dimensionales como suspensiones celulares, uso de sustratos o estructuras específicos, hipoxia, adición combinada o secuencial de factores de crecimiento y compuestos químicos dentro del medio de cultivo celular, o densidad celular.

Los procedimientos de la invención proporcionan células H2Stem, que presentan características morfológicas, de expresión de proteínas y funcionales que son distintas de aquéllas identificadas en células hepáticas progenitoras adultas descritas previamente. Por consiguiente, células H2Stem que se obtienen o que pueden obtenerse mediante los procedimientos definidos anteriormente representan una realización adicional de la invención. Estos procedimientos permiten proporcionar poblaciones de células que comprenden una alta proporción de las células específicas (al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más), incluso que proporcionar una población de células sustancialmente homogénea como puede evaluarse mediante cualquier procedimiento estándar apropiado, por ejemplo, mediante citometría de flujo o cualquier otro enfoque de inmunotinción. Los elementos estromales en una progenie de H2Stem dada, en particular dentro de las células hepato-activas y agrupaciones de células tri-dimensionales (véase la figura 4A y Fig. 5), se consideran como parte de tal progenie y no han de considerarse como elementos que contaminan tales agrupaciones de células sino que más bien han de considerarse como elementos constitutivos.

Las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden usarse para establecer cultivos celulares para cualquier uso inmediato o pueden almacenarse como preparaciones crioconservadas que contienen cada una al menos  $10^3$ ,  $10^6$ ,  $10^9$  células o más, pueden estar dirigidas para producir o usar cantidad más alta de células H2Stem o progenie de H2Stem después de descongelar de manera apropiada las preparaciones y, si se necesita, para producir células H2Stem y progenie de H2Stem a escala industrial (por ejemplo usando biorreactores, membranas, microesferas, microfluidos, o cualquier otra solución técnica para mejorar el procesamiento biológico y la expansión celular mientras se mantienen las propiedades de células deseadas). Las muestras de poblaciones de células que corresponden a cualquiera de las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden crioalmacenarse en un medio de conservación que contiene suero o libre de suero (por ejemplo formulaciones de crioconservación disponibles comercialmente) y/o en presencia de un agente de crioprotección (por ejemplo dimetil sulfoxido en una concentración apropiada).

En particular, las preparaciones de células H2Stem y progenie de H2Stem que comprenden un número predeterminado de células (por ejemplo 50000, 100000, 500000, 1 millón, 10 millones, 100 millones, 1 billón o más células) o de agrupaciones de células tri-dimensionales que tienen cada una un número aproximadamente similar de células (por ejemplo 1, 10, 100, 1000 o más esferoides que las mostradas en la figura 6) pueden proporcionarse en uno o más viales que pueden incluirse entonces en un kit que comprende tales viales y cualquier otro dispositivo apropiado, materiales desechables (por ejemplo filtros, jeringuillas), soluciones (por ejemplo PBS, medio de cultivo celular, diluyente), productos químicos (por ejemplo sustratos enzimáticos, fluorocromos, fármacos), productos biológicos (por ejemplo factores de crecimiento, anticuerpos, cebadores) y/o instrucciones para el uso de los componentes de tal kit que puede envasarse de manera apropiada y enviarse a clientes para el uso de células H2Stem y progenie de H2Stem *in vivo* (por ejemplo para la administración a un paciente o a un animal) o *in vitro* (por ejemplo para someter a ensayo la toxicidad o eficacia de compuestos como fármacos candidatos) en consecuencia.

El mantenimiento, la proliferación y/o diferenciación de células H2Stem y progenie de H2Stem en condiciones de cultivo celular (o tras el implante en un modelo animal o en un paciente) puede realizarse tal como se requiere para el uso deseado. La bibliografía proporciona varios protocolos para mantener células progenitoras hepáticas y/o generarlas a partir de células similares a hepatocitos o células hepato-activas. Los ejemplos proporcionan medios para la obtención de células H2Stem y progenie de H2Stem en condiciones de cultivo celular, y para la diferenciación de las mismas en células que presentan actividades específicas del hígado en forma de células adherentes o como agrupaciones de células tri-dimensionales. En este último caso, pueden proporcionarse células H2Stem y progenie de H2Stem para el uso deseado como agrupaciones de células tri-dimensionales similares a los esferoides u organoides hepáticos que, de acuerdo con la bibliografía, pueden proporcionar células con mejoras significativas en la viabilidad y funcionalidad cuando se administran de manera intra- o extrahepática, pueden usarse para someter a prueba la hepatotoxicidad de compuestos, pueden mantenerse como preparaciones crioconservadas, pueden expandirse en biorreactores para la ampliación de escala del proceso de fabricación, o pueden usarse en dispositivos de asistencia hepática (Lu Y *et al.*, 2012; Saito R *et al.*, 2011; Massie I *et al.*, 2011; Soto-Gutierrez A *et al.*, 2010; Mitaka T y Ooe H, 2010; Meng Q, 2010; Tostoes RM *et al.*, 2012). Además de los procedimientos descritos en los ejemplos, el crecimiento tri-dimensional de células H2Stem y progenie de H2Stem puede obtenerse por tanto mediante encapsulación de las células en matrices sintéticas o biológicas.

El mantenimiento, la proliferación y/o la diferenciación de células H2Stem y progenie de H2Stem pueden mejorarse mediante adaptación de las condiciones de cultivo celular usando soluciones técnicas bien conocidas en la técnica para células madre, progenitoras o mesenquimatosas de diferente origen. Por ejemplo, los protocolos *ex-vivo* de atmósfera de bajo contenido en oxígeno que no daña a las células y otros enfoques para la adaptación de microentornos *in vitro* pueden facilitar supervivencia, estabilidad genética, proliferación, diferenciación post-injerto, secreción de factores paracrinos y potencial terapéutico general de tales células (Muscari C *et al.*, 2013; Cigognini D *et al.*, 2013). Por el contrario, los componentes derivados de sangre humana tal como suero sanguíneo de cordón umbilical y lisado de plaquetas se someten a prueba y se desarrollan como componentes de cultivo celular que son una alternativa no-xenogénica al suero bovino fetal y todavía cumplen con las directrices de las buenas prácticas de fabricación (GMP) para proporcionar dosis de células clínicamente relevantes sin los problemas bien conocidos asociados a suero tal como la variabilidad de la calidad, el riesgo de contaminación y los efectos de inmunización indeseados (Bieback K, 2013; Griffiths S *et al.*, 2013).

Antes de que se administren o se usen de otra manera, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden modificarse de manera transitoria o estale mediante la exposición de dichas células a agentes biológicos o químicos heterólogos o mediante introducción de dichos agentes en las células. En particular, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden modificarse (o modificarse mediante ingeniería genética, después de su transformación con vectores apropiados) en cultivo celular (por ejemplo después y/o antes de su diferenciación) mediante tratamiento de las células con factores de crecimiento y/o introduciendo ácidos nucleicos que afectan el perfil de expresión general de las células, preferentemente hacia características hepáticas específicas o características que ayudan al cultivo celular (por ejemplo mediante transducción de células con microARN o con vectores lentivirales que expresan proteínas recombinantes, tal como factores de crecimiento o factores de transcripción que se sabe que afectan a la diferenciación hepática o la diferenciación hacia cualquier otro tipo celular, o proteínas fluorescentes).

En particular, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden presentar en consecuencia actividades biológicas mejoradas y/o adicionales *in vivo* y/o *in vitro*, después y/o antes de su diferenciación en células que presentan una gama completa de actividades específicas del hígado. Preferentemente, las células H2Stem y progenie de H2Stem se modifican mediante ingeniería genética antes de que se diferencien de modo que cualquiera de la progenie de tales células se modifica de manera sistemática para tener actividades biológicas mejoradas, independientemente de la diferenciación.

El tratamiento de progenie de H2Stem con agentes químicos, medio de cultivo celular y/o vectores de ácido nucleico que se conoce que inducen la diferenciación de otras células progenitoras/madre hepáticas conocidas en otros tipos de células no hepáticas (por ejemplo osteocitos, células beta que producen insulina o células de médula ósea) puede proporcionar igualmente tales tipos de células no hepáticas. Las poblaciones de células no hepáticas que se obtienen mediante aplicación de estas tecnologías conocidas en la bibliografía a células H2Stem (o cualquier tipo específico de progenie de H2Stem) son tipos adicionales de progenie de H2Stem diferenciada que el descrito en los ejemplos (obtenido mediante el uso de un medio de cultivo celular para la inducción de diferenciación hepática) que puede usarse *in vitro* y/o *in vivo* (en particular para usos terapéuticos) de acuerdo con las actividades biológicas que la progenie de H2Stem ha perdido y/o ha adquirido como consecuencia de tal tratamiento (por ejemplo una progenie de H2Stem diferenciada que produce y secreta insulina puede usarse para el tratamiento de la diabetes).

Los procedimientos de transferencia génica convencionales que pueden aplicarse a células progenitoras hepáticas pueden usarse para introducir ácidos nucleicos en células H2Stem y progenie de H2Stem, incluyendo microinyección, electroporación, co-precipitación con fosfato de calcio, liposomas o transfección viral. Después de su transformación con vectores apropiados, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden expresar

5 proteínas recombinantes o pueden contener ácidos nucleicos que permiten que dichas células realicen actividades biológicas mejoradas y/o adicionales *in vivo* y/o *in vitro*, después y/o antes de su diferenciación en células similares a hepatocitos o células hepato-activas (por ejemplo, en el alcance de establecer modelos a base de células progenitoras hepáticas para terapia génica). Cuando los vectores son vectores virales (por ejemplo, un vector de lentivirus), se caracterizarán mediante determinación de su título con el fin de seleccionar las condiciones de eficacia de transducción óptimas y tasa de proliferación y con el fin de analizar su perfil de expresión como también su seguridad.

10 El hígado está conectado anatómicamente con el sistema circulatorio de modo que permite una liberación eficaz de diversas proteínas en el flujo sanguíneo. Por tanto, genes que codifican proteínas que tienen efectos sistémicos pueden insertarse en células H2Stem y progenie de H2Stem (en particular antes de que se cultiven para la obtención de agrupaciones de células tri-dimensionales) para mejorar adicionalmente su eficacia, como también para su injerto y mantenimiento cuando se administran *in vivo*.

15 Por ejemplo, una variedad de genes que codifican hormonas o anticuerpos pueden insertarse en células hepáticas de la presente invención para la secreción de sus productos génicos en la circulación. En particular, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden modificarse para sobre-expresar de manera constitutiva o transitoria una proteína normalmente expresada por hepatocitos (y posiblemente ya expresada por tales células), pero que es defectuosa o está ausente en un paciente (este defecto que subyace a un estado patológico del paciente, como en errores congénitos del metabolismo hepático) y que ayudan entonces a restaurar la producción de la proteína y que de ese modo ayudan en el tratamiento del paciente. Ejemplos de tales proteínas son proteínas metabólicas tal como ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa, arginasa, carbamil fosfato sintasa, N-acetil glutamato sintasa, glutamina sintetasa, glicogen sintetasa, glucosa-6-fosfatasa, fosfatasa alcalina, succinato deshidrogenasa, glucocinasa, piruvato cinasa, acetil CoA carboxilasa, ácido graso sintetasa, alanina aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa, ferritina, receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), enzimas P450 y/o alcohol deshidrogenasa.

30 Como alternativa, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden modificarse mediante la introducción del ADN que codifica una proteína plasmática secretada tal como albúmina, un factor de crecimiento u hormona, insulina, transferrina, complemento, componente C3, alfa2-macroglobulina, cadena alfa/beta/gamma del fibrinógeno, factores de coagulación (factor V, factor VII, factor VIII, factor XIII, factor IX), alfa1-antitripsina o similares.

35 Los materiales biológicos que se obtienen cuando se generan células H2Stem y progenie de H2Stem pueden usarse posteriormente para identificar entidades biológicas que pueden tener usos específicos, en particular distintas aplicaciones médicas. Estos materiales biológicos incluyen no sólo sub-población (o líneas celulares) de células H2Stem o de progenie de H2Stem que presentan marcadores, actividades y/o morfología específicos, sino también cualquier otra entidad biológica que se obtiene como productos intermedios o finales, tal como medios de cultivo celulares acondicionados y fracciones de estas células y medios que incluyen proteínas, metabolitos, vesículas celulares y/o ácidos nucleicos que pueden usarse como biomarcadores para la detección de células de interés médico o como compuestos que presentan actividades o distribución de interés médico. Aun cuando tal enfoque puede lograrse usando las células de interés directamente, puede determinarse también información adicional mediante la medición del contenido de los medios de cultivo celular acondicionados que puede proporcionar información relevante sobre el secretoma y en particular sobre los efectos paracrinos de células H2Stem y de progenie de H2Stem.

50 Las características biológicas relevantes de células H2Stem o progenie de H2Stem pueden identificarse usando tecnologías tal como citometría de flujo, inmunocitoquímica, espectrometría de masas, electroforesis en gel, un inmunoensayo (por ejemplo inmunotransferencia, inmunotransferencia tipo Western, inmunoprecipitación, ELISA), amplificación de ácido nucleico, actividad enzimática, tecnologías ómicas (proteómicas, glicómicas, transcriptómicas, metabolómicas) y/u otra actividad biológica. En particular, tecnologías tal como genómicas, transcriptómicas, proteómicas, lipidómicas, glicómicas, etc. pueden proporcionar medios adicionales para la comparación de células H2Stem o progenie de H2Stem usando bases de datos y otros juegos de datos que se publican para células madre o progenitoras, y en particular para células progenitoras hepáticas (Yu J, *et al.*, 2012; Santamaria E, *et al.*, 2012; Slany A, *et al.*, 2010). De esta manera, las proteínas tal como SUSD2 pueden identificarse como marcadores cuya presencia significativamente más alta en células H2Stem las diferencian de células que tienen origen similar tal como células ADHLSC (o, en la dirección opuesta, la ausencia de expresión de CD140b distingue células H2Stem de células ADHLSC, tal como se muestra en la figura 10).

60 Estos enfoques pueden proporcionar medios para definir biomarcadores novedosos asociados a células progenitoras hepáticas adultas, o bien *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo para establecer cantidad, cualidad y homogeneidad de una población celular antes, durante o después de su preparación y uso). En particular, los biomarcadores pueden definirse por medio de la concentración de una población de células dada (células H2Stem y/o progenie de H2Stem) en una muestra biológica o en un cultivo celular en general o en combinación con la concentración de células que presentan una proteína específica, lípido, enzima, fosfolípido y/o glicano. Tales biomarcadores pueden corresponder a un péptido, una proteína, un fosfolípido, un lípido, un ácido

nucleico, un glicano, o cualquier combinación de tales elementos componentes. El biomarcador puede ser específico para la evaluación de la idoneidad de una población celular que son células H2Stem o una progenie de H2Stem, para un uso dado (por ejemplo tratamiento de una enfermedad hepática específica, obtención de tipos de células hepato-activas tras la diferenciación *in vitro* o modificación con agentes químicos y/o vectores de ácido nucleico, evaluación del metabolismo de un compuesto específico). De otra manera, el biomarcador permite evaluar si un tejido hepático dado (o muestra de células hepáticas frescas o crioconservadas) es apropiado para la obtención de células H2Stem de manera más eficaz (por ejemplo mediante selección de bancos de tejidos hepáticos y bibliotecas de otras muestras biológicas originadas por el hígado tal como extractos de proteína y bibliotecas de ADNc) para establecer qué donantes y/o muestras pueden seleccionarse).

El término “biomarcador” o “marcador” se refiere a una molécula, un parámetros, una característica o una entidad que se mide de manera objetiva y se evalúa como que caracteriza células H2Stem y o progenie de H2Stem. La evaluación cuantitativa de un biomarcador que está asociado a células H2Stem y/o progenie de H2Stem en una muestra específica (tal como un tejido o un fluido biológico) puede asociarse a una evaluación cuantitativa de células totales, a la eficacia con la que pueden producirse y aislarse las células H2Stem y/o progenie de H2Stem, o un estado médico específico de un paciente.

Las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden usarse en la medicina regenerativa y en ensayos biológicos que requieren células que presentan características biológicas (tal como actividades metabólicas o enzimáticas, un perfil antigénico u otro fenotipo) tan similares como sea posible a aquéllas observadas para hepatocitos primarios durante el periodo de tiempo deseado, una vez que se diferencian o bien *in vivo* o *in vitro*, o incluso antes de la inducción de una diferenciación completa hacia células que presentan un gran número de actividades específicas del hígado y/o actividades específicas del hígado más fuertes (es decir, células hepato-activas). Las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden usarse también para aplicaciones *in vitro* tal como estudios farmacológicos o toxicológicos (por ejemplo selección y caracterización de agentes biológicos o químicos). Las células H2Stem y progenie de H2Stem permiten el establecimiento de modelos *in vitro* y animal de toxicología, farmacología y farmacogenéticas (tal como se describen de manera extensa para hepatocitos primarios y células similares a hepatocitos derivadas de célula progenitora o madre de diverso origen) o la identificación de biomarcadores para identificar *in vivo* y/o *in vitro* población de células de interés médico, en particular en conexión con el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades hepáticas.

El término “*in vitro*” tal como se usa en el presente documento indica fuera de, o externo a, organismo animal o humano. El término “*in vitro*” tal como se usa en el presente documento debería entenderse que incluye “*ex vivo*”. El término “*ex vivo*” se refiere normalmente a tejidos o células retiradas de un organismo animal o humano y mantenidas o propagadas fuera del organismo, por ejemplo, en un recipiente de cultivo o un biorreactor.

Si las células H2Stem y células H3Stem pueden usarse preferentemente para aplicaciones *in vivo*, la progenie de H2Stem que corresponde a células H2Screen, células H3Screen-1, y las diferentes categorías de células H3Screen-2 pueden usarse preferentemente como células similares a hepatocitos o células hepato-activas diferenciadas para el descubrimiento/validación de fármacos.

Las células H2Stem y progenie de H2Stem (o correspondientes materiales biológicos que se obtienen cuando se generan las mismas) pueden proporcionarse en composiciones que las comprenden y en particular como composiciones farmacéuticas que pueden usarse en procedimientos terapéuticos para la administración *in vivo* (en humanos o en modelos animales) o aplicaciones *in vitro* en forma de una composición que incluye tales células o bien como células frescas o células adecuadas para el almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, células crioconservadas). Preferentemente, una composición que comprende células H2Stem o progenie de H2Stem puede comprender al menos  $10^3$ ,  $10^6$ ,  $10^9$  o más células. Tales composiciones a base de células pueden incluir también otros agentes de origen biológico (por ejemplo anticuerpos o factor de crecimiento) o de origen químico (por ejemplo, fármacos, compuestos que conservan o etiquetan células) que pueden proporcionar un efecto adicional terapéutico, diagnóstico o cualquier otro efecto útil. La bibliografía proporciona varios ejemplos de aditivos, excipientes, vehículos y/o portadores opcionales que son compatibles con las composiciones farmacéuticas a base de células que pueden incluir tampones, factores de crecimiento o adyuvantes específicos adicionales, en los que se define la cantidad de cada componente de la composición (en términos de microgramos/miligramos, volumen o porcentaje), como también los medios para combinarlos con células H2Stem y progenie de H2Stem.

Las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden administrarse en forma de una composición que dependiendo del procedimiento de administración elegido puede ser una suspensión de células, una esponja u otra estructura tri-dimensional en la que las células pueden crecer y diferenciarse *in vitro* y/o *in vivo* incluyendo dispositivos hepáticos bioartificiales, matrices naturales o sintéticas, u otros sistemas que permiten el injerto y la funcionalidad de células. En particular, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden administrarse por medio de inyección (englobando también la administración por catéter) o implante, por ejemplo inyección localizada, inyección sistémica, inyección intraesplénica o intraperitoneal, inyección intraportal, inyección a la pasta de hígado, por ejemplo, por debajo de la capsula del hígado, administración parenteral o inyección intrauterina en un embrión o feto. Además, las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden usarse en componentes biológicos de

dispositivos de destoxificación tal como perfusión hepática o dispositivos de asistencia hepática con cubierta externa rígida, plástica y fibras de membrana semi-permeable huecas en las que se siembran células H2Stem o progenie de H2Stem (como otras células madre, hepatocitos diferenciados o tipos celulares derivados de células madre). El fluido corporal puede perfundirse a través del dispositivo para la destoxificación de acuerdo con procedimientos bien conocidos y entonces retorna al paciente.

