

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 300**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2011 PCT/US2011/059960**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2011 E 11839627 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2637683**

54 Título: **Regeneración hepática**

30 Prioridad:

11.10.2011 US 201161545851 P

09.11.2010 US 411732 P

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

21.10.2020

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Cornell Center for Technology Enterprise &
Commercialization, 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**RAFII, SHAHIN;
DING, BI-SEN y
RABBANY, SINA Y.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 788 300 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

Regeneración hepática

5 **Antecedentes**

Las células endoteliales (EC) son células que cubren la superficie interior o de la luz de los vasos sanguíneos. Durante la embriogénesis, las células endoteliales inducen la organogénesis antes del desarrollo de la circulación (Matsumoto, *Science* 294:559-563 (2001); Lammert, *Science* 294:564-567 (2001); Sakaguchi, *Curr. Biol.* 18:1565-1571 (2008); Makita, *Nature* 452:759-763 (2008)). Estos hallazgos sugieren que las células endoteliales no solo forman conductos pasivos para administrar nutrientes y oxígeno, sino que también establecen un nicho vascular instructivo, que mediante la elaboración de tropógenos paracrinos estimula la regeneración de órganos, de una manera similar a los factores angiocrinos derivados de células endoteliales que respaldan la hematopoyesis (Butler, *Cell Stem Cell* 6:1-14 (2010); Hooper, *Cell Stem Cell* 4:263-274 (2009); Butler, *J. Nature Rev. Cancer* 10:138-146 (2010); Kabayashi, *Nature Cell Biol.* (doi: 10.1038/ncb2108) (2010)). Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual los subconjuntos específicos de tejidos de las células endoteliales promueven la organogénesis en adultos es desconocido.

Las células endoteliales capilares (EC) forman los bloques de construcción de la microvasculatura de los órganos individuales y están dotadas con fenotipos específicos de órganos y atributos funcionales (Aird, *Circulation research* 100:158-173 (2007); Carmeliet, *Nature* 438:932-936 (2005); Red-Horse, *Developmental cell* 12:181-194 (2007); Ruoslahti, *Annual review of immunology* 18:813-827 (2000)). Las EC capilares administran oxígeno y nutrientes, y también respaldan el desarrollo del órgano (Lammert et al., 2001; Matsumoto et al., 2001; Sakaguchi et al., 2008) y la regeneración del órgano adulto mediante la elaboración de los factores de crecimiento paracrinos específicos de tejidos, denominados también factores angiocrinos (Butler, *Nature reviews* 10:138-146 (2010a); Butler, *Cell stem cell* 6:251-264 (2010b)).

Células endoteliales específicas del hígado y la médula ósea. Las células endoteliales sinusoidales (SEC) componen una red de capilares estructural y funcionalmente única que vasculariza órganos específicos, incluyendo médula ósea e hígado. En ratones adultos, las SEC de la médula ósea, mediante la expresión de tropógenos angiocrinos específicos tales como los ligandos Notch, respaldan la regeneración hematopoyética (Butler, *Cell Stem Cell* 6:1-14 (2010); Hooper, *Cell Stem Cell* 4:263-274 (2009); Butler, *JNature Rev. Cancer* 10:138-146 (2010); Kabayashi, *Nature Cell Biol.* (doi: 10.1038/ncb2108) (2010)). De manera similar, la circulación hepática está predominantemente revestida por SEC hepáticas (Lee, *Hepatology* 45:817-825(2007); Klein, *Hepatology* 47:1018-1031 (2008)) (LSEC), estando cada hepatocito en proximidad celular con las LSEC. La regeneración hepática requiere la proliferación de hepatocitos. Sin embargo, la ausencia de definición fenotípica y operativa de las células endoteliales hepáticas, y la escasez de modelos genéticos angiogénicos en ratón relevantes (Greene, *Ann. Surg.* 237:530-535 (2003); Van Buren, *J. Clin. Oncol.* 26:1836-1842 (2008); LeCouter, *Science* 299:890-893 (2003)) han dificultado los estudios del papel de las LSEC en la regulación de la regeneración hepática Zaret, *Science* 322:1490-1494 (2008); Fausto, *Hepatology* 43:S45-S53 (2006); Michalopoulos, *Science* 276:60-66 (1997); Greenbaum, *J. Clin. Invest.* 102:996-1007 (1998); Huh, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:4477-4482 (2004)).