Las células H2Stem, progenie de H2Stem o composición que las contiene pueden usarse para la ingeniería de tejidos y la terapia celular por medio de trasplante de células hepáticas (LCT) en ubicaciones intra-hepáticas o extra-hepáticas. Usando este enfoque, pueden obtenerse también modelos animales de enfermedades hepáticas humanas mediante trasplante de células H2Stem de origen humano, progenie de H2Stem de origen humano o una composición que las contiene en animales en los que los efectos de un compuesto sobre hepatocitos primarios pueden evaluarse de manera más eficaz y distinguirse de efectos en el modelo animal.

Cuando se administra una composición terapéutica que comprende células H2Stem o una progenie de H2Stem específica, puede formularse generalmente en una dosificación unitaria. En cualquier caso, puede ser deseable incluir agentes y/o adaptar procedimientos conocidos para la administración de células a pacientes que garantizan la viabilidad de células H2Stem o progenie de H2Stem, por ejemplo mediante incorporación de las células en un biopolímero o polímero sintético. Ejemplos de biopolímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y lamininas de proteoglicanos, moléculas de adhesión, proteoglicanos, hialuronanos, cadenas de glicosaminoglicano, quitosano, alginato, péptidos naturales o modificados de manera sintética que se derivan de tales proteínas, y polímeros sintéticos, biodegradables y biocompatibles. Estas composiciones pueden producirse con o sin incluir citocinas, factores de crecimiento y pueden administrarse como una suspensión o como un gel tri-dimensional con las células embebidas allí dentro.

Los procedimientos de la invención contemplan no sólo usar cualquier donante de tejidos hepáticos para generar células H2Stem o progenie de H2Stem, sino usar un tejido hepático del propio paciente para producir y aislar células H2Stem y generar progenie de H2Stem o composición que las contiene. Tales células serían autólogas con respecto al paciente y podrían administrarse fácilmente al paciente. De otro modo, pueden producirse y aislarse células H2Stem de tejido que no es del propio paciente. Si se contempla la administración de tales células a un paciente, puede preferirse que el tejido hepático sometido al procedimiento de la presente invención para obtener células H2Stem se seleccione de modo que se maximice, al menos dentro de los límites que pueden conseguirse, la compatibilidad tisular entre el paciente y las células administradas, reduciendo de ese modo la posibilidad de rechazo de las células administradas por el sistema inmunitario del paciente (por ejemplo, rechazo injerto contra huésped).

Una cuestión con respecto al uso terapéutico de células H2Stem y progenie de H2Stem es la cantidad de células necesaria para lograr un efecto óptimo. Las dosis para la administración pueden ser variables, pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores; y pueden determinarse por el experto en la técnica mediante aplicación de la enseñanza de la presente divulgación. Normalmente, la dosis o las dosis administradas proporcionarán una cantidad terapéuticamente eficaz de las células y esto puede requerir la optimización de la cantidad de células administradas. Por tanto, la cantidad de células que van a administrarse variará para el sujeto que está tratándose (por ejemplo entre  $10^2$  y  $10^{10}$  células por cada tratamiento en un ciclo o para todo el ciclo de tratamiento). Sin embargo, la determinación precisa de una dosis terapéuticamente eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, tamaño del daño tisular y cantidad de tiempo desde que se produjo el daño.

Preferentemente, las composiciones que comprenden células H2Stem o una progenie de H2Stem específica deberían contener una población de células sustancialmente homogénea tal como se ha definido anteriormente y la cantidad de células dentro de cada dosis puede ajustarse en consecuencia. En particular, cuando la composición comprende células H3Stem o cualquier otra progenie de H2Stem que forma agrupaciones de células tri-dimensionales, tales composiciones pueden prepararse de acuerdo con no sólo el número total de células (o de agrupaciones de células), sino también de acuerdo con su dimensión mediante la selección de agrupaciones de células que van a administrarse con un diámetro dentro de un intervalo dado (por ejemplo entre  $50\ \mu\text{m}$  y  $200\ \mu\text{m}$  o entre  $50\ \mu\text{m}$  y  $100\ \mu\text{m}$ ) o por debajo/por encima de un tamaño dado (por ejemplo  $100\ \mu\text{m}$ ,  $200\ \mu\text{m}$ ,  $500\ \mu\text{m}$  o  $1000\ \mu\text{m}$ ) y/o que comprenden un número de células dado (por ejemplo al menos 10000, 20000, 50000, 100000 o más).

La distribución, la diferenciación y/o la proliferación de células H2Stem o progenie de H2Stem después de su administración o implante puede determinarse (como también su actividad después/antes de la administración de un agente terapéutico diferente), puede someterse a ensayo en un sujeto humano o en modelos animales (preferentemente un roedor). Por ejemplo, el análisis de los hígados de ratones SCID trasplantados de manera intraesplénica con células H2Stem o progenie de H2Stem puede demostrar que estas células pueden injertarse mediante detección de un marcador humano y pueden diferenciarse en hepatocitos maduros, activos mediante detección de albúmina humana, o cualquier otro marcador específico del hígado humano típico (o un gen recombinante que se transfirió previamente en las células H2Stem o progenie de H2Stem administradas).

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad hepática, que comprende la administración de células H2Stem, progenie de H2Stem o una composición que las contiene a un sujeto que lo necesita. Las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden usarse para el tratamiento de enfermedades hepáticas, en particular aquéllas que requieren el restablecimiento permanente (o de tiempo limitado) de la función hepática en un sujeto que, de acuerdo con la bibliografía, requiere el trasplante de hígado, trasplante de hepatocitos o regeneración del hígado teniendo en cuenta la pérdida de masa y/ función hepática que se observa y que puede agruparse en diferentes categorías.

Un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad hepática comprende administrar un producto de H2Stem, tal como células H2Stem o una progenie de H2Stem dada, y preferentemente dentro de una composición, a un sujeto que lo necesita. En particular, un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un paciente que lo necesita comprende administrar una cantidad eficaz de un producto de H2Stem al paciente, siendo la enfermedad preferentemente una enfermedad hepática tal como un erro congénito del metabolismo hepático, un trastorno de la coagulación de la sangre hereditario, colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1 / 2 / 3, deficiencia de alfa 1-antitripsina, defecto de transportadores de células hepáticas, porfiria, hígado graso u otra enfermedad hepática fibrótica, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad degenerativa hepática, o insuficiencia hepática aguda o crónica. Una primera categoría de enfermedades hepáticas se representa mediante errores congénitos del metabolismo hepático que puede distinguirse adicionalmente en errores del metabolismo de aminoácidos (tal como enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, fenilcetonurias, tirosinemia, acidemia propiónica, aciduria orgánica y trastornos del ciclo de la urea incluyendo aciduria argininosuccínica, deficiencia de carbamoil-fosfato sintasa I, citrulinemia, hiperargininemia y deficiencia de ornitina carbamoiltransferasa), del metabolismo de metales (tal como enfermedad de Wilson o hemocromatosis), y del metabolismo de hidratos de carbono (tal como enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I / II, fructosemia o galactosemias), trastornos lisosomales (tal como enfermedad de Wolman, enfermedad de Niemann Pick), trastornos peroxisomales (tal como enfermedad de Refsum), hipercolesterolemias familiares y otros trastornos del metabolismo de lípidos, enfermedades mitocondriales (tal como deficiencia de piruvato carboxilasa) e hiperbilirrubinemia (tal como el síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Gilbert o síndrome de Dubin-Johnson). Una segunda categoría se representa mediante trastornos de la coagulación de la sangre hereditarios tal como deficiencia del factor V, deficiencia del factor VII, deficiencia del factor VIII, deficiencia del factor IX, deficiencia del factor XIII y otras deficiencias debido a la cantidad insuficiente de otros factores relacionados con la coagulación (incluyendo otros factores de la coagulación y cadenas alfa/beta/gamma del fibrinógeno) u otras proteínas expresadas y secretadas de manera específica por el hígado en el flujo sanguíneo (tal como albúmina). Una tercera categoría se representa mediante otras enfermedades hepáticas no asociadas directamente a deficiencias de la coagulación o del metabolismo e incluye colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1 / 2 / 3, deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedad de Caroli, defectos de transportadores de células hepáticas, porfirias (tal como porfiria intermitente aguda), hígado graso y otras enfermedades hepáticas fibróticas (NASH/NAFLD), cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad degenerativa hepáticas o insuficiencia hepática aguda o crónica (por ejemplo fallo hepático post-hepatectomía, fulminante, inducido viralmente, agudo sobre crónico).

El uso de células H2Stem o progenie de H2Stem en general (o poblaciones de células específicas, tal como células H3Stem), dentro de composiciones y en procedimientos de tratamientos, puede proporcionar efectos terapéuticos a enfermedades hepáticas tal como aquéllas enumeradas anteriormente, sin embargo puede estar asociado también a estudios *in vitro* en sustitución de hepatocitos primarios o líneas de células hepáticas. En particular, la progenie de H2Stem puede usarse en procedimientos farmacológicos y toxicológicos (tempranos) para la evaluación de la eficacia (si el producto de H2Stem expresa una diana farmacológica potencial para una enfermedad específica o no específica del hígado), el metabolismo, la estabilidad y/o la toxicidad de compuestos (por ejemplo entidades biológicas o químicas).

Tales procedimientos *in vitro* y usos deberían comprender generalmente las siguientes etapas:

- (a) proporcionar una preparación de producto de H2Stem (por ejemplo células H2Stem o progenie de H2Stem en forma de células, extracto celular o medio acondicionado obtenido a partir de células H2Stem o progenie de H2Stem);
- (b) exponer dicho producto de H2Stem a uno o más componentes exógenos seleccionados de compuestos químicos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, azúcares, metales, sales, virus, bacterias o células; y
- (c) detectar los efectos de dicho uno o más componentes exógenos sobre el producto de H2Stem y/o detectar la presencia, localización o alteración de dicho uno o más componentes exógenos después de la exposición al producto de H2Stem.

Las células H2Stem y progenie de H2Stem expresan en alto nivel enzimas y otras proteínas específicas del hígado que se conoce que metabolizan la mayor parte de productos químicos que son fármacos ya registrados, fármacos candidatos todavía en desarrollo y evaluación pre-clínica para determinar efectos específicos del hígado, o cualquier otro producto químico que se sospeche que tiene efectos específicos del hígado que pueden ser no deseados (es decir para un compuesto hepatotóxico) o deseado (si las células H2Stem y progenie de H2Stem expresan una enzima y otra proteína específica del hígado que se conoce que es por sí misma una

diana para fármacos candidatos para una enfermedad específica o no específica del hígado tal como cáncer y el compuesto puede considerarse entonces como fármaco candidato para tal enfermedad).

5 En general, las células H2Stem o progenie de H2Stem en forma de células, extracto celular o medio acondicionado obtenido a partir de células H2Stem o progenie de H2Stem pueden evaluarse en la etapa (c) anteriormente para la evaluación del metabolismo, eliminación y toxicología de productos químicos, compuestos inorgánicos, productos biológicos, bacterias, virus o células mediante el análisis de características generales tal como la morfología celular o viabilidad (por ejemplo en ensayos de citotoxicidad). Sin embargo, criterios alternativos o adicionales pueden incluirse, tal como la regulación por incremento o disminución de proteínas específicas (o no específicas) del hígado, o cualquier alteración (por ejemplo degradación, agregación, activación o inhibición) de proteínas dentro del producto de H2Stem (por ejemplo células H2Stem, progenie de H2Stem, o extracto celular o medio acondicionado obtenido a partir de células H2Stem o progenie de H2Stem).

15 Como alternativa (o en combinación con los criterios evaluados para las células H2Stem o progenie de H2Stem y materiales biológicos derivados), la etapa (c) puede implicar el análisis de cómo este uno o más componentes exógenos se han internalizado y/o modificado o no mediante células H2Stem o progenie de H2Stem y materiales biológicos derivados. Estos criterios analíticos varían de acuerdo con el tipo de componentes exógenos tal como se describe en la bibliografía, por ejemplo degradación, unión con otras proteínas, persistencia en cultivo celular, agregación, infectividad (para virus) o diferenciación o viabilidad (para células).

20 La bibliografía sobre ensayos *in vitro* que implican células y productos derivados (es decir extractos celulares, medios acondicionados) puede proporcionar una guía de como las células H2Stem o progenie de H2Stem en forma de células, composiciones materiales biológicos derivados (es decir productos de H2Stem) pueden usarse *in vitro* tal como se indica en las etapas (a)-(c), por ejemplo con respecto a la concentración, momento, cultivo y condición de ensayo y tecnologías analíticas. Ensayos similares pueden realizarse, por tanto, mediante introducción de células H2Stem o progenie de H2Stem en animales en la etapa (a) y entonces administración de uno o más componentes exógenos a los animales en la etapa (b) para determinar, en la etapa (c), si y cómo dicho uno o más componentes modifican las células H2Stem o progenie de H2Stem (o materiales biológicos relacionados) y/o se modifican mediante células H2Stem o progenie de H2Stem en estos animales.

25 Los productos de H2Stem, y células H2Stem y progenie de H2Stem en particular, pueden usarse para los procedimientos *in vivo* (es decir para usos terapéuticos de tales células) e *in vitro* (por ejemplo para usos farmaco-toxicológicos) que implican productos químicos o productos biológicos descritos anteriormente dentro de un kit tal como se ha descrito anteriormente. En particular, el kit puede comprender, además de tales células (o materiales biológicos derivados), elementos adicionales que permiten usarlas y/o detectarlas y sus actividades cuando se exponen a un panel de compuestos (que resultan de al menos un cambio en la estructura, el metabolito y/o la concentración del compuesto que va a someterse a ensayo), como también compuestos de referencia, soluciones y/u otras células que ayudarían en la comparación y evaluación de los efectos que se observan en ensayos que implican el uso de células H2Stem y progenie de H2Stem.

30 La caracterización de entidades químicas como candidatos de fármaco durante la evaluación preclínica requiere (además de la potencia, seguridad o farmacocinéticas) la evaluación del metabolismo del fármaco para identificar las rutas metabólicas relevantes como también interacciones fármaco-fármaco potenciales (con inducción e inhibición dependientes de citocromo P450). Esta información es esencial para la industria farmacéutica cuando deciden llevar un compuesto principal hacia el desarrollo en fase clínica. Se necesitan urgentemente ensayos a base de células *in vitro* innovadores, fiables y predictivos para el desarrollo preclínico temprano, ya que todavía una gran proporción de candidatos de fármaco falla durante el desarrollo clínico debido a la evaluación toxicológica inadecuada, en particular para hepatotoxicidad.

35 40 Hasta la fecha, tales modelos a base de células se basan o bien en hepatocitos primarios humanos o líneas celulares derivadas de hepatoma de roedor o humano (tal como células HepaRG o HepG2). Ninguno de los modelos disponibles son completamente satisfactorios para la prueba regular farmacológica y de toxicidad. El uso de hepatocitos humanos está limitado tanto por motivos cualitativos como cuantitativos debido a su limitada disponibilidad y dificultades técnicas para establecer fuentes fiable y mantenimiento a largo plazo de su funcionalidad hepática en cultivo.

45 50 Como alternativa, los modelos a base de hepatocitos que se basan en células de origen de roedor no proporcionan una representación óptima de metabolismo hepático humano. Entonces, cuando en cultivo, estas células pueden desdiferenciarse rápidamente (pérdida progresiva de sus características clave tal como enzimas que metabolizan fármacos) y tienen una corta vida útil (no se expanden *in vitro*). Las líneas celulares derivadas de hepatoma humano se expanden fácilmente *in vitro* pero carecen del fenotipo completo diferenciado que puede ser importante en la determinación del metabolismo y la toxicidad. La evaluación de la toxicidad sub-crónica y crónica de alto rendimiento fiable no puede, por tanto, evaluarse usando los modelos a base de hepatocitos humanos disponibles. Por otro lado, la selección de toxicidad aguda y sub-aguda está dificultada por la disponibilidad limitada de hepatocitos humanos y su incapacidad de expansión.

Por tanto, las células H2Stem y progenie de H2Stem (en particular cuando forman agrupaciones de células tri-dimensionales) pueden proporcionar mejores modelos *in vitro* que implican células disponibles de manera continua y fácil con variabilidad limitada en el patrón similar a hepatocito de enzimas estables con respecto al tiempo en cultivo y de lote en lote, en particular como células alternativas a hepatocitos primarios en "ADMET" (administración, distribución, metabolismo, eliminación y toxicología) o ensayos citotóxicos (es decir sobre la viabilidad de hepatocitos y/o eficacia funcional).

Las células H2Stem y progenie de H2Stem (en particular cuando se forman agrupaciones de células tri-dimensionales) pueden usarse en procedimientos para someter a ensayo agentes para el tratamiento de infecciones hepáticas o para permitir la replicación eficaz de un virus que infecta al hígado y hepatocitos en particular. Las células H2Stem y progenie de H2Stem pueden diferenciarse y/o modificarse de manera genética antes o después de la exposición al virus (por ejemplo un virus de la hepatitis). Entonces, la población de células infectada puede exponerse a una cantidad predeterminada de compuesto candidato para el tratamiento de la infección para observar cualquier efecto útil (por ejemplo sobre la replicación viral), puede usarse para la purificación de partículas virales o puede usarse para evaluar cualquier efecto *in vivo* potencial de la infección viral, tal como se muestra para otras células progenitoras hepáticas en conexión con la infección por hepatitis C, fibrosis hepática o carcinogénesis (Wu X *et al.*, 2012; Wang C *et al.*, 2012; Torres DM y Harrison SA, 2012).

La invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos que no limitan el alcance de la invención de ningún modo.

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: Preparación y caracterización de células H2Stem y progenie de células H2Stem a partir de tejidos hepáticos primarios**

#### Materiales y procedimientos

##### *Medios y otros materiales para el cultivo celular*

Se usaron los siguientes materiales: medio E de Williams (n.º de cat. 22551022, Invitrogen), DMEM con alta concentración de glucosa (4,5 g/l) y L-glutamina (DMEM con alto contenido en glucosa, n.º de cat. 41965047, Invitrogen), IMDM (n.º de cat. 21980032, Invitrogen), IMDM sin rojo fenol (n.º de cat. 21056023, Invitrogen), medio de cultivo de hepatocitos (HCM; n.º de cat. CC-3198, Lonza), suero bovino fetal (FBS; n.º de cat. F7524, Sigma), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF; n.º de cat. AF-100-15, Peprotech), factor de crecimiento de hepatocito humano recombinante (HGF; n.º de cat. 100-39, Peprotech), oncostatina M humana recombinante (OSM; n.º de cat. 300-10, Peprotech), insulina humana recombinante (INS; n.º de cat. HI0219, Lilly), suplemento G de insulina-transferrina-selenio (ITS; n.º de cat. 41400045, Invitrogen), albúmina humana (50 g/l, n.º de cat. 1501466 Baxter), heparina sódica (Heparin LEO®), dexametasona (Dex; n.º de cat. D4902, Sigma), penicilina líquida / estreptomycin (P/S; n.º de cat. 15070063, Invitrogen), frascos T-75 revestidos con colágeno I de cola de rata (Biocoat, n.º de cat. 356485, BD Biosciences), frasco de cultivo celular con cuello canteado rectangular de 75 cm<sup>2</sup> Corning® CellBIND® con tapa de ventilación (n.º de cat. 3290, Corning).