Las SEC de la médula ósea (MO) comprenden poblaciones fenotípica y funcionalmente discretas de EC. Tras la quimioterapia y la irradiación, las SEC de la MO activadas reconstituyen la expresión hematopoyética mediante la expresión angiocrina de ligandos Notch e IGFBP (Butler, *Cell stem cell* 6:251-264 (2010b); Kobayashi, *Nature cell biology* 12:1046-1056 (2010)). La delección condicional del receptor-2 de VEGF-A (VEGFR2) en SEC de MO (Hooper, *Cell stem cell* 4: 263-274 (2009)) de ratones adultos inhibe la regeneración de la MO al deteriorar la producción de factores angiocrinos.

Las células endoteliales trasplantadas pueden repoblar y sustituir parcialmente el endotelio del hígado en ratones con hemofilia A (Follenzi et al., *J. Clin. Invest.* 118:935-945 (2008)).

El trasplante simultáneo de células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) y hepatocitos en ratones puede llevar a una mejora del injerto de hepatocitos (Follenzi et al., *Hepatology* 46:785A-786A (2007)).

Células endoteliales específicas de pulmón. Durante el desarrollo del pulmón, el plexo vascular (capilar) se desarrolla en paralelo con el alvéolo (Cardoso, *Annual review of physiology* 63:471-494 (2001); Metzger, *Nature* 453:745-750 (2008); White, *Development* 134:3743-3752 (2007)). Como órgano único que facilita el intercambio de gases, el alvéolo pulmonar está muy vascularizado, con células endoteliales capilares pulmonares (PCEC) que revisten todos los alvéolos y que residen muy cerca de las células epiteliales (Bhattacharya, *Chest* 128:553S-555S. (2005); Komarova, *Annual review of physiology* 72:463-493 (2010); Muzykantov, *Expert opinion on drug delivery* 2:909-926 (2005); Petrache, *Nature medicine* 11:491-498 (2005); Voelkel, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L209-221 (2006)). El desarrollo y la regeneración del pulmón están impulsados por la alveologénesis, un proceso dependiente de la proliferación de células precursoras epiteliales (Kotton, *Cell and tissue research* 331:145-156 (2008); Rock, *Annual review of cell and developmental biology* (2011); Stripp, *Proceedings of the American Thoracic Society* 5:328-333 (2008)), que comprende subconjuntos de células alveolares epiteliales (AEC) (Chapman,

The Journal of clinical investigation 121:2855-2862 (2011); Liu, The Journal of experimental medicine 208:1473-1484 (2011)) y citoblastos bronquioalveolares (BASC) (Kim, Cell 121:823-835 (2005); Zhang, Nature genetics 40:862-870 (2008)).

5 La formación de la interfase alveolar-capilar es fundamental para la función pulmonar de intercambio de gases (Giordano, The Journal of biological chemistry 283:29447-29460 (2008); Huh, Science 328:1662-1668 (2010); Petersen, Science (New York, NY 329:538-541 (2010); Vaporciyan, Science (New York, NY 262:1580-1582 (1993)). Aunque las PCEC son una vasculatura capilar especializada implicada en la alveolarización dirigida (DeLisser, The Journal of biological chemistry 281:8724-8731 (2006); Leuwerke, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282:L1272-1278 (2002)) y la remodelación alveolar regenerativa (Metzger, Nature 453:745-750 (2008)), los mecanismos precisos por los cuales las PCEC modulan el desarrollo alveolar son desconocidos.

15 Además de su capacidad para experimentar una angiogénesis de brote proliferativo para vascularizar los alvéolos (Alvarez, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:L419-430. (2008); Del Moral, Developmental biology 290:177-188 (2006); Shu, Development 129:4831-4842 (2002)), las PCEC especifican la diferenciación de los precursores endodérmicos y mesodérmicos en las células precursoras epiteliales y vasculares del pulmón primitivo produciendo factores paracrinos (Bhattacharya, Chest 128:553S-555S. (2005); Yamamoto, Developmental biology 308:44-53 (2007)). Estos hallazgos sugieren que las PCEC pueden promover la alveologénesis elaborando señales de crecimiento angiocrinas. Sin embargo, no se ha estudiado si las señales instructivas derivadas de las PCEC pueden estimular la alveolarización regenerativa en los pulmones adultos. De hecho, la escasez de modelos genéticos regenerativos de pulmón en ratones y la ausencia de una definición operativa de las PCEC han dificultado los estudios de las PCEC en el direccionamiento de la regeneración alveolar en pulmones adultos.