##### *Preparación de células hepáticas humanas primarias*

El procedimiento para la obtención de células hepáticas humanas se basa en publicaciones previas que se han descrito anteriormente (Najimi M *et al.*, 2007), con modificaciones minoritarias. Tras la retirada, el hígado se lavó en primer lugar con solución ViaSpan enfriada en hielo (Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals) por medio de cánulas que conectan con el sistema venoso portal, y entonces se transfirió en frío y en condición estéril a la sala limpia el aislamiento de células hepáticas. Toda la contaminación microbiológica se ha controlado estrictamente antes, durante y tras el proceso de aislamiento. Se realizó el aislamiento de células hepáticas humanas usando una técnica de perfusión de colagenasa de dos etapas bajo un flujo laminar estéril en salas limpias. La primera perfusión consistía en solución EBSS precalentada a 37 °C sin calcio y sin magnesio (n.º de cat. 14155-063, Life Tech, complementada con 0,5 mM de ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA; Sigma), 2 mg/l de gentamicina, 100.000 UI/l de penicilina G. Esta primera perfusión permite eliminar calcio iónico extracelular y debilitar las uniones intercelulares del parénquima. La segunda etapa incluía digestión enzimática con 0,8 mg/ml de colagenasa (n.º de cat. 11213857001, Roche Applied Sciences) diluida en solución EBSS con calcio y con magnesio (n.º de cat. 24010-043, Life Tech.) complementada con 5 mM de ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES; n.º de cat. 11344-041, Life Tech.), 0,03 mg/ml de inhibidor de tripsina (n.º de cat. 10109878001, Roche Applied Sciences), 2 mg/l de gentamicina, 100.000 UI/l de penicilina G. La composición de estos tampones puede adaptarse a los requerimientos reales para los buenos procesos de fabricación haciendo uso de reactivos adicionales o alternativos de calidad GMP (por ejemplo enzimas específicas o N-acetilcisteína).

Cada etapa de perfusión lleva aproximadamente 10 minutos antes de que el hígado se digiriera completamente y se rompiera mecánicamente. La actividad colagenasa residual se interrumpió mediante lavado del parénquima

digerido con una solución M199 fría (Lonza) que contiene 27,5 µg/ml de inhibidor de tripsina, 0,05 % de albúmina humana, 2,4 mg/l de gentamicina, 100.000 UI/l de penicilina G. La suspensión de células hepáticas digeridas se filtró a través de una malla de acero de 4,75 a 0,25 mm de poro, entonces se lavó 3 veces con solución M199 y se centrifugó con baja velocidad (por ejemplo 1200 rpm) durante 3 minutos a 4 °C para eliminar residuos celulares y una mayoría de células no parenquimatosas. Las células se suspenden en un medio de crioconservación que se prepara mediante adición a 750 ml de solución ViaSpan, 16 mg de dexametasona, 40 UI de insulina, 0,5 % de HEPES, 1g/l de glucosa, 15 %, albúmina humana 20 %, 10 % de DMSO, y entonces se mantienen en nitrógeno líquido usando viales, bolsas apropiados u otro sistema para el almacenamiento y conservación a largo plazo de células humanas. También en esta fase, la composición de estos tampones puede adaptarse a los requerimientos reales para los buenos procesos de fabricación haciendo uso de reactivos adicionales o alternativos de calidad GMP.

Las preparaciones de células hepáticas resultantes están constituidas de manera predominante por hepatocitos de fracción parenquimatosa, conteniendo cada una 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> células (dependiendo del volumen de las preparaciones y/o el hígado humano específico). Las suspensiones de células hepáticas crioconservadas se usan mediante descongelación rápida de las mismas a 37 °C y lavado de las mismas dos veces en 10x volumen de albúmina humana al 5 % complementada con 2,5 g/l de glucosa, 0,084 g/l de bicarbonato y 5000 IE/UI/ml de heparina LEO®. Tras la centrifugación a 224 g durante 10 minutos a 4 °C, el sedimento celular se suspende en los medios de cultivo celular requeridos.

#### *Preparación de células ADHLSC*

Las células ADHLSC se obtienen aplicando un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente (Najimi M *et al.*, 2007; Khuu DN *et al.*, 2011), con o sin modificaciones minoritarias. En resumen, las preparaciones de células hepáticas se resuspenden en medio E de Williams complementado con el 10 % de FBS, 25 ng/ml de EGF (EGF puede no estar presente en el medio de cultivo celular si la preparación se realiza en CellBind), 10 µg/ml de INS, 1 µM de DEX y 1% de P/S. Las células se cultivan o bien en frascos revestidos con colágeno I de cola de rata o frascos Corning® CellBIND® y se cultivan a 37 °C en una atmósfera completamente humidificada que contiene 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras 24 horas, se cambia el medio con el fin de eliminar las células no adherentes y después de esto se renueva dos veces por semana, mientras que el cultivo se sigue mediante microscópico cada día. El medio de cultivo se cambia después de 12-16 días por DMEM con alto contenido en glucosa complementado con 9 % de FBS y 0,9 % de P/S con el fin de acelerar la eliminación de hepatocitos y estimular la expansión de células ADHLSC. Un tipo celular con morfología similar a mesenquimatosa emerge y prolifera. Cuando alcanza el 70-95 % de confluencia, las células se tripsinizan con tripsina recombinante (trypLE; LifeTech) y 1 mM de EDTA y se vuelven a colocar en placa con una densidad de 1-10 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>.

#### *Preparación de células H2Stem*

Las suspensiones de células hepáticas crioconservadas se usan para preparar cultivos celulares en frascos T-75 revestidos con colágeno I de cola de rata con densidades de célula entre 5.000 – 20.000 células/cm<sup>2</sup> y se incuban a 37 °C en una atmósfera completamente humidificada del 5 % de CO<sub>2</sub>. Como alternativa, se aplicaron condiciones hipóxicas en el incubador (tal como el 5 % de O<sub>2</sub>) o se generaron mediante adición de agentes antioxidantes en el medio de cultivo celular (tal como N-acetil cisteína a una concentración de 1 mM o una concentración inferior). El cambio del medio y el análisis de la morfología se realizan dos veces por semana usando, como medios de cultivo, medio E de Williams complementado con el 9 % de FBS, el 0,9 % de P/S, 1 µM de Dex; 10 µg/ml de INS y 12,5-25 ng/ml de EGF durante la fase de emergencia. Una vez que las células H2Stem han aparecido como agrupaciones de células adherentes que predominan en el cultivo celular, se realiza la expansión posterior en medio E de Williams complementado con el 9 % de FBS, el 0,9 % de P/S, 1 µM de Dex; 10 µg/ml de INS, 12,5-25 ng/ml de EGF en ausencia o en presencia (12,5-50 ng/ml) de HGF.

Las células H2Stem con una morfología meso-epitelial cuboidal aparecen como pequeñas agrupaciones y empiezan a expandirse en el intervalo de los siguientes 7-12 días. Las agrupaciones formadas mediante tales células se tripsinizan entonces en el intervalo de los siguientes 2-3 días (es decir, en el intervalo de 10-15 días después de la colocación en placa de células hepáticas primarias) y entonces se cultivan a 5000-8000 células/cm<sup>2</sup> en medio a base de E de Williams durante varios pases en el mismo medio. La tripsinización puede realizarse a partir del pase 1 en adelante en un 80-90 % de confluencia en placas revestidas con colágeno.

#### *Diferenciación de células como células similares a hepatocitos adherentes*

Las células se cultivan en placas de 6 pocillos revestidas con colágeno tipo I, BD BioCoat Cellware (n.º de cat. 356400, BD Biosciences) con una densidad de 5000 - 20000 células/cm<sup>2</sup> en los mismos medios de expansión. La diferenciación hepática se inicia tras el 95-100 % de confluencia mediante cambio de medios a IMDM que contiene 20 ng/ml de HGF, 20 ng/ml de OSM, 1 µM de Dex., 1 % de ITS, con (para células ADHLSC) o sin (para células H2Stem) 25 ng/ml de EGF. Este medio de cultivo celular para la diferenciación hepática (medio HepDif) se cambia dos veces por semana durante al menos las siguientes 2 (para células H2Stem) o 4 (para células ADHLSC) semanas.

*Caracterización morfológica de células en condiciones de cultivo celular*

5 Las imágenes se toman mediante microscopía óptica (contraste de fases; microscopio Olympus UC30) usando una cámara Olympus IX50 y el software de obtención de imágenes Cellsens Digital o usando el equipo de obtención de imágenes en vivo Cell-IQ (CM technologies) en el que un microscopio óptico toma una imagen nuevamente focalizada de la misma posición en intervalos de tiempo regulares. Cell-IQ PC (contraste de fases) es una plataforma de análisis y obtención de imágenes de células en vivo continua completamente integrada que incorpora contraste de fases y capacidad de obtención de imágenes de campo brillante con un paquete de software de analizador a bordo (Machine Vision Technology) para la identificación, el análisis y la cuantificación automáticos de datos de imagen.

*Caracterización de los genes expresados mediante poblaciones de células usando RT-qPCR*

15 Se extrae ARN total de células usando el kit GenElute Mammalian (n.º de cat. RTN70, Sigma) tras el tratamiento con ADNasa con kit DNA-free™ (n.º de cat. AM1906, Ambion). Se sintetiza la primera cadena de ADNc usando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc de transcriptor (n.º de cat. 04379012001, Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y posteriormente se diluye con agua libre de nucleasa (n.º de cat. AM9938, Invitrogen) para dar ADNc a 10 ng/µl. Las mezclas de amplificación de RT-PCR (20 µl) contienen 0,2 µg de molde de ADNc, 10 µl de 2xTaqman Master Mix (n.º de cat. 4369514, Applied Biosystem) y 1 µl de 20x PrimeTime qPCR assay (IDT).

25 Las muestras se ejecutan por duplicado en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems ViiA™ 7 o cualquier otro cicladador de PCR en tiempo real de Applied Biosystems. Las condiciones del ciclado son tal como sigue: 10 min de activación con polimerasa a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 45 s. Los pares de secuencias de cebador específicos del transcripto génico se obtuvieron de Applied Biosystems como se resumen en la tabla 1 a continuación.

Gen humano	Secuencias de cebador (número de referencia ABI)	Longitud de amplicón
CYP3A4	Hs00604506_m1	119
CYP2C9	Hs00426397_m1	148
CYP1A2	Hs00167927_m1	67
CYP2C19	Hs00426380_m1	106
CYP2D6	Hs02576167_m1	85
CYP2B6	Hs03044633_m1	136
OTC	Hs00166892_m1	95
UGT1A1	Hs00153559_m1	65
Albúmina	Hs00910225_m1	137
Vimentina	Hs00185584_m1	73
HNF-4	Hs00230853_m1	49
HNF-3b	Hs00232764_m1	66
PPIA	Hs99999904_m1	98
GAPDH	Hs99999905_m1	122

30 La cuantificación relativa de la expresión génica se estableció normalizando la intensidad de señal frente a los transcriptos de control endógenos GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) o PPIA (ciclofilina A). Después de la normalización, los datos se trazaron gráficamente y se compararon entre poblaciones de células.

*Caracterización de las células mediante citometría de flujo*

35 Las células se recogen, se suspenden en una concentración de 500-1000/µl en tampón PBS (n.º de cat. SH30028.03, Thermo Fisher) y se incuban durante 30 min a 4 °C con los siguientes anticuerpos etiquetados con fluorocromo específicos para los antígenos indicados que se usan en la concentración indicada por los fabricantes: CD45-PE Cy7 (n.º de cat. 557748, BD Biosciences), CD90-FITC (n.º de cat. 555595, BD Biosciences), CD73-PE (n.º de cat. 550257, BD Biosciences), CD29-APC (n.º de cat. 559883, BD Biosciences), CD44-FITC (n.º de cat. 555478, BD Biosciences), CD133-PE (n.º de cat. 130080901, Miltenyi Biotec), albúmina-FITC (n.º de cat. CLFAG2140, Sanbio), citoqueratina 19 (CK-19) anti-humana de ratón monoclonal (Clone RCK108; M0888, Dako), IgG anti-ratón - DyLight 488 (n.º de cat. 715-485-150, Jackson Immunoresearch), CD117-APC (n.º de cat. 333233, BD Biosciences), CD31-FITC (n.º de cat. 555445, BD Biosciences), CD31-PE (n.º de cat. 340297, BD Biosciences), CD326 (Cat.No.347200, BD Biosciences). Se usaron correspondientes anticuerpos control de isotipo para la evaluación de la unión no específica de anticuerpos monoclonales. Las células se lavan entonces y se suspenden en PBS/BSA para la lectura con citómetro de flujo BD Biosciences FACSCanto II.

*Caracterización de las células mediante inmunofluorescencia o mediante inmunocitoquímica*

Las células se fijan con paraformaldehído al 4 % (n.º de cat. 43368, Alfa Aesar) a temperatura ambiente durante 10-15 minutos y se lavan durante tres veces con PBS. Cuando sea necesario se elimina la peroxidasa endógena por medio de incubación de 10 minutos con peróxido de hidrógeno al 3 % (n.º de cat. 31642, Sigma). A continuación, las células se permeabilizan durante 10-15 minutos usando un 1 % de Triton X-100 (n.º de cat. T8787, Sigma) en tampón PBS. Se evita la inmunotinción no específica mediante incubación durante 1 hora en tampón PBS que contiene el 5 % de suero de burro normal (n.º de cat. 017-000-121, Jackson ImmunoResearch) para inmunocitoquímica o mediante incubación durante 1 hora a 37 °C en tampón PBS que contiene un 5 % de albúmina de suero bovino (BSA) (Cat. No A2153, Sigma) para inmunofluorescencia. La incubación con el anticuerpo primario se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente (o durante la noche a 4 °C). Las muestras se lavaron entonces tres veces durante 15 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 30 minutos (para la inmunocitoquímica) o durante 1 hora (para la inmunofluorescencia) a temperatura ambiente.

Los siguientes anticuerpos se usaron como anticuerpo primario de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la inmunocitoquímica o inmunofluorescencia: albúmina de suero anti-humano de ratón monoclonal (n.º de cat. A6684, Sigma), vimentina anti-humana de ratón monoclonal (n.º de cat. 10515, Progen), alfa actina de músculo liso anti-humana de ratón monoclonal (ASMA, n.º de cat. M0851, Dako), citoqueratina 19 (CK-19) anti-humana de ratón monoclonal (Clone RCK108; M0888, Dako), anticuerpo TDO2 anti-humano de ratón monoclonal (n.º de cat. SAB1406519, Sigma), anticuerpo CK-18 anti-humano de ratón monoclonal (n.º de cat. SAB3300015, Sigma), anticuerpo UGT anti-humano monoclonal (n.º de cat. ab129729, Abcam), MRP-2 anti-humano monoclonal (n.º de cat. ab3373, Abcam), factor nuclear 4 de hepatocitos anti-humano (HNF-4; n.º de cat. sc-8987, Santa Cruz) y CYP3A4 anti-humano de ratón policlonal (n.º de cat. SAB1400064, Sigma).

Los siguientes anticuerpos etiquetados se usaron como anticuerpo secundarios para la inmunofluorescencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante: IgG anti-ratón de burro conjugada con Alexa Fluor®488 (n.º de cat. 715-545-151, Jackson ImmunoResearch), IgG anti-conejo de burro conjugada con Cy3 (n.º de cat. 711-165-152, Jackson ImmunoResearch). Para la inmunocitoquímica, la detección se realiza usando Envision™ anti-ratón (Dakocytomation, n.º de cat. K4001, Dako) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La detección se realiza después de la incubación durante 5 min con polímero etiquetado con peroxidasa y sustrato cromógeno (DAB, n.º de cat. D416, Dako), seguido por un lavado tres veces con PBS. Los núcleos se contratiñen usando 4,6-diamidino-2-fenilindol (Vectashield®+DAPI, n.º de cat. H-1200, ABCYS) para la inmunofluorescencia o con hematoxilina de Mayer (n.º de cat. MHS16, Sigma) para la inmunocitoquímica. Las células se colocan para la inmunocitoquímica y a continuación se examina con aumento de 10, 20 y 40x usando un microscopio invertido Olympus IX50 acoplado a una cámara UC30. Se adquieren las imágenes digitales usando CellSens Software. Los hepatocitos primarios humanos (obtenidos tal como se ha indicado anteriormente) se tiñen en paralelo como control positivo para marcadores hepáticos y control negativo para marcadores mesenquimatosos. Las imágenes se toman mediante microscopio de fluorescencia (Olympus AX70) equipado con una cámara Olympus XC30 y CellSens Software.

*Caracterización de las células mediante actividades biológicas*

Para el ensayo de actividad luminiscente CYP3A4, se tripsinizan las células similares a hepatocitos diferenciadas obtenidas de células ADHLSC o células H2Stem, se transfieren a placas de microtitulación de 96 pocillos (n.º de cat. 734-1662, Costar) con la concentración de 100000 células/pocillo y se mide la actividad usando ensayo P450-Glo™ CYP3A4 con luciferina-IPA (n.º de cat. V9002, Promega). La luminiscencia se mide usando el luminómetro Victor IV (Perkin-Elmer Life Sciences). Las células no tratadas se miden en paralelo para sustraer el ruido de fondo. Los resultados se normalizan con respecto al patrón de microsomas de CYP3A4 que se proporciona por el sistema de enzima CYP3A4 humano (n.º de cat. V4820, Promega) y se calculan como picomoles/célula.

Para el ensayo de secreción de urea, se tripsinizan células y se incuban en IMDM sin rojo fenol (n.º de cat. 21056023, Invitrogen), en placas de microtitulación de 48 pocillos revestidas con colágeno (n.º de cat. 356505, BD Biosciences). Como sustrato para potenciar la secreción de urea, se añadieron 1 mM de ornitina (n.º de cat. O2375, Sigma) y 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl (n.º de cat. A0171, Sigma) al medio de cultivo. Después 2-24 horas, se mide la secreción de urea usando el kit de ensayo de urea colorimétrico Quantichrome (n.º de cat. DIUR-500, BioAssay Systems). La intensidad del color (proporcional a la concentración de urea en la muestra) se lee a 520 nm después de incubación durante 5-20 min y es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra. Se calcula la urea total (mg/dl) en el sobrenadante de cultivo usando una curva estándar de urea preparada en IMDM sin rojo fenol, tal como se recomienda por las instrucciones del fabricante, antes de establecer la cantidad de urea secretada como pg/célula/2-24 h. Para evaluar cualquier interferencia en la detección de señal real, se realiza la evaluación de la secreción de urea en medios que incluyen ornitina / cloruro de amonio y controles celulares, incubados sin ornitina / cloruro de amonio. Estas muestras sirven como control negativo para determinar la especificidad y evitar falsa positividad.

65

Para el ensayo de conjugación de bilirrubina se incuban células con 20-50  $\mu\text{M}$  de bilirrubina no conjugada (n.º de cat. B4126, Sigma). La conjugación de bilirrubina y bilirrubina total se mide después de 2-24 horas usando el ensayo de bilirrubina directa colorimétrico Direct (n.º de cat. DZ151A-K, Diazyme) y ensayo de bilirrubina total (n.º de cat. DZ150A-K, Diazyme). En este ensayo se mezcla bilirrubina (no) conjugada con el reactivo listo para usar de Diazyme que contiene el detergente y el vanadato o sólo vanadato (pH 3), después de lo cual se oxida la bilirrubina total o directa en la muestra para dar biliverdina, respectivamente. La oxidación posterior da como resultado una disminución de la absorbancia específica para bilirrubina. La concentración de bilirrubina total/directa en la muestra puede determinarse mediante medición de la absorbancia antes y después de la oxidación de vanadato. La concentración de bilirrubina directa/total (mg/dl/célula/2-24 h) en el sobrenadante de cultivo se calcula a continuación frente a la curva estándar de calibrador de bilirrubina preparada en IMDM sin rojo fenol, tal como se recomienda por las instrucciones del fabricante. Para evaluar cualquier interferencia, se realiza la evaluación de la conjugación de bilirrubina en medios que incluyen 20-50  $\mu\text{M}$  de bilirrubina y controles celulares, incubados sin bilirrubina. Estas muestras sirven como control negativo para determinar la especificidad y evitar falsa positividad.

### Resultados

Las células ADHLSCLC y células H2Stem son poblaciones de células que pueden derivarse ambas de preparaciones de células hepáticas primarias humanas crioconservadas que se producen usando hígados humanos adultos normales. Sin embargo, el protocolo para su emergencia a partir de la preparación de células hepáticas primarias y posterior procedimiento de expansión en cultivo celular difieren, en particular cuando se hace uso de colágeno (u otro sustrato apropiado) para la adhesión y el crecimiento en condiciones de cultivo celular (véase materiales y procedimientos para más detalles). En el intervalo de 7-12 días después de la colocación en placa, emergen de manera espontánea agrupaciones de células con morfología meso-epitelial, cuboidal, que presentan un citoplasma grande y transparente sin salientes, que desarrollan uniones intercelulares, que muestran inhibición por contacto del crecimiento. Las células H2Stem que tienen morfología meso-epitelial, cuboidal proliferan en agrupaciones o colonias y, aproximadamente 2-3 días después de la emergencia, pueden tripsinarse y pasarse con una densidad de 5000-20000 células/cm<sup>2</sup>. Estas características distinguen las células H2Stem de las células ADHLSCLC grandes, que aparecen más tarde, alargadas descritas en Najimi M *et al.* 2007 (fig. 2A).

Cuando se comparan con células ADHLSCLC que se cultivan en o bien soportes revestidos con CellBind o colágeno (por ejemplo placas, frascos), las células H2Stem crecen con una tasa de proliferación más rápida y pueden identificarse con preferencia del cultivo celular y pueden expandirse. El tiempo de duplicación de la población (PDT) para células ADHLSCLC es aproximadamente 72-96 horas, mientras que las células H2Stem muestran un PDT de 48-72 horas y se expanden rápidamente al menos durante 4-5 pases.

Las células H2Stem son positivas, de acuerdo con otras células progenitoras hepáticas humanas tal como células ADHLSCLC, para una serie de marcadores mesenquimatosos en la superficie celular (incluyendo CD90, CD73, CD29, CD44) o intracelular (tal como vimentina, ASMA), como también para marcadores hepáticos (incluyendo HNF-3B, albúmina y citoqueratina 18), tal como se evalúa mediante citometría de flujo (definiéndose la positividad para un marcador cuando al menos el 60 % de células presenta la característica dada), inmunocitoquímica y/o análisis de RT-PCR. Tanto las células ADHLSCLC como las células H2Stem expresan en nivel muy bajo (es decir menos del 15 % de células sometidas a ensayo, y en su mayor parte por debajo del 10 %, presenta una tinción específica) marcadores de superficie celular para otros linajes de células (hematopoyéticos, epiteliales y/o endoteliales) tal como CD45, CD117, CD31, CD133, y CD326.

Sin embargo, las células H2Stem pueden distinguirse también de células ADHLSCLC mediante la comparación de la presencia de marcadores intracelulares. Por ejemplo, un componente citoesquelético tal como citoqueratina 19 (CK-19; un marcador epitelial de colangiocito) es casi indetectable en células ADHLSCLC y hepatocitos (Najimi M *et al.*, 2007). En células H2Stem (incluso en la etapa inicial cuando emergen en el cultivo celular), CK-19 se encuentra expresada en un porcentaje de células H2Stem comprendido entre el 20 % y el 40 % cuando se evalúan mediante citometría de flujo, una diferencia que no puede definirse como una negatividad y que se reproduce de manera consistente por las preparaciones de células H2Stem. De hecho, cuando se evalúa la expresión de CK-19 mediante inmunocitoquímica (una técnica más sensible generalmente para detectar proteínas intracelulares que la citometría de flujo), es evidente que CK-19 se expresa por una gran mayoría de H2Stem incluso en fases tempranas (figura 2B), proporcionando de ese modo un marcador adicional que puede usarse para distinguir y seguir poblaciones de células H2Stem y progenie de H2Stem a lo largo del proceso para la producción de las mismas en cultivo celular.

La detección de CK-19 puede asociarse con la detección de otras proteínas intracelulares tal como factores de transcripción y en particular de aquéllas asociadas con funciones hepáticas, directamente (mediante RT-PCR o procedimientos a base de anticuerpos) o indirectamente (basándose en la expresión coordinada de genes específicos del hígado). De esta manera, las células H2Stem se han caracterizado como que expresan más fuertemente factores de transcripción como HNF-3b y HNF-4, cuando se compara con células ADHLSCLC. En el nivel intracelular, estos factores de transcripción se encuentran entre los más importantes para la obtención de la

maduración morfológica, fenotípica y funcional de hepatocitos, por ejemplo mediante activación de la expresión de ambas proteínas de suero hepáticas (tal como albúmina y alfa-1-antitripsina) y de enzimas para funciones (no) metabólicas (Snykers S *et al.*, 2009), que pueden detectarse en extractos celulares o directamente en sobrenadantes de cultivo celular para la evaluación de la presencia de células H2Stem.

5 La emergencia de células H2Stem durante la etapa inicial para el proceso para la obtención de células H2Stem también puede seguirse, identificando qué células hepáticas humanas primarias pueden originar agrupaciones de células H2Stem que proliferan, adherentes que tienen una morfología distintiva y que pueden analizarse mediante inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (fig. 3).

10 Las características adicionales que distinguen células ADHLSC y células H2Stem pueden establecerse durante o después de la diferenciación *in vitro* de estas poblaciones de células, en particular hacia células similares a hepatocitos, adherentes. Cuando se compara el proceso de diferenciación de células H2Stem con el de células ADHLSC, las últimas células requieren más tiempo (un mes frente a 1 a 2 semanas para células H2Stem), como también EGF dentro del medio de cultivo celular. Además, la morfología de las células similares a hepatocitos que se generan usando los dos tipos celulares difiere, presentando las células obtenidas a partir de células H2Stem (la progenie de H2Stem también denominada como células H2Screen; véase la figura 1) características más similares a aquéllas de hepatocitos primarios metabólicamente activos. Las células H2Screen adoptan una morfología cuboidal similar a hepatocito con células mono- y binucleadas con granularidad intracelular, apuntando a un aumento de las actividades enzimáticas (fig. 4A).

15 Las actividades metabólicas específicas del hígado de células H2Stem pueden compararse con aquéllas de otras células progenitoras hepáticas adultas (tal como células ADHLSC) mediante medición de la degradación de compuestos que se acumulan en el hígado y que, si se metabolizan de manera ineficaz por los hepatocitos, pueden ser hepatotóxicos y pueden estar asociados con enfermedades hepáticas. Este análisis es de interés no sólo para la evaluación del uso de células para aplicaciones clínicas sino también para el descubrimiento y desarrollo de fármacos en la industria farmacéutica, puesto que la hepatotoxicidad inducida por fármacos es uno de los motivos más importantes para el abandono de fármacos candidatos durante las últimas fases del desarrollo de fármacos. El efecto de la exposición a diferentes inductores de CYP450 sobre las respuestas de expresión génica y actividades enzimáticas específicas para CYP450 se miden con frecuencia en diferentes modelos basándose en células de origen hepático para distinguir entre compuestos potencialmente hepatotóxicos y compuestos non-hepatotóxicos antes de administrar tales compuestos *in vivo*, sin embargo, ninguno de los modelos bajo estudio satisface todos los criterios para la detección temprana, fiable y precisa de compuestos hepatotóxicos (Gerets HH *et al.*, 2012).

20 En particular, CYP3A4 hepática contribuye al metabolismo de casi el 50 % de los fármacos usados habitualmente como también corticosteroides endógenos y exógenos. La enzima CYP3A4 se expresa fuertemente en hepatocitos dentro del hígado adulto y la adquisición de la funcionalidad de CYP3A4 se considera como criterio importante de la diferenciación y maduración hepatogénica. La inmunocitoquímica y RT-PCR ya muestran que la expresión de CYP3A4 es mucho más alta en células H2Stem que en células ADHLSC (es decir, ya antes de cualquier diferenciación específica del hígado), un hallazgo que se confirmó también en el nivel de actividad. Las células H2Stem muestran tal actividad específica en el intervalo de  $10^{-8}$  pMol/célula/4 h, (ya bien por encima del límite de detección en  $10^{-9}$  pMol/célula) sin embargo aumentando en el intervalo de  $10^{-7}$  pMol/célula/4 h después de la diferenciación *in vitro* en células H2Screen, presentando las células ADHLSC una actividad por encima de  $10^{-8}$  pMol/célula/4 h sólo después de la diferenciación (fig. 4B).

25 Esta comparación de actividades metabólicas específicas del hígado entre células H2Stem y células ADHLSC, con o sin diferenciación posterior *in vitro*, específica del hígado, puede realizarse usando otros indicadores de la actividad metabólica que puede evaluarse usando kits comerciales o mediante aplicación de técnicas que se describen en la bibliografía (como actividad enzimática y/o expresión de ARNm específica para CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2E1 o CYP2D6). En particular, una fuerte regulación por incremento en la expresión de CYP1A2, CYP2C9 y CYP2E1 se observó para células H2Stem. Estos hallazgos se confirmaron cuando se comparan células H2Screen con células ADHLSC diferenciadas, y también se extienden para la expresión de genes para otras actividades enzimáticas específicas del hígado (tal como ornitina transcarbamilasa, CYP2D6 o CYP2C19).

30 En el caso de secreción de urea (otra actividad metabólica específica del hígado principal), las células H2Screen parecen que son capaces de sintetizar urea en presencia de sustratos (cloruro de amonio y ornitina) con propiedades metabólicas sustancialmente más altas cuando se comparan con células ADHLSC diferenciadas. Las células H2Screen presentan una mejora de esta actividad que corresponde a más de 1 log y que demuestra la presencia de funcionalidad hepática muy específica e integrada dentro de estas células (fig. 4C).

35 La inmunohistoquímica también confirma que, cuando se compara con células H2Stem, se mantiene una expresión intracelular fuerte de CK-19, CK-18, y de algunos marcadores hepáticos (tal como albúmina, TDO2 y UDP-glucuronosil transferasa), si no aumenta adicionalmente, en células H2Screen, que también presentan la expresión de una proteína transportadora de eflujo principal tal como proteína MRP-2 en la superficie de contacto

célula a célula, una característica de principal importancia para la evaluación de la toxicidad inducida por fármacos relacionada con el polimorfismo del transportador (fig. 4D).

5 Se obtienen pruebas cualitativamente similares cuando se compara la capacidad de las células ADHLSC diferenciadas y células H2Screen para conjuguar bilirrubina, otra actividad biológica específica del hígado debido a la expresión del gen UGT1A1. Las células H2Screen muestran una actividad mucho más alta, posiblemente debido a la expresión más alta y/o aumento de la localización nuclear de factores de transcripción tal como HNF-3b y HNF-4. La actividad de bilirrubina relacionada con UGT1A1 en células ADHLSC diferenciadas se mide en 0,05 mg/dl-0,3 mg/dl (0,5 mg/dl por excepción), que corresponde al 5-35 % (50 % por excepción) de conjugación  
10 después de exposición durante 24 horas. La actividad de bilirrubina relacionada con UGT1A1 en células H2Screen se mide en 0,2 mg/dl-0,6 mg/dl después de exposición durante 24 horas o como el 23-70 % de conjugación. Además, cuando la expresión de UGT1A1 se compara con hepatocitos humanos mediante RT-PCR, ésta alcanza el 10 % del nivel observado en hepatocitos primarios, un nivel particularmente alto cuando se compara con células que se obtienen mediante diferenciación in vitro de otros tipos de células derivadas de  
15 progenitoras hepáticas.

Por tanto, las células H2Stem aparecen como células progenitoras hepáticas adultas novedosas que, cuando se comparan con otras células del mismo tipo (en particular aquéllas producidas mediante un procedimiento más largo, más complejo tal como células ADHLSC), presentan algunas ventajas importantes, inesperadas para  
20 diferentes características (por ejemplo proliferación, expresión de marcadores específicos del tipo celular o actividades enzimáticas específicas del hígado) que las hacen de interés para tanto aplicaciones clínicas como estudios farmaco-toxicológicos.

### 25 **Ejemplo 2: Generación de distintos tipos de progenie de H2Stem como agrupaciones de células tri-dimensionales**

#### Materiales y procedimientos

##### *Generación de células H3Stem a partir de células H2Stem*

30 Las células H3Stem se generan en frascos de cultivo celular de unión ultra-baja mediante suspensión de aproximadamente  $1-10 \times 10^6$  células H2Stem en 15 ml de medio antes de colocarlas en placa en frascos de cultivo celular de unión ultra-baja (75 cm<sup>2</sup>; n.º de cat. 3814; Corning).

35 Las células H3Stem se generan en las placas de microtitulación de 96 pocillos de unión ultra-baja mediante suspensión de 5.000 – 20.000 células H2Stem en 0,1-0,2 ml de medio y se colocan en placa por pocillo en placas de microtitulación de cultivo de 96 pocillos en forma de U/redondos, de unión ultra-baja (n.º de cat. 7007; Corning). Como alternativa, se suspenden 75.000-100.000 células H2Stem en 2,0-3,0 ml de medio y se colocan en placa por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos de unión ultra-baja (n.º de cat. 3471; Corning).

40 El medio de cultivo es por preferencia medio E de Williams complementado con el 9 % de FBS, el 0,9 % de P/S, 1 µM de Dex; 10 µg/ml de INS y 12-25 ng/ml de EGF en ausencia o presencia (12,5 – 50 ng/ml) de HGF. Los medios de cultivo celular comerciales alternativos que pueden usarse en lugar de medio E de Williams son IMDM o DMEM que se complementan tal como se ha indicado anteriormente para el medio E de Williams. Se añade  
45 medio de cultivo celular fresco o se sustituye dos veces a la semana para formatos de frasco y placas/placas de microtitulación de múltiples pocillos, respectivamente. La formación de progenie de H2Stem tridimensional se sigue mediante microscopía de contraste de fases. Las células individuales comienzan a formar estas agrupaciones después de 24 horas y se recogen para la medición de la actividad CYP3A4, para la realización de la inmunohistoquímica o para la generación de células H3Screen-2 en el intervalo de los siguientes 10-25 días,  
50 cuando alcanzan una dimensión superior a 200 µm (pueden obtenerse agrupaciones de células H3Stem con un diámetro hasta 600 µm).

##### *Generación de células H3Screen-1 a partir de células H2Screen*

55 Las células H2Screen que se obtienen tal como se ha descrito en el ejemplo 1, se tripsinizan para la obtención de progenie de H2Stem tri-dimensional mediante mantenimiento de esta suspensión celular en el mismo medio que se usó para diferenciar células H2Stem en células H2Screen y en un sistema de cultivo celular apropiado. Cuando se usó un sistema de cultivo "de gota pendiente", tal como placa de 96 pocillos Gravity<sup>Plus</sup>Plate (Insphero), la mitad del medio se cambia 2-3 veces por semana mediante aspiración de 20 µl y adición de 20 µl  
60 de medio fresco en cada pocillo de la placa. Como alternativa, se colocaron en placa 1 -  $10 \times 10^6$  células H2Screen en frascos de cultivo celular de unión ultra-baja, añadiendo 5 ml de medio de cultivo celular fresco con la misma frecuencia. Por el contrario, se usaron placas de microtitulación de cultivo de 96 pocillos en forma de U/redondos, de unión ultra-baja tal como se ha descrito anteriormente para la generación de células H3Stem.

65 La formación de células H3Screen-1 en estos sistemas de cultivo celular se sigue, se obtiene y se evalúa de manera similar a las células H3Stem.

*Generación de células H3Screen-2 a partir de células H3Stem*

5 Las células H3Stem, obtenidas tras la expansión tal como se ha descrito anteriormente, se centrifugan durante 5 minutos a 224 g con el fin de retirar el medio de expansión. La diferenciación se inicia entonces en los mismos  
frascos de cultivo celular de unión ultra-baja usando medio de cultivo celular HepDif (véase el ejemplo 1),  
añadiendo 5 ml de medio de cultivo celular fresco dos veces a la semana. Por el contrario se usaron placas de  
microtitulación de cultivo de 96 pocillos en forma de U/redondos, de unión ultra-baja tal como se ha descrito  
10 anteriormente usando el mismo medio de cultivo celular para la diferenciación. La diferenciación hepática y la  
actividad CYP3A4 se evaluaron en las agrupaciones de células tri-dimensionales en el intervalo de los siguientes  
10-20 días.

*Generación de células H3Screen-2a y células H3Screen-2b a partir de células H3Screen-2*

15 Las células H3Screen-2a corresponden a células H3Screen-2 que se mantienen en suspensión usando frascos  
de cultivo celular de unión ultra-baja, placas de microtitulación de cultivo de 96 pocillos en forma de U/redondos,  
o un sistema de cultivo "de gota pendiente" y en medio HepDif (véase el ejemplo 1).

20 Las células H3Screen-2b corresponden a células H3Screen-2 que se transfieren a formatos de múltiples pocillos  
diferentes de placas revestidas con colágeno tipo I, BD BioCoat Cellware (con 6, 24 o 48 pocillos). En esta  
condición, se observan hepatocitos poligonales y granulares en el intervalo de 3-4 días a partir de la colocación  
en placa en adelante en medio HepDif (véase el ejemplo 1).

*Generación de células H3Screen-2 a partir de células H2Stem*

25 Las células H3Screen pueden generarse directamente a partir de células H2Stem sin etapa de expansión  
intermedia como células H3Stem. En este caso se suspenden 5000 – 20.000 células H2Stem en 0,1-0,2 ml de  
medio HepDif (véase el ejemplo 1) y se colocan en placa en placas de cultivo de 96 pocillos de unión ultra-baja.  
Como alternativa, se suspenden 75.000-100.000 células H2Stem en 2,0-3,0 ml de medio y se colocan en placa  
30 por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos de unión ultra-baja. Se realizan etapas adicionales de cultivo celular  
como para la generación de células H3Stem a partir de células H2Stem, mantenimiento de las células en el  
medio HepDif y observación de agrupaciones de células H3Screen-2 de dimensión similar y en un periodo de  
tiempo comparable tal como se muestra para agrupaciones de células H3Stem.

35 *Generación de células H3Screen-2c a partir de células H3Stem*

Las células H3Screen-2c corresponden a células H3Stem que se transfieren a diferentes formatos de múltiples  
pocillos de placas revestidas con colágeno tipo I, BD BioCoat Cellware (con 6, 24 o 48 pocillos) y se cultivan en  
medio HepDif (véase el ejemplo 1).

40 *Inmunocitoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) y caracterización morfológica de progenie de H2Stem tri-  
dimensional*

45 El tamaño de agrupaciones de células tri-dimensionales e imágenes se toman mediante microscopio óptico  
(contraste de fases; microscopio Olympus UC30) usando cámara Olympus IX50 y programa Cellsens.

Los diferentes tipos de progenie de H2Stem tri-dimensional se recogen y entonces se fijan durante la noche en  
un 4 % de paraformaldehído (n.º de cat. 43368, Alfa Aesar) a 4 °C, posteriormente se incorporan en agarosa al 2  
% (n.º de cat. 16500, Invitrogen) a 65 °C y entonces en parafina. Cinco secciones de µm de ancho se  
50 desparafinan y se rehidratan en series graduadas de alcohol.