25 La extracción quirúrgica del pulmón izquierdo, conocida como pneumonectomía unilateral izquierda (PNX), induce la expansión de la masa y el volumen en los lóbulos intactos del pulmón derecho restante mediante alveogénesis (Cowan, The American review of respiratory disease 111:267-277 (1975); Leuwerke, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 252:L1272-1278 (2002); Nolen-Walston, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:L1158-1165 (2008)). Sin embargo, los mecanismos precisos por los cuales PNX inicia y sostiene la alveologénesis en el pulmón no dañado son desconocidos. Definir los mecanismos celulares y moleculares que modulan la regeneración del pulmón es esencial para desarrollar estrategias para tratar los trastornos respiratorios.

Sumario

35 La materia objeto de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la invención proporciona células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) o LSEC activadas para su uso en un método para potenciar la regeneración del hígado en un mamífero que lo necesita, comprendiendo dicha regeneración del hígado la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa hepática, y comprendiendo dicho método el trasplante intrahepático de dichas LSEC a dicho mamífero, en el que dicho mamífero necesita la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa hepática.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para potenciar la regeneración del hígado en un mamífero que lo necesita, dicha regeneración del hígado comprende la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa del hígado y dicha composición farmacéutica comprende las LSEC inventivas o las LSEC activadas inventivas como se ha enumerado anteriormente y un transportador farmacéuticamente aceptable; en el que dicho mamífero necesita la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa hepática.

50 La divulgación de la presente invención proporciona LSEC para su uso en los métodos de potenciar o inducir la regeneración de un órgano en un sujeto que lo necesita. En una realización, se proporciona un método para potenciar o iniciar la regeneración de un órgano en un sujeto que lo necesita que comprende la administración de células endoteliales específicas de dicho órgano, o células endoteliales inductivas específicas de dicho órgano, a la zona del cuerpo en la que se desea la regeneración del órgano en dicho sujeto.

55 Otra realización proporciona unas LSEC o unas LSEC inductivas para su uso en un método de potenciar o iniciar la regeneración del hígado en un sujeto que lo necesita que comprende el trasplante intrahepático de células endoteliales sinusoidales del hígado (LSEC), o LSEC inductivas. Esta realización puede comprender además la administración de VEGF-A o hepatocitos. En una realización adicional, las LSEC o las LSEC inductivas son LSEC VEGFR2⁺VE-cadherina⁺VEGFR3⁺CD34⁻ factor VIII⁺.

60 La solicitud divulga un método para potenciar o iniciar la regeneración del pulmón en un sujeto que lo necesita que comprende el trasplante intravenoso o intratraqueal de células endoteliales capilares pulmonares (PCEC), o PCEC inductivas. Esta divulgación puede comprender además la administración de células precursoras epiteliales, MMP14, VEGF-A y/o FGF. En una divulgación adicional, dichas PCEC o PCEC inductivas expresan MMP14.

65 Otra realización más proporciona un método para expandir hepatocitos en cultivo cultivando simultáneamente dichos

hepatocitos con células endoteliales sinusoidales del hígado. Una realización adicional proporciona un método para expandir células precursoras epiteliales de pulmón cultivando simultáneamente dichas células precursores epiteliales de pulmón con células endoteliales capilares pulmonares.

5 Una realización adicional proporciona un método para potenciar o inducir una regeneración del órgano en un sujeto que lo necesita que comprende administrar uno o más de VEGF-A, VEGF-E, FGF-2, MMP14, EGF, u otros ligandos del receptor de EGF, a dichos sujetos en una cantidad suficiente para potenciar o inducir la regeneración del órgano en dicho sujeto. En realizaciones adicionales, el órgano es el hígado o el pulmón.

10 En otra realización, se proporciona una composición útil para su administración a un sujeto que necesita la regeneración del órgano, que comprende células endoteliales aisladas específicas de dicho órgano, o células endoteliales inductivas aisladas de dicho órgano, opcionalmente junto con un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, dichas células endoteliales o células endoteliales inductivas son células autólogas. En otra realización, la composición comprende adicionalmente uno o más de VEGF-A, VEGF-E, FGF-2, EGF, o MMP14.