Antes de realizar la inmunohistoquímica se incuban las secciones en solución de ácido cítrico monohidratado (pH  
6,0) a 97 °C durante 90 minutos. La actividad peroxidasa endógena se bloquea mediante incubación de  
portaobjetos en una solución en metanol de peróxido de hidrógeno al 3 % durante 15 minutos. La inmunotinción  
55 no específica se evita mediante incubación de secciones a temperatura ambiente en tampón PBS que contiene  
albúmina de suero bovino al 1 % (BSA, n.º de cat. A2153-50G, Sigma) durante 1 hora.

Las secciones se incuban entonces durante la noche a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos primarios  
diluídos en un 0,1 % de BSA y de acuerdo con las instrucciones del fabricante: albúmina de suero anti-humano  
60 de ratón monoclonal (n.º de cat. A6684, Sigma; para IHC), CYP3A4 anti-humana de ratón monoclonal (n.º de cat.  
SAB1400064, Sigma; para IHC), ornitina carbamoiltransferasa anti-humana de conejo policlonal (n.º de cat.  
HPA000570, Sigma; para IHC), UDP-glucuronosiltransferasa 1A1 anti-humana de conejo policlonal (n.º de cat.  
sc-27415, Santa Cruz; para IHC), MRP-2 (n.º de cat. ab3373, Abcam; para IHC), citoqueratina 19 (CK-19) anti-  
humana de ratón monoclonal (Clone RCK108; M0888, Dako; para IHC), anti-CK19 monoclonal (n.º de cat.  
65 SAB3300018, SIGMA, para IF), anti-CK-18 monoclonal (n.º de cat. SAB3300015, SIGMA; para IF), vimentina  
anti-humana de ratón monoclonal (n.º de cat. 10515, Progen; para IHC), anti-vimentina monoclonal (n.º de cat.

V6630, SIGMA; para IF), factor nuclear 4 de hepatocitos anti-humano (HNF-4) (n.º de cat. sc-8987, Santa Cruz; para IHC), anti-HNF4 monoclonal (n.º de cat. SAB4501409, SIGMA; para IF), anti-HNF3B monoclonal (n.º de cat. SAB2500409, SIGMA; para IF). Los siguientes anticuerpos etiquetados se usaron como anticuerpo secundario para inmunofluorescencia (IF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: IgG anti-ratón de burro conjugada con Alexa Fluor®488 (n.º de cat. 715-545-151, Jackson ImmunoResearch), IgG anti-conejo de burro conjugada con Cy3 (n.º de cat. 711-165-152, Jackson ImmunoResearch). Para la inmunohistoquímica, se usa la tinción a base de peroxidasa de rábano (HRP) para detectar anticuerpos primarios usando Envision IgG-HRP anti-ratón (n.º de cat. K4001, Dakocytomation), IgG-HRP anti-conejo (n.º de cat. K4003, Dakocytomation) o IgG-HRP anti-cabra (n.º de cat. sc-2020, Santa Cruz) y comprimidos de SIGMAFAST™ 3,3'-diaminobenzidina (n.º de cat. D4168, Sigma) como sustrato cromogénico. Los núcleos se contratiñen usando 4,6-diamidino-2-fenilindol (Vectashield®+DAPI, n.º de cat. H-1200, ABCYS) para inmunofluorescencia o con hematoxilina de Mayer (n.º de cat. MHS16, Sigma) para inmunohistoquímica. El análisis se realiza usando un microscopio invertido Olympus IX50 acoplado a una cámara UC30. Las imágenes digitales se adquieren usando Cellsens Software.

#### 15 *Caracterización de progenie de H2Stem tri-dimensional mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western*

Se lisan células (en una concentración de  $5 \times 10^6$  células por ml) en un tampón que contiene 10 mM de HEPES pH 7,4, 80 mM de KCl, 2 mM de EDTA, 15 mM de beta-mercaptoetanol, 0,1 % de Triton X-100 y 1 % de PIC (coctel de inhibidores de proteasas). Los extractos de proteínas se incuban con agitación a 4 °C durante 30 minutos, y entonces se homogeneizan usando Potter Dounce (10 A.R.) en hielo. Los lisados celulares se centrifugan entonces a 4000 g durante 10 minutos para hacer precipitar residuos de células. La concentración de proteínas en el sobrenadante resultante se determina a continuación después del procedimiento de Bradford clásico, usando un kit comercial (Bio-Rad). Los extractos de proteína se separan mediante electroforesis usando SDS-PAGE y entonces se electrotransfiere en una membrana de nitrocelulosa (Amersham, R.U.). La membrana se incuba entonces a temperatura ambiente durante 2 horas en tampón TBS-t (solución salina tamponada con Tris-tween : Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween® 20 0,1 %) que contiene leche descremada (5 % (p/v); Merck). La membrana se incuba entonces a 4 °C con agitación durante la noche en el mismo TBS-t/leche al 5 % sin embargo que contiene el anticuerpo primario de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de que se lavaran tres veces durante 15 minutos con tampón TBS-t, la membrana se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo secundario etiquetado con peroxidasa en el tampón TBS-t/5 % de leche. Después de que se lavaran tres veces durante 15 minutos con tampón TBS-t, se revela la señal de proteína mediante quimioluminiscencia (kit ECL, Amersham Pharmacia Biotech.).

Los siguientes anticuerpos se usan como anticuerpo primario de acuerdo con las instrucciones del fabricante: CYP3A4 anti-humana de conejo policlonal (n.º de cat. AB1254, Chemicon), anti-UGT1A1 anti-conejo policlonal (n.º de cat. 4371, Cell Signaling Technology) y anti-SULT1 (n.º de cat. sc-32928, Santa Cruz).

#### 40 *Caracterización de los genes expresados mediante progenie de H2Stem tri-dimensional usando RT-qPCR*

La progenie de H2Stem tri-dimensional de un pocillo de una placa de 6 pocillos (o de 1 a 10 pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos) se recoge en un tubo de 1,5 ml y se lava con 1 ml de PBS, esperando que las agrupaciones de células caigan al fondo del tubo mediante gravedad, antes de retirar el PBS. Las agrupaciones de células se lisan usando 350 µl de tampón RLT Plus, agitando el tubo durante 30 segundos y rompiendo los esferoides mediante acción mecánica usando un sistema motorizado para hacer girar pistones (cat. W14044, Fisher Scientific) con pistones libres de RNasa (cat. W5290W, Fisher Scientific).

Se extrae ARN total de células usando el kit RNeasy® Plus Mini (n.º de cat. 74134 QIAGEN), después del tratamiento de ADNasa con kit DNA-free™ (n.º de cat. AM1906, Ambion). Se sintetiza la primera cadena de ADNc usando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc de transcriptor (n.º de cat. 04379012001, Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y posteriormente se diluye con agua libre de nucleasa (n.º de cat. AM9938, Invitrogen) para dar ADNc a 10 ng/µl. Las mezclas de amplificación de RT-PCR (20 µl) contienen 0,2 µg de molde de ADNc, 10 µl de 2xTaqman Master Mix (n.º de cat. 4369514, Applied Biosystem) y 1 µl de 20x PrimeTime qPCR assay (IDT). Las muestras se ejecutan por duplicado en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems ViiA™ 7 o cualquier otro ciclador de PCR en tiempo real de Applied Biosystems. Las condiciones del ciclado son tal como sigue: 10 min de activación con polimerasa a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 45 s. Los pares de secuencias de cebador específicos del transcripto génico se obtuvieron de Applied Biosystems tal como se describe en el ejemplo 1.

#### 60 *Caracterización de la progenie de H2Stem tri-dimensional mediante actividades biológicas*

La actividad CYP3A4 de la progenie de H2Stem tri-dimensional puede medirse usando ensayo de luminiscencia con un modo de proceder similar al realizado para células adherentes (véase el ejemplo 1). Hasta cinco agrupaciones de células tri-dimensionales, conteniendo cada una aprox. 20.000 células, se lavan con tampón PBS para retirar medio residual y entonces se transfieren a placas de 48 pocillos de colágeno BD BioCoat™ (n.º de cat. 356505, BD Biosciences). Después una incubación de 4 horas con 200 µl de IMDM (n.º de cat. 21980032,

Invitrogen) que contiene 0,2 µl de luciferina-IPA (n.º de cat. V9002, Promega). La suspensión de células (100 µl de medio) se transfiere a placas de 96 pocillos (n.º de cat. 734-1662, Costar) y se analizan tal como se ha descrito en el ejemplo 1. El medio de cultivo celular que no se ha incubado con las agrupaciones de células tri-dimensionales se usa como control del ruido de fondo.

5

Los ensayos de secreción de urea y conjugación de bilirrubina para someter a prueba la actividad metabólica específica del hígado se realizaron usando agrupaciones de células tri-dimensionales, conteniendo cada una aprox. 100.000 células (equivalente a 5 esferas de células H3Stem o células H3Screen-2a), que se incuban con reactivos adecuados tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1.

10

Se sometió a ensayo la actividad SULT en combinación con UGT1A (es decir, incluyendo UGT1A1 y otras isoformas de UGT1A) usando paracetamol como sustrato para la reacción. Los productos de la glucuronidación y conjugación con sulfato de paracetamol se cuantifican mediante HPLC tal como se describe (Lau G y Crichley J, 1994). En resumen, las células se incuban durante 24 horas con 5 mM de paracetamol (n.º de cat. A7302, Sigma). Tras la incubación, el sobrenadante de medio se centrifuga, se filtra y analiza por medio de UV-HLPC a 254 nm. Se añade 2-acetaminofenol como patrón interno. Los patrones específicos para la cuantificación son paracetamol-sulfato (n.º de cat. UC448, Sigma) y P-acetamidofenil-β-D-glucurónido (n.º de cat. A4438, Sigma). Se aplica la columna Nova-Pak C18 Radial-Pak, 60 Å, 4 µm, 8,0 mm X 100 mm (Waters) como fase estacionaria. La fase móvil consiste en 0,1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 % de ácido acético y 0,75 % de propan-2-ol a pH 3,8 (débito de 1,5 ml/min). Los resultados se expresan como la producción de pmol de glucu- o sulfo-metabolitos por minuto y por mg de proteína. La concentración de proteína se evalúa de acuerdo con el procedimiento Bradford clásico, usando el kit Bio-Rad.

15

20

25

Se determinaron actividades enzimáticas dependientes de CYP mediante CL/EM/EM después de incubar las células con un coctel de sustratos (10 mM de fenacetina, 100 mM de bupropion, 10 mM de diclofenaco y 3 mM de midazolam). Para evaluar la funcionalidad de transportador, las células se incubaron a 37 °C (o a 4 °C para algunos experimentos) en 500 µl de HBSS que contiene sustrato de marcador transportador [<sup>14</sup>C] en 10 µM (0,5 µCi/ml). Se usaron los siguientes sustratos: taurocolato (TC), estrona-3-sulfato (E3S) y 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP). Al final de la incubación se retiraron los sobrenadantes y se lavaron monocapas 3 veces con PBS enfriado en hielo. Entonces se añadieron 300 µl de NaOH 0,1 N en cada pocillo para lisar células. Una alícuota (100 µl) se tomó y se mezcló con 2 ml de agente de centelleo Ultima Gold para la evaluación de la concentración de sustrato de marcador dentro de las células con un contador Tri Carb. La capacidad de inducción de la actividad dependiente de CYP fase I se evidenció después del tratamiento conjunto con rifampicina (10 µM) (CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6) y beta-naftoflavona (25 µM) (CYP1A2) durante tres días.

30

35

La actividad enzimática de carboxilesterasa-1 (CES-1) se midió usando un kit ELISA (n.º de cat. ab109717, Abcam) usando la proteína tomada de cultivos celulares de H2Stem, H3Stem, ADHLSC, usando hepatocitos humanos primarios y HepG2 como controles positivos. El protocolo se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la alfa-antitripsina secretada en medios de cultivo acondicionados de H2Stem y ADHLSC usando un kit ELISA (n.º de cat. ab108799, Abcam), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40

### Resultados

Como característica adicional que distingue células H2Stem y células H2Screen de células ADHLSC no diferenciadas y diferenciadas (u otras células progenitoras hepáticas humanas), estas nuevas poblaciones de células que se describen en el ejemplo 1 proporcionan suspensiones de distintos tipos de agrupaciones de células tri-dimensionales (es decir, progenie de H2Stem tri-dimensional) que comprenden células progenitoras hepáticas o células similares a hepatocitos, dependiendo de las condiciones de cultivo celular.

45

Cuando se mantienen células H2Stem o células H2Screen o bien en sistemas de cultivo de gota pendiente o placas de baja adherencia, se forman rápidamente agrupaciones de células tri-dimensionales con un diámetro de 50-100 µm en el intervalo de los primeros 2-4 días, alcanzando un tamaño de más de 300 µm e incluso hasta 600 µm después de 15-25 días (fig. 5 y 6). Estas agrupaciones de células, que presentan algunos estromas de soporte entre las células, pueden mantenerse en cultivo celular al menos hasta 1-2 meses. Por el contrario, las células ADHLSC (o bien no diferenciadas o diferenciadas, cultivados en las mismas condiciones) proporcionan en la mayoría de los casos agregados de 20 µm de tamaño, esencialmente bi-dimensionales que no presentan las actividades metabólicas específicas del hígado fuertes que se observan para la progenie de H2Stem que forman agrupaciones de células tri-dimensionales. La progenie de H2Stem tri-dimensional que comprende células o bien no diferenciadas (células H3Stem) o diferenciadas (células H3Screen) puede generarse en sistemas de cultivo de gota pendiente, frascos de cultivo celular de unión ultra-baja, placas o placas de microtitulación con pocillos en forma de U/redondos. Estos recipientes se desarrollaron para el cultivo de cuerpos embrioides u otras células como esferoides en suspensión. La superficie expuesta al cultivo celular está cubierta mediante una capa de hidrogel unida de manera covalente que es hidrofílica, está cargada de manera neutra e inhibe la inmovilización celular (Saleh F. *et al.* 2012).

55

60

65

Dependiendo del uso posterior, el contenido de un pocillo, placa o frasco individual (o el resultado de la combinación del contenido de pocillos en una placa de microtitulación con el fin de obtener 5, 10 o más esferas de progenie de H2Stem tri-dimensional), o cada agrupación a modo de esfera puede usarse o someterse a estudio separadamente, en el mismo pocillo o de otra manera, permitiendo una evaluación de alto rendimiento de efectos de compuestos o condición de cultivo celular en paralelo con respecto a otros criterios (tal como actividad enzimática o expresión de gene / proteína) sobre una progenie de H2Stem tri-dimensional dada.

Las células H3Stem son una progenie de H2Stem tri-dimensional que está constituida principalmente por células progenitoras hepáticas y puede obtenerse mediante cultivo de células H2Stem. La progenie de H2Stem tri-dimensional contiene células hepato-activas después de la incubación en un medio apropiado (tal como en el caso de células H3Screen-1 y células H3Screen-2). En particular, las células H3Screen pueden mantenerse como progenie de H2Stem tri-dimensional que o bien son adherentes (en el caso de células H3Screen-2b y células H3Screen-2c) o están en suspensión (en el caso de células H3Screen-2a y células H3Screen-1), dependiendo de las condiciones de cultivo celular, es decir, si las condiciones para la generación de estos tipos diferentes de progenie de H2Stem tri-dimensional se aplican en una secuencia específica o de manera simultánea. A nivel morfológico y fenotípico, la progenie de H2Stem tri-dimensional se parece a una estructura de micro-hígado que consiste en una estructura de estroma de soporte y una masa de células hepáticas internas (fig. 5). El uso de la placa de microtitulación de 96 pocillos en forma de U/redondos da como resultado una progenie de H2Stem tri-dimensional más normalizada, que tiene un tamaño más uniforme y una generación más controlada de las agrupaciones de células en cada pocillo. De hecho, la progenie de H2Stem que se transfiere a tales sistemas para el cultivo celular se agrega rápidamente en una agrupación de células individual, similar a esferas que puede contener más de 100000 células (fig. 5D y 6).

La progenie de H2Stem tri-dimensional expresa todavía marcadores que se identifican en células H2Stem tal como un marcador mesenquimatoso como vimentina y un marcador hepático tal como albúmina. Además, la progenie de H2Stem tri-dimensional generalmente presenta niveles de expresión más altos de principales actividades metabólicas específicas del hígado, directamente (como CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1, ornitina transcarbamilasa y UGT1A1), o indirectamente (para factores de transcripción tal como HNF-3b y HNF-4), cuando se compara no sólo con células ADHLSC sino también con células H2Stem y células H2Screen. Estas observaciones sugieren que la progenie de H2Stem tri-dimensional puede reproducir mucho mejor no sólo la organización estructural tri-dimensional sino también las funcionalidades que los hepatocitos presentan *in vivo*. Cuando se analizan mediante inmunohistoquímica, las células H3Screen-1 muestran fuerte expresión de albúmina, CYP3A4, ornitina transcarbamilasa (OTC; una enzima de ciclo de urea) y UDP-glucuronosil transferasa 1A1 (UGT1A1; la enzima para la conjugación de bilirrubina), junto con fuerte expresión de CK-19 y CK-18.

Al nivel de la actividad enzimática, la actividad CYP3A4 en la progenie de H2Stem tri-dimensional que comprende células similares a hepatocitos se midió en comparación con hepatocitos primarios y células H2Stem y células H2Screen. Cuando se comparan los valores absolutos (fig. 7A), la actividad CYP3A4 ya significativamente más alta de células H2Stem, cuando se compara con células ADHLSC antes o después de la diferenciación (véase el ejemplo 1 y figura 4B), se alcanza ya por las células H3Stem y aumenta adicionalmente en las células H3Screen, tal como células H3Screen-2a. Estos valores, cuando se definen en base al número de células, indican una actividad CYP3A4 en el intervalo de  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$  pmol/agrupación de células de células H3Screen-2a, que corresponde a un intervalo de  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  pmol/célula (dependiendo del número total y densidad de células), obteniendo de ese modo al menos una mejora adicional de un log cuando se compara con células H2Screen. Un valor de este tipo está bien por encima de los niveles de actividad CYP3A4 que se miden en células ADHLSC diferenciadas, y aproximándose al nivel que se mide en hepatocitos primarios.

La validación adicional de las actividades metabólicas específicas del hígado de los tipos diferentes de células H3Screen puede realizarse de manera similar a lo que se ha descrito en el ejemplo 1 para células H2Stem y células H2Screen, tal como secreción de urea (véase la figura 4). Como alternativa, pueden evaluarse otros indicadores de actividad metabólica usando kits comerciales o mediante aplicación de técnicas que se han descrito en la bibliografía para determinar el nivel de ARNm y/o expresión de proteína para marcadores relevantes y/o de actividad enzimática (por ejemplo en relación a metabolización de compuestos específica de CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 o CYP2D6).

Además, la actividad enzimática significativamente más alta se midió en células H3Screen (y en particular, células H3Screen-2a y -2b) cuando se compara con células H2Stem o células H2Screen después de la inducción con rifampicina y beta-naftoflavona (un ensayo para la evaluación de los efectos medibles de interacciones fármaco-fármaco), que da como resultado un factor de multiplicación de la inducción de 36,22x para actividad CYP1A2, 93,71x para actividad CYP2B6, 2,13x para actividad CYP2C9 y 31,23x para actividad CYP3A4.

Las células H3Stem y células H3Screen también muestran expresión y actividad de proteína UGT1A y SULT sustancial (fig. 7B y C), aproximándose también en este caso a los niveles que se miden en hepatocitos primarios, es decir el 10 % hasta casi el 100 %. Esta capacidad de glucuronidación extensiva no sólo es de importancia principal para el desarrollo de modelos de selección toxicológica sino que también revela un

potencial de aplicación clínica de estas células novedosas para, por ejemplo, el síndrome de Crigler-Najjar. Las células H3Screen pueden además sintetizar urea en presencia de sustratos (cloruro de amonio y ornitina), con aumento o acumulación sustancial de la producción de urea con respecto al tiempo, que confirma su capacidad metabólica extensiva.

5

La funcionalidad de transportadores de absorción, polipéptido que co-transportan taurocolato de sodio (NTCP), polipéptidos que transportan aniones orgánicos (OATP, tal como OATP1B1 y OATP1B3) y transportadores de cationes orgánicos (OCT (OCT1 y 2) se evaluó mediante medición de la absorción de taurocolato, estrona-3-sulfato o MPP. Ambas células H3Stem y H3Screen-2a mostraron un aumento de la absorción de tales compuestos durante 15-60 minutos (fig. 7D). Además, ambas células H3Stem y células H2Stem presentan actividades específicas del hígado como CES1 (carboxilasa hepática) que no sólo son superiores a células ADHLSC o una línea celular usada comúnmente como HepG2, sino que se aproximan también a la detectada *in vitro* para hepatocitos humanos primarios (fig. 8A). De manera similar, la secreción de alfa-1-antitripsina mediante células H2Stem es considerablemente superior que la observada para células ADHLSC (fig. 8B), una característica adicional que puede evaluarse posteriormente en células H3Stem y células H3Screen. Estas pruebas confirman la presencia de absorción activa y metabolización de compuestos específicos en células H3Stem y células H3Screen que pueden aprovecharse para someter a prueba fármacos candidatos.

10

15

20

25

Por tanto, las células H2Stem pueden usarse para proporcionar progenie de H2Stem que puede mantenerse como agrupaciones de células tri-dimensionales (progenie de H2Stem tri-dimensional) que comprenden células progenitoras hepáticas o células hepato-activas, crecen de manera eficaz en condiciones de cultivo celular, y son útiles para proporcionar células metabólicamente activas y/o en proliferación. Las características relacionadas con el metabolismo y proliferación pueden combinarse con otras características (tal como la presencia/ausencia de marcadores de superficie específicos del tipo celular o actividad, el diámetro, el tipo de estructura estromal u otras actividades biológicas) para la determinación de qué tipo de progenie de H2Stem tri-dimensional como se ha identificado anteriormente (o un sub-tipo adicional que puede determinarse funcionalmente o morfológicamente) tiene el perfil funcional, morfológico o antigénico más apropiado para un uso dado.

30

Por ejemplo, un intervalo específico de diámetros (que corresponden a un número promedio de células y cantidad de proteína/ADN), un proceso que combina o no la diferenciación *in vitro* (véase la figura 1 y 6), la transformación con vectores para la expresión de proteínas recombinantes, y/o un perfil antigénico específico puede preferirse cuando la progenie de H2Stem tri-dimensional está destinada a la administración *in vivo* (por ejemplo mediante inyección intraportal o implante intra/extra-hepático, con o sin tratamiento preliminar cualquiera con tripsina, dentro o no de un dispositivo o una matriz biocompatible).

35

40

Como alternativa, la progenie de H2Stem tri-dimensional mayor que se genera en suspensión o bien a partir de células H2Screen (células H3Screen-1) o células H3Stem (células H3Screen-2a o células H3Screen-2b) puede ser más apropiada para usos *in vitro* que implican la exposición a virus que seleccionan como diana al hígado, la transformación con vectores para la expresión de proteínas recombinantes y/o la exposición a un panel de compuestos. Estos experimentos pueden proporcionar información relevante de cómo un modelo de este tipo permitiría la expresión de manera eficiente de proteínas virales o humanas, o la evaluación de la eficacia terapéutica, el metabolismo, la estabilidad y/o la toxicidad del compuesto sobre el metabolismo hepático, en particular para la selección y prueba preclínicas farmacológicas o toxicológicas.

45

### **Ejemplo 3: Características moleculares que caracterizan células H2Stem**

#### Materiales y procedimientos

50

#### *Análisis proteómicos de células ADHLSC y células H2Stem*

55

El análisis proteómico se realizó en geles bi-dimensionales (2D) usando sistema Ettan™ DIGE (2D-DIGE; GE Healthcare Life Sciences) tal como se ha descrito anteriormente (Vanheel A *et al.*, 2012 [ENREF 35](#)) [ENREF 29](#) con algunas adaptaciones minoritarias. En resumen, se prepararon sedimentos celulares mediante recogida de células en cultivos con el 95 % de confluencia, recuento y centrifugación a 300 g durante 5 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con 10 ml (por  $5 \times 10^6$  células) de tampón de lavado enfriado con hielo que se prepara usando 45 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 5 ml de solución de EDTA (50 mM; n.º de cat. 17-1324-01, GE Healthcare) y 1 comprimido de coctel de inhibidores de proteasa (cOmplete; n.º de cat. 11873580001, Roche Applied Sciences). Tras la homogeneización, las células se lavaron y se centrifugaron dos veces en 1 ml de tampón de lavado enfriado con hielo por  $5 \times 10^6$  células. Finalmente, el sobrenadante se retiró y los sedimentos celulares se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

60

65

Después de la determinación de la concentración de proteínas en los extractos celulares, se realizó el etiquetado mínimo con colorantes de éster N-hidroxisuccinimidílico Cy2, Cy3 y Cy5 (GE Healthcare Life Sciences) tal como se describe por el fabricante. Los geles 2D-DIGE etiquetados con colorante Cy se escanearon en el dispositivo de obtención de imágenes Ettan DIGE Imager (GE Healthcare Life Sciences). Las imágenes de gel de todos los tres colorantes Cy se cargaron en el software DeCyder 7.0 (GE Healthcare Life Sciences) y se analizaron.

*Análisis de componente principal (PCA)*

5 La significancia estadística de la variación en abundancia dentro de un grupo con respecto a la magnitud de cambio entre grupos se calculó usando la prueba de la t de Student y el análisis de la varianza (ANOVA). Los puntos presentes en un 70 % de las imágenes de gel, y con un ANOVA estadísticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) se consideraron para análisis posteriores. El análisis de componente principal (PCA) se realizó usando el módulo de análisis de datos extendidos (EDA) DeCyder (GE Healthcare). La intensidad de fluorescencia de cada punto se normaliza con respecto a este patrón interno, haciendo una comparación entre posibles geles. Este proceso se realiza mediante el software DeCyder (GE Healthcare).

*Detección de células a base de proteína*

15 Se realizaron citometría de flujo o inmunotransferencias tipo Western en una selección de biomarcadores de superficie potenciales que se identificaron mediante análisis proteómico. Se usaron el citómetro FACSCANTO y el software FACSDiva (BD biosciences). Se incubaron las células después de la fijación con anticuerpos primarios CD140b anti-humano de ratón PE (BD Pharmingen; n.º de cat. 558821) y SUSD2 anti-humano PE (antígenos W5C5 y W3D5, n.º de cat. 327406 y 327506, BioLegend) antes del análisis. La viabilidad se midió usando 7AAD (n.º de cat. 559925, BD Pharmingen). Para el análisis de inmunotransferencia tipo Western se usó un anticuerpo anti-beta-actina comercial como control de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para citometría de flujo, los porcentajes de células positivas se normalizaron con un 3 % de positividad de isotipo de control apropiado.

Resultados

25 Los ejemplos 1 y 2 presentan datos experimentales sobre un primera serie de características moleculares o enzimáticas que pueden permitir la distinción de células H2Stem y progenie de H2Stem de otros tipos celulares usando productos disponibles comercialmente (anticuerpos, cebadores para PCR y/o kits). Sin embargo puede realizarse una caracterización cualitativa y cuantitativa más general de células H2Stem y progenie de H2Stem mediante diferentes tecnologías para analizar ampliamente el transcriptoma, lipidoma, metaboloma y/o proteoma de estas células. Entonces, mediante comparación del conjunto de resultados entre sí o con datos similares obtenidos de distintas poblaciones de células (por ejemplo diferentes preparaciones de células H2Stem, progenie de H2Stem, hepatocitos humanos primarios o células ADHLSC) puede establecerse un perfil biológico más preciso de células H2Stem y progenie de H2Stem mediante la identificación de biomarcador(es) que puede ayudar a distinguir entre diferentes poblaciones de células.

40 Como un primer enfoque, el proteoma de células ADHLSC y células H2Stem se comparó mediante extracción del contenido de proteína total de cultivos en proliferación de estas células y sometidos a análisis de ge bi-dimENSIONAL para identificar cambios en la expresión, producción y/o modificación de proteínas. Los puntos diferenciales se recogieron por medio de análisis de expresión diferencial y se cuantificaron mediante ANOVA de 1 vía con el fin de realizar un análisis de componente principal (PCA), un procedimiento estadístico de múltiples variantes no supervisado usado para analizar la variabilidad entre grupos experimentales. Un PCA se realizó con todos los puntos relevantes para ANOVA 0.05, conduciendo a dos agrupaciones distintas de puntos que sugerirían distinto perfil de biomarcadores (además de características funcionales) entre distintas preparaciones de las dos poblaciones de células (fig. 9).

50 Pueden realizarse análisis más en profundidad de estos puntos diferenciales mediante secuenciación de proteínas usando espectrometría de masa para la identificación real de las proteínas relevantes y entonces para la confirmación de estas pruebas con otros productos tecnológicos y comerciales (por ejemplo usando anticuerpos en inmunotransferencia tipo Western o citometría de flujo, cebadores para RT-PCR). Como alternativa, las tecnologías a base de matriz y otros enfoques que proporcionan grandes paneles de agentes de detección específicos de genes (que son cebadores, anticuerpos etiquetados o lectinas) pueden permitir la comparación de la cantidad de proteínas específicas (agrupadas mediante actividad, localización u otros criterios) en distintas muestras y entonces la restricción del número de proteínas que merecen un análisis más detallado en diferentes poblaciones de células y/o condiciones de cultivo celular.

60 Cuando los datos de análisis inmunológicos, transcriptómicos y/o glicómicos se combinan, a información adicional sobre las células H2Stem o progenie de H2Stem puede sugerir características de estas células que pueden ser de interés potencial para la validación posterior (incluyendo usos médicos, efectos paracrinicos e interacciones con otras células, matriz extracelular u otros efectores biológicos). Un enfoque de este tipo puede implicar la comparación con otras poblaciones de células (por ejemplo hepatocitos humanos primarios, diferentes preparaciones de células H2Stem o diferente progenie de H2Stem, mantenida como células adherentes o agrupaciones de células tri-dimensionales) como también materiales biológicos derivados de tales poblaciones de células (tal como medio acondicionado o fracciones celulares o de proteínas específicas).

65

Las diferentes tecnologías permiten obtener datos preliminares sobre la representación excesiva o insuficiente de proteínas específicas en tales materiales biológicos de células H2Stem y distintos tipos de progenie de H2Stem y en comparación no sólo con células ADHLSC sino también con poblaciones de células progenitoras hepáticas adultas o incluso hepatocitos humanos primarios. Estas pruebas sobre la representación excesiva o insuficiente de proteínas específicas en distintas poblaciones de células pueden usarse para diferentes aplicaciones *in vivo* y/o *in vitro* que requieren establecer la calidad y/o la cantidad de poblaciones de células progenitoras hepáticas adultas en general, y de células H2Stem (o de uno o más tipos de progenie de H2Stem) en particular, usando biomarcadores validados de manera apropiada en la etapa inicial de su proceso de producción y en fases posteriores (tal como se define en la descripción detallada anteriormente).

Los enfoques preferentes para determinar tales biomarcadores son aquéllos que pueden validarse sin la limitación debido al bajo rendimiento o gran cantidad de células que han de someterse a prueba y que han de destruirse. Por tanto, estudios adicionales pueden focalizarse en biomarcadores que puedan evaluarse en el sobrenadante de medio de cultivo celular y/o mediante citometría de flujo. En este alcance, la abundancia de proteínas puede evaluarse inicialmente en células H2Stem y células ADHLSC usando las técnicas de electroforesis en gel bi-dimensional (2D). Las proteínas que se secretan en la superficie celular y/o halladas en el sobrenadante de cultivo celular se tiñen previamente para las dos poblaciones de células usando distintas sondas fluorescentes, o se aíslan en preparaciones de proteínas enriquecidas de manera específica usando biotilación y cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando el kit de aislamiento de proteínas de superficie celular Pierce, Thermo scientific). En paralelo, los extractos de proteína total y otros controles/patrones internos se preparan también para cada población de células. Las muestras se aplican entonces a geles para separar proteínas mediante electroforesis de gel 2D. Las técnicas bioinformáticas y de obtención de imágenes se usan entonces para comparar la abundancia de proteínas de superficie celular y/o secretadas en los geles y entonces se recogen los puntos interesantes (para los que se detecta una diferencia estadísticamente significativa en la abundancia entre las poblaciones de células) del gel y se digieren usando tripsina en el alcance de la identificación de la proteína en tal punto mediante espectrometría de masa.

Entre las proteínas que se han identificado como expresadas diferencialmente entre células H2Stem y células ADHLSC usando tales procedimientos, se ha encontrado que la proteína que contiene dominio Sushi 2 (SUSD2) y cadena beta del fibrinógeno (FGB) u otras proteínas secretadas relacionadas con la coagulación se expresan fuertemente en células H2Stem cuando se compara con las células ADHLSC y por tanto puede ser de interés como biomarcadores (separadamente o en combinación) para células H2Stem y progenie de H2Stem.

Incluso si la función biológica SUSD2 de SUSD2 no se ha establecido totalmente hasta ahora, la bibliografía proporciona alguna información relevante sobre esta proteína de superficie celular que tiene un gran dominio extracelular. Esta proteína se ha identificado en muchos estudios comparando genes y/o expresión de proteínas y, por ejemplo, se ha encontrado sobre-expresada inmediatamente después de una hepatectomía parcial (White P *et al.*, 2005). SUSD2 y la correspondiente proteína de ratón (SVS-1) parece que afectan a actividades de células cancerígenas *in vitro* o modelos animales mediante la alteración de su interacción con la matriz extracelular, al menos cuando se somete a prueba usando moléculas naturales (tal como fibronectina o galectina-1) o sintéticas (tal como Matrigel) (Sugahara T *et al.*, 2007; Watson A *et al.*, 2013). Finalmente, SUSD2 se ha identificado como que contiene epítomos de superficie celular (W5C5, W3D5) que se definen como que caracterizan células madre mesenquimatosas de médula ósea humana, endometrio, cartílago y otros tejidos (Sivasubramaniyan K *et al.*, 2013; Benz K *et al.*, 2013; Masuda H *et al.*, 2012; Pilz G *et al.*, 2011; Bühring HJ *et al.*, 2007).

El hallazgo inicial que hizo uso de electroforesis en gel 2D sobre la expresión de SUSD2 mucho más fuerte en células H2Stem se confirmó usando un anticuerpo comercial (SUSD2 anti-humano purificado; n.º de cat. 327401, Biolegend) frente a SUSD2 humano en inmunotransferencia tipo Western (fig. 10A) y en inmunofluorescencia, usando un microscopio confocal. El dominio extracelular SUSD2 puede estar presente también en el medio de cultivo celular como una proteína soluble y puede identificarse junto con proteínas secretadas (tal como FGB, CES1 o alfa-1-antitripsina y su correspondiente actividad) que pueden usarse como biomarcadores secretados para la caracterización de células H2Stem y progenie de H2Stem específica durante su emergencia y producción, o para la identificación de características que sugerirían usos específicos *in vitro* y/o *in vivo*.

De manera interesante, algunas otras proteínas de superficie se han caracterizado como que se expresan más por células ADHLSC que por células H2Stem, sugiriendo un enfoque alternativo para la caracterización de células H2Stem y progenie de H2Stem específica durante su emergencia y producción. Por ejemplo, CD140b, con frecuencia citado entre los marcadores que caracterizan las células madre mesenquimatosas, parece que tiene un perfil de expresión opuesto al de SUSD2 que puede determinarse mediante citometría de flujo. De hecho, tal enfoque puede ser complementario y puede combinarse con análisis de inmunotransferencia tipo Western para mostrar cómo de fuerte se expresa SUSD2 en la mayoría de las células H2Stem, y cómo la expresión de SUSD2 es mucho menor en un porcentaje mucho menos de células ADHLSC (fig. 10B y C). Esta combinación de positividad/negatividad de biomarcadores, junto con características funcionales, permiten distinguir adicionalmente células H2Stem de células ADHLSC, como también células madre mesenquimatosas descritas anteriormente (Benz K *et al.*, 2013) que no presentan marcadores hepáticos o actividades específicas

del hígado.

## REFERENCIAS

- 5 Allameh A y Kazemnejad S, *Clin Biochem* (2012). 45: 385-96.  
 Azuma H *et al.*, *Hepatology* (2003). 37: 1385-94.  
 Baudoin R *et al.*, *Xenobiotica* (2013). 43:140-52.  
 Benz K *et al.*, *J Transl Med* (2013). 11:27  
 Bühring HJ *et al.*, *Ann N Y Acad Sci* (2007). 1106:262-71.
- 10 Dan YY, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 11-23.  
 Darwiche H y Petersen BE, *Prog Mol Biol Transl Sci* (2010). 97: 229-49.  
 Gerets HH *et al.*, *Cell Biol Toxicol* (2012). 28: 69-87.  
 Gomez-Lechon MJ *et al.*, *Methods Mol Biol* (2012). 806: 87-97.  
 Halladay JS *et al.*, *J Pharmacol Toxicol Methods* (2012). 66: 270-5.
- 15 Herrera MB *et al.*, *Stem Cells* (2006). 24: 2840-50.  
 Hoffmann SA *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2012). 109: 3172-81.  
 Hook LA, *Drug Discov Today* (2012). 17: 336-42.  
 Khuu DN *et al.*, *Cell Transplant* (2011). 20: 287-302.  
 Lau G y Crichley J, *J Pharm Biomed Anal* (1994). 12: 1563-72.
- 20 Lu Y *et al.*, *Biotechnol Bioeng* (2012). 109: 595-604.  
 Lubberstedt M *et al.*, *J Pharmacol Toxicol Methods* (2011). 63: 59-68.  
 Massie I *et al.*, *Tissue Eng Part C Methods* (2011). 17: 765-74.  
 Masuda H *et al.*, *Cell Transplant* (2012). 21: 2201-14.  
 Meng Q, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (2010). 6: 733-46.
- 25 Mitaka T y Ooe H, *Drug Metab Rev* (2010). 42: 472-81.  
 Miyazaki M *et al.*, *Stem Células* (2007). 25: 2855-63.  
 Najimi M *et al.*, *Cell Transplant* (2007). 16: 717-28.  
 Parveen N *et al.*, *Curr Pharm Biotechnol* (2011). 12: 226-30.  
 Pilz G *et al.*, *Stem Cells Dev* (2011). 20: 635-46.
- 30 Russo FP y Parola M, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* (2012). 26: 35-45.  
 Sahin MB *et al.*, *Liver Transpl* (2008). 14: 333-45.  
 Saito R *et al.*, *Artif Organs* (2011). 35: 80-3.  
 Saleh F. *et al.* en "Progenitor Cells" en *Meth. Mol. Biol.* (2012). 916: 31-45.  
 Santamaria E *et al.*, *Methods Mol Biol* (2012). 909: 165-80.
- 35 Scheers I *et al.*, *Cell Transplant* (2012). 21: 2241-55.  
 Schmelzer E *et al.*, *J Exp Med* (2007). 204: 1973-87.  
 Seoung Woo Lee MD *et al.*, *Korean J Nephrol* (2010). 29: 260-4.  
 Shiojiri N y Nitou M, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 3-10.  
 Sivasubramaniyan K *et al.*, *Stem Cells Dev* (2013). 2: 1944-54.
- 40 Slany A *et al.*, *J Proteome Res* (2010). 9: 6-21.  
 Smith CM *et al.*, *J Pharm Sci* (2012). 101: 3989-4002.  
 Snykers S *et al.*, *Stem Cells* (2009). 27:577-605.  
 Sokal EM, *Cell Prolif* (2011). 44 Suppl 1: 39-43.  
 Soto-Gutierrez A *et al.*, *Cell Transplant* (2010). 19: 815-22.
- 45 Sugahara T *et al.*, *Cancer Sci* (2007). 98: 900-8.  
 Tanaka M y Miyajima A, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 25-32.  
 Torres DM y Harrison SA, *Hepatology* (2012). 56: 2013-5.  
 Tostoes RM *et al.*, *Hepatology* (2012). 55: 1227-36.  
 Vanheel A *et al.*, *PLoS One* (2012). 7: e35544.
- 50 Wang C *et al.*, *Hepatology* (2012). 55: 108-20.  
 Watson A *et al.*, *Mol Cancer Res* (2013) 11: 74-85.  
 White P *et al.*, *J Biol Chem* (2005). 280: 3715-22.  
 Wu X *et al.*, *PLoS Pathog* (2012). 8: e1002617.  
 Yu J *et al.*, *PLoS One* (2012). 7: e35230.
- 55 Zhu C *et al.*, *J Tissue Eng Regen Med* (2013). 7: 757-66.

## REIVINDICACIONES

1. Una población de células humanas aislada que comprende al menos el 60 % de células progenitoras hepáticas adultas humanas, caracterizada porque dichas células se miden positivas para:

- (a) al menos un marcador hepático seleccionado de albúmina, HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 y CYP3A4;
- (b) al menos un marcador mesenquimatoso seleccionado de vimentina, CD90, CD73, CD44 y CD29;
- (c) al menos una actividad específica del hígado seleccionada de secreción de urea, conjugación de bilirrubina, secreción de alfa-1-antitripsina y actividad CYP3A4;
- (d) proteína que contiene dominio Sushi 2 (SUSD2);
- (e) citoqueratina-19 (CK-19);
- (f) citoqueratina-18 (CK-18) y/o alfa actina de músculo liso (ASMA); y
- (g) al menos una actividad específica del hígado seleccionada de actividad sulfotransferasa, actividad triptófano-2,3-dioxigenasa, actividad carboxilasa hepática, metabolismo de amoníaco y almacenamiento de glucógeno,

en la que dichas células se miden negativas para uno o más de CD140b, CD45, CD117, CD31, CD133 y CD326, y en la que dichas células tienen una morfología meso-epitelial cuboidal.

2. Población de células humanas aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas células son capaces de formar agrupaciones de células tri-dimensionales en suspensión.

3. La población de células humanas aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dichas células progenitoras hepáticas adultas humanas se miden:

- (a) positivas para albúmina, vimentina, CD90, CD73, secreción de urea, conjugación de bilirrubina, secreción de alfa-1-antitripsina, actividad CYP3A4, proteína que contiene dominio Sushi 2, citoqueratina-19 y actividad carboxilasa hepática; y
- (b) negativas para CD140b.

4. La población de células humanas aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que puede obtenerse mediante aislamiento de una población de células humanas con una morfología meso-epitelial cuboidal después de cultivar células hepáticas primarias obtenidas de un hígado adulto humano o parte del mismo en un medio de cultivo en un soporte que permite la adherencia y el crecimiento de dichas células y la emergencia de células con morfología meso-epitelial cuboidal, pasando dichas células con morfología meso-epitelial cuboidal al menos una vez en dicho medio de cultivo, obteniendo de ese modo una población de células humanas que mantienen una morfología meso-epitelial cuboidal.

5. La población de células humanas aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende entre el 60 % y el 99 % o entre el 70 % o el 90 % de dichas células progenitoras hepáticas adultas humanas.

6. La población de células humanas aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la población presenta actividad dependiente de CYP fase I inducible y absorción de al menos uno de taurocolato, estrona-3-sulfato y 1-metil-4-fenilpiridinio.

7. Un procedimiento para la obtención de la población de células humanas aislada según la reivindicación 1 que comprende:

- (a) disociar hígado adulto humano o una parte del mismo para formar una población de células hepáticas primarias;
- (b) generar una preparación de la población de células hepáticas primarias de (a);
- (c) cultivar las células comprendidas en la preparación de (b) en un medio de cultivo en un soporte que permite la adherencia y el crecimiento de las células en el mismo y la emergencia de una población de células que tienen morfología meso-epitelial cuboidal;
- (d) pasar las células de (c) que tienen morfología meso-epitelial cuboidal al menos una vez en dicho medio de cultivo de la etapa (c); y
- (e) aislar una población de células obtenidas tras el pase de la etapa (d) que mantienen una morfología meso-epitelial cuboidal, que son positivas para al menos un marcador hepático y al menos un marcador mesenquimatoso y que tienen al menos una actividad específica del hígado.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la población de células humanas de la etapa (e) se mantiene en condiciones de cultivo celular que permiten la formación de agrupaciones de células tri-dimensionales en suspensión.

9. Una composición que comprende la población de células humanas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 5 10. La población de células humanas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática.
- 10 11. La población de células humanas o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad hepática es un error congénito del metabolismo del hígado, un trastorno de la coagulación de la sangre hereditario, colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1 / 2 / 3, deficiencia de alfa 1-antitripsina, defecto de transportadores de células hepáticas, porfiria, hígado graso u otra enfermedad hepática fibrótica, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad degenerativa hepática o insuficiencia hepática aguda o crónica.
- 15 12. Un procedimiento para la evaluación de la eficacia, el metabolismo, la estabilidad y/o la toxicidad de uno o más componentes exógenos, comprendiendo dicho procedimiento:
- 20 (a) proporcionar la población de células humanas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición según la reivindicación 9;
- (b) exponer dicha población de células humanas, dicha composición, a uno o más componentes exógenos seleccionados de compuestos químicos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, azúcares, metales, sales, virus, bacterias y células; y
- 25 (c) detectar los efectos de dicho uno o más componentes exógenos sobre dicha población de células humanas, dicha composición, y/o detectar la presencia, localización o modificación de dicho uno o más componentes exógenos después de la exposición a dicha población de células humanas, dicha composición.
- 30 13. Uso de una población de células humanas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición según la reivindicación 9, para la evaluación de la eficacia, el metabolismo, la estabilidad y/o la toxicidad de uno o más componentes exógenos seleccionados de compuestos químicos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, azúcares, metales, sales, virus, bacterias y células.
- 35 14. Un kit que comprende una población de células humanas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición según la reivindicación 9, en el que dicho kit comprende además uno o más viales que contienen dicha población de células humanas, o dicha composición, y uno o más de los siguientes elementos: dispositivos, materiales desechables, soluciones, productos químicos, productos biológicos y/o instrucciones para el uso de elementos de dicho kit.

Fig. 1

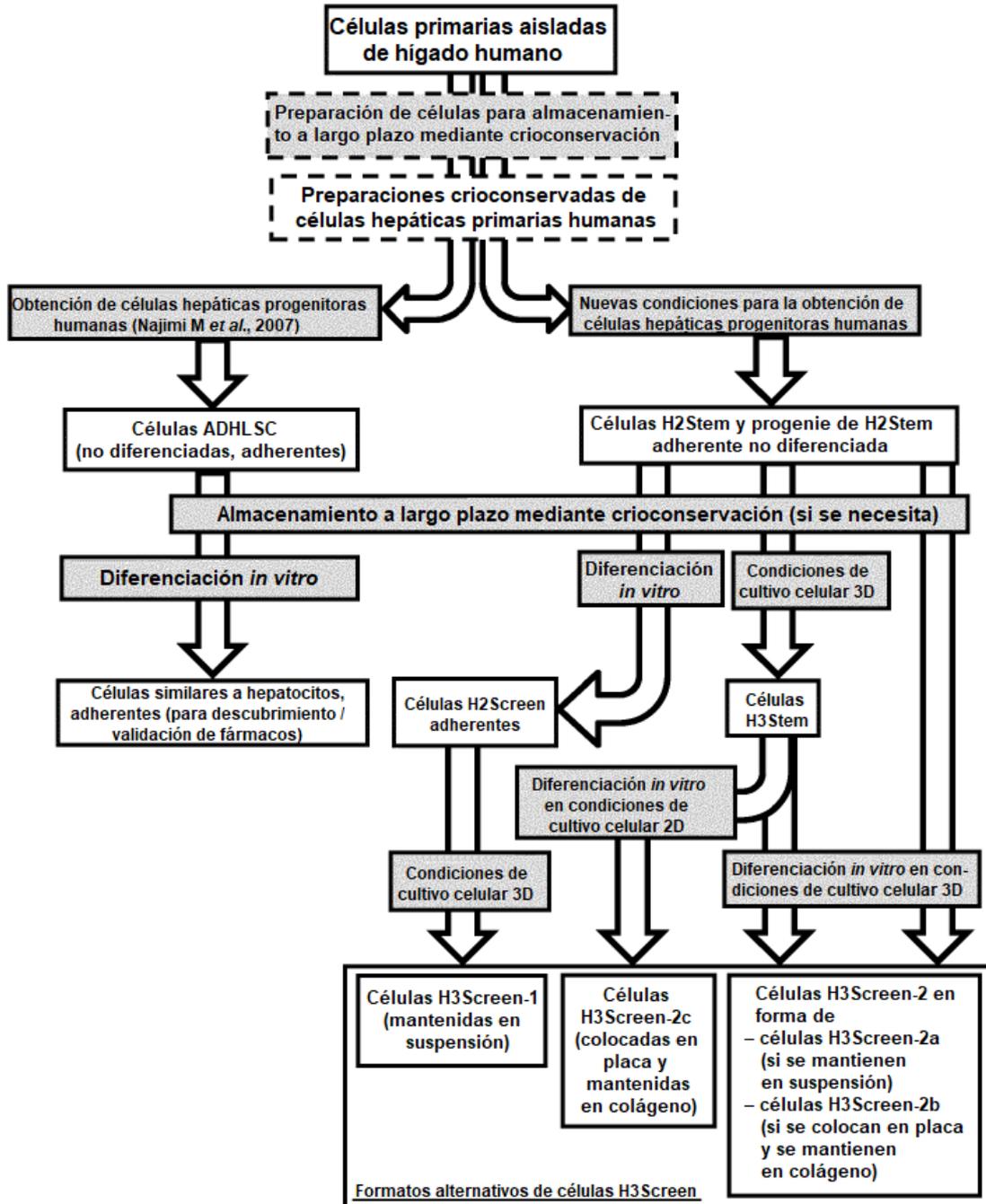
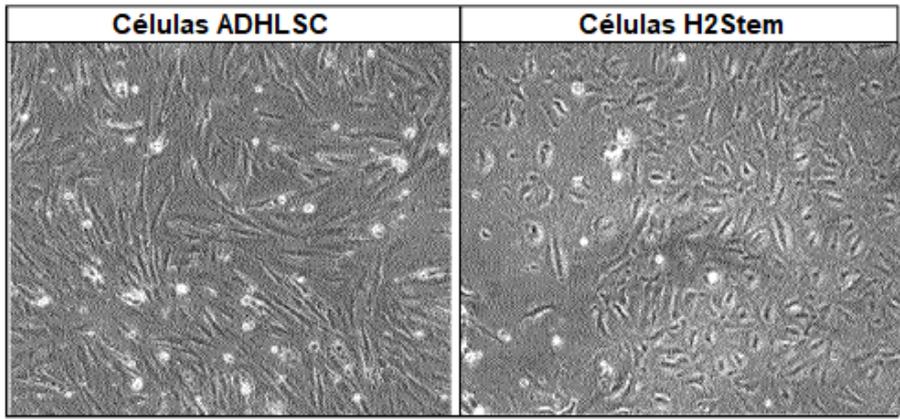


Fig. 2

A)



B)

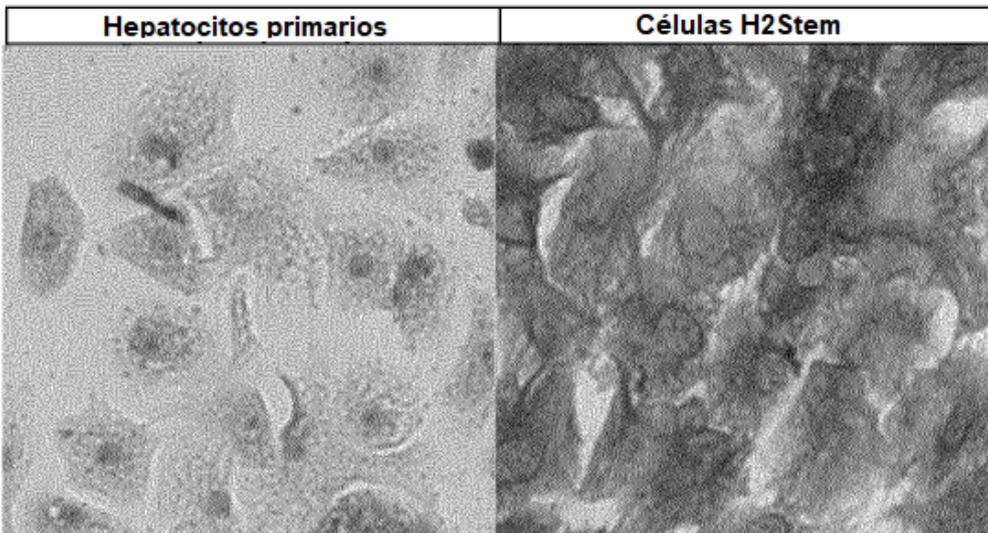


Fig. 3

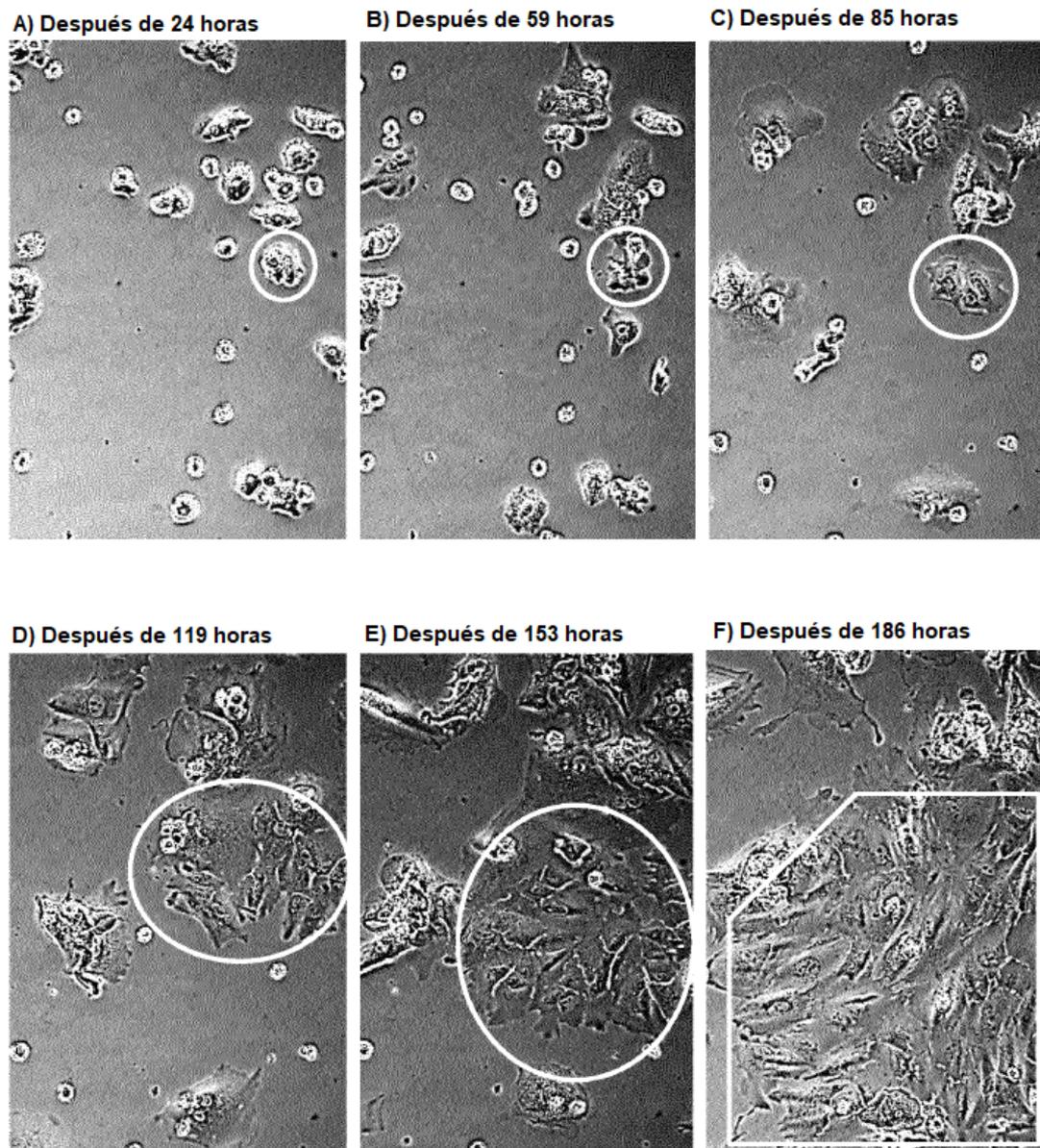
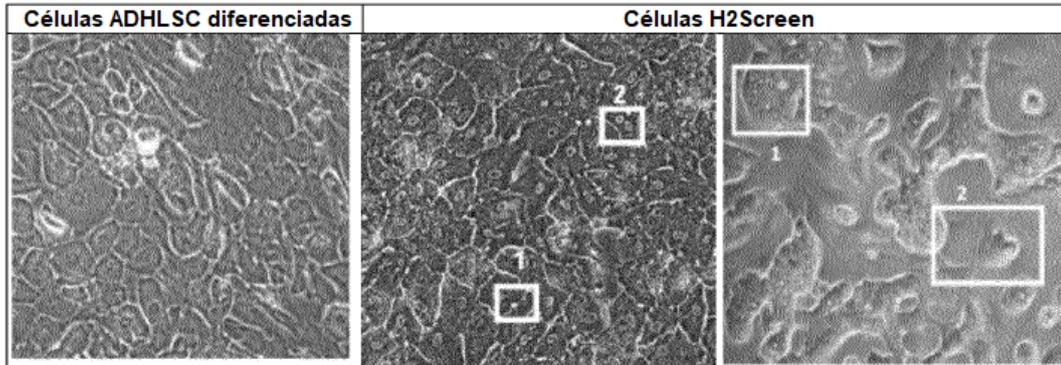
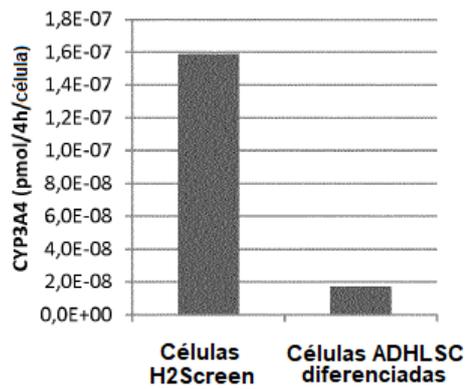


Fig. 4

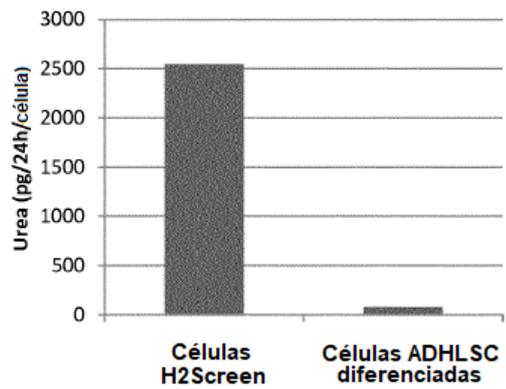
A)



B)



C)



D)

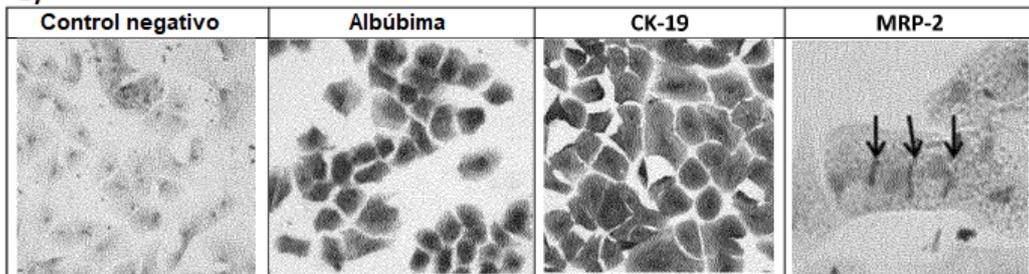
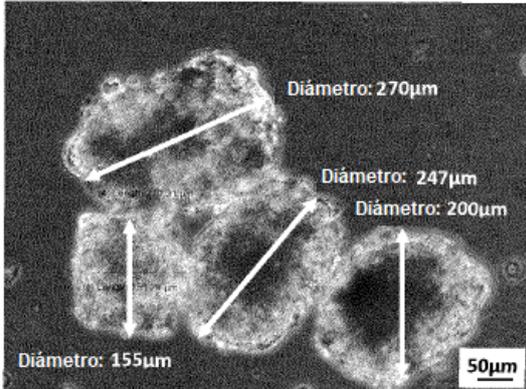
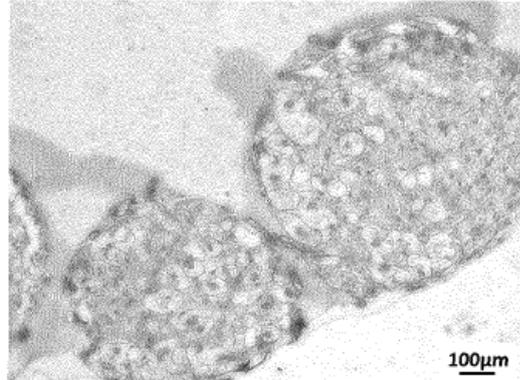


Fig. 5

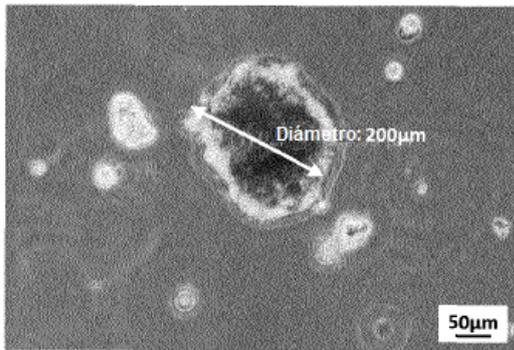
A) Células H3Stem



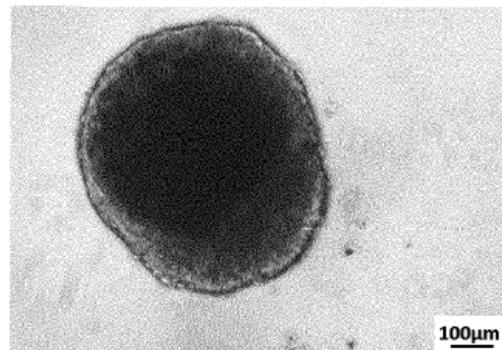
B) Células H3Screen-1



C) Células H3Screen-2a (placas de baja unión)



D) Células H3Screen-2a (en pocillos en forma de U)



E) Células H3Screen-2b colocadas en placa con colágeno

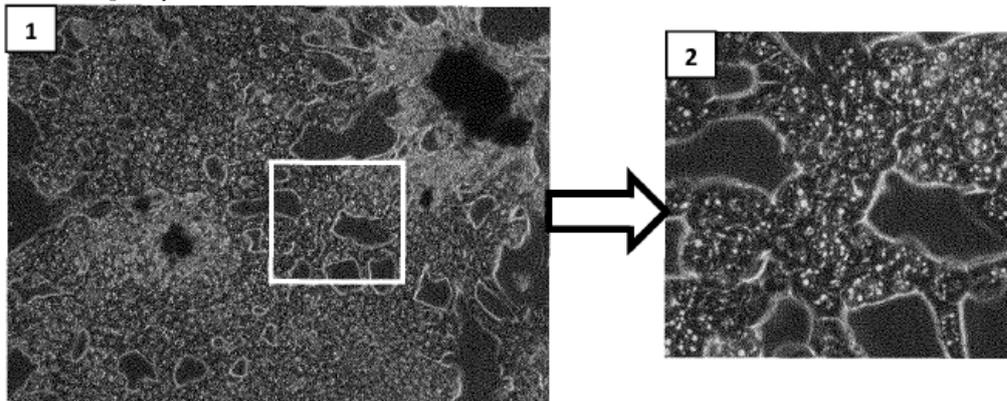
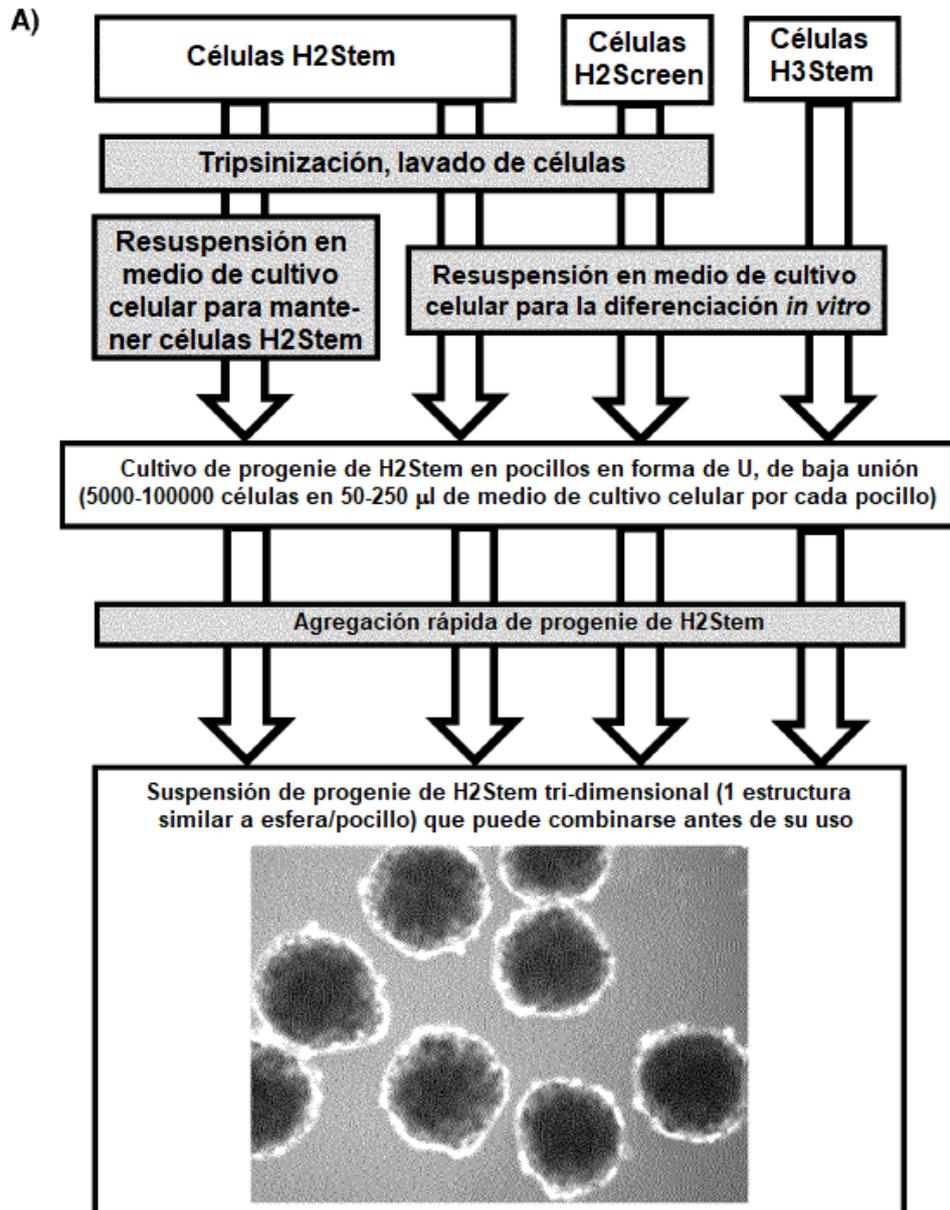


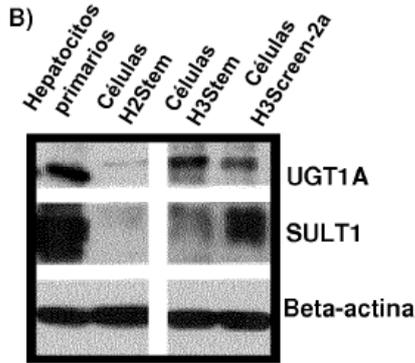
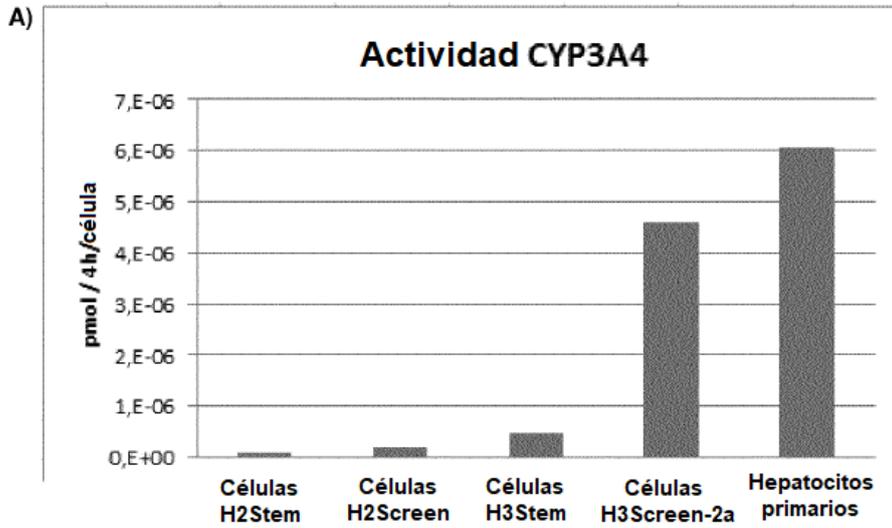
Fig. 6



B)

		N.º de células		
		10000	20000	100000
H3Stem	10000			
	20000			
	100000			
H3Screen-2a	10000			
	20000			
	100000			

Fig. 7



C)

	Hepatocitos primarios	Células H2Stem	Células H3Stem	Células H3Screen-2a
actividad UGT1A	+++	-	++	++
actividad SULT	+++	+	+	++

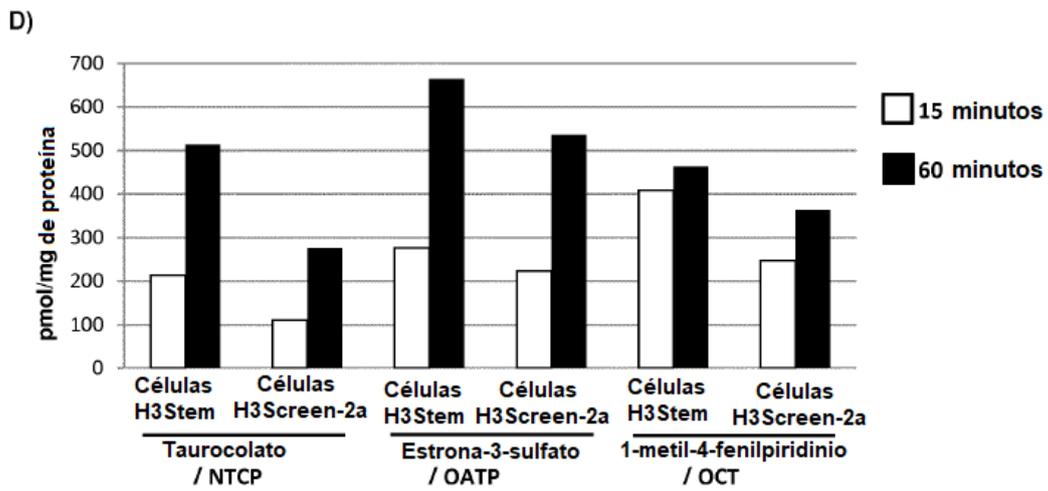
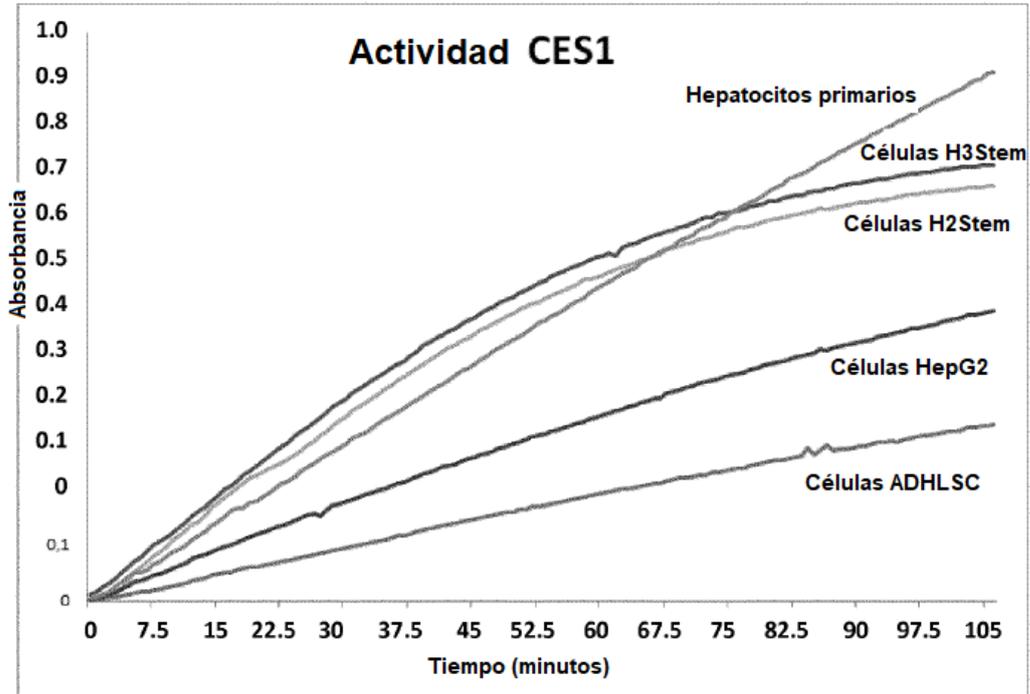


Fig. 8

A)



B)

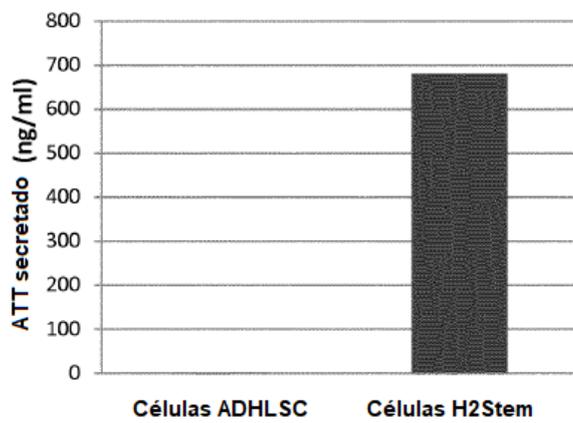


Fig. 9

Mapas de puntos (gráfico de puntuación para 2 grupos)

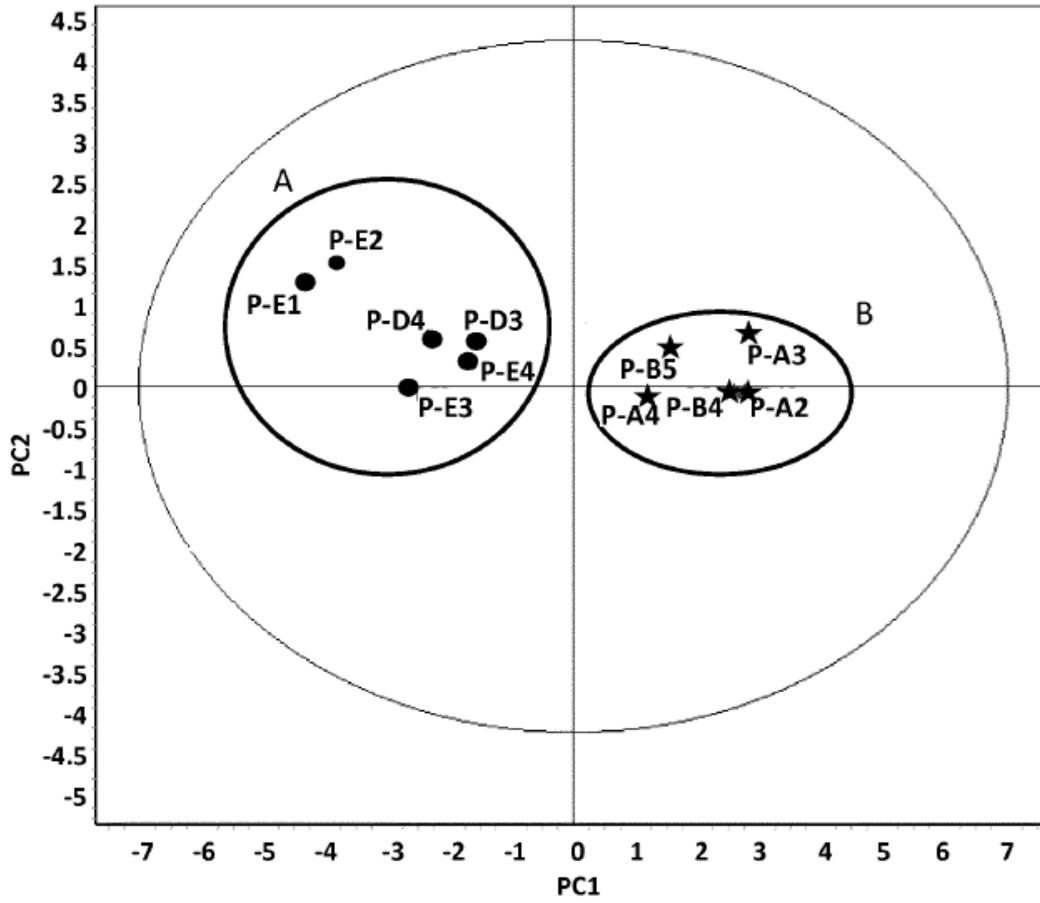
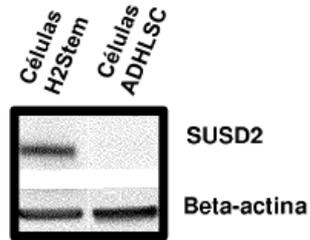
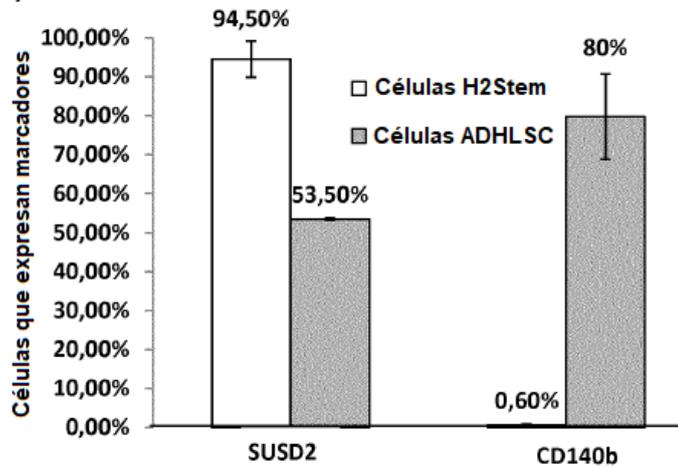


Fig. 10

A)



B)



C)