En otra realización, se proporciona una composición útil para la administración a un sujeto que necesita de la regeneración del hígado, que comprende LSEC VEGFR2⁺VE-cadherina⁺VEGFR3⁺CD34⁻factor VIII⁺. Se divulga además, una composición útil para la administración a un sujeto que necesita la regeneración del pulmón, que comprende PCEC VEGFR2⁺VE-cadherina⁺CD34⁺CD31⁺FGFR1⁺.

Se divulga además un método para aislar células endoteliales específicas de hígado que comprende aislar células que son células VEGFR2⁺VE-cadherina⁺VEGFR3⁺CD34⁻ factor VIII⁺. Se divulga además un método para aislar células endoteliales específicas de pulmón que comprende aislar células que son células VEGFR2⁺VE-cadherina⁺CD34⁺CD31⁺FGFR1⁺.

Breve descripción de los dibujos

La patente o el archivo de solicitud contiene dibujos ejecutados en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos en color tras solicitarlo y pagar las tasas correspondientes.

Figura 1A-B. Papel inductor de las señales angiocrinas derivadas de células endoteliales específicas de órganos en la regeneración del hígado y el pulmón. **A**, Las LSEC que revisten el hígado sinusoide están cerca de los hepatocitos. Tras la resección del 70 % de la masa del hígado (hepatectomía parcial, PH), las LSEC angiogénicas inductivas inician y sostienen la regeneración de los hepatocitos proximales, mediante la elaboración de señales angiocrinas específicas. M, R, L, y Cau; lóbulos mediano, derecho, izquierdo y caudado del hígado. **B**, Alveolarización regenerativa mediante la proliferación de precursores epiteliales del pulmón. La regeneración alveolar inducida por PNX está mediada principalmente por la amplificación impulsada por las PCEC de las BASC y las AEC.

Figura 2A-G. Firma fenotípica y contribución de las LSEC a la regeneración fisiológica del hígado inducida por una hepatectomía parcial del 70 % (PH). **A**, Secciones del hígado obtenidas de ratones indicadores de VEGFR2-GFP (Hooper, Cell Stem Cell 4:263-274 (2009)). Durante la regeneración del hígado VEGFR2 se expresa exclusivamente en las células endoteliales del hígado. **B**, Expresión restringida de VEGFR3 en las LSEC, pero no de CD34⁺ en vasos grandes o hepatocitos. **C**, Análisis citométrico de flujo polivariado de células no parenquimales del hígado. Las células VEGFR2⁺ que son CD45⁻, expresan VE-cadherina específica de endotelio. **D**, La expresión específica de VEGFR3 en las LSEC VEGFR2⁺VE-cadherina⁺CD45⁻, siendo una fracción predominante CD34⁻Factor VIII⁺Prox-1. Por tanto, las LSEC podría identificarse como células VEGFR3⁺CD34⁻. **E**, Cuarenta y ocho horas después de la hepatectomía parcial, los hepatocitos mitóticos E-cadherina⁺P-H3⁺ se localizan adyacentes a las células endoteliales de VE-cadherina⁺ y VEGFR2⁺. **f, g**, Cinética de la expansión de LSEC (**F**) y mitosis de los hepatocitos (**G**) durante la regeneración del virus ($n = 4$); hpf, campo de alta potencia. Barras de escala, 50 μ m. Barras de errores, s.e.m.

Figura 3A-K. La activación de VEGFR2-Id1 en LSEC media en la regeneración del hígado inducida por hepatectomía parcial. **A, B**, La proliferación de hepatocitos después de la hepatectomía parcial está deteriorada en ratones *VEGFR2^{fl/fl}* ($n = 5$). **C-E**, Inhibición de la regeneración de la masa del hígado (**C**) y formación de vasos funcionales VE-cadherina⁺isolectina⁺ (**D,E**) en ratones *VEGFR2^{fl/fl}* tras hepatectomía parcial ($n = 4-6$). **F, G**, La inyección de VEGF-A₁₆₄, pero no del ligando P1GF específico de VEGFR1, acelera la regeneración de la masa del hígado (**F**), asociada con un aumento creciente en el número de LSEC VEGFR3⁺CD34⁻ (**G**) ($n = 4$). **H**, Sección regenerada del hígado de ratón *Id1^{VenusYFP}* (Nam, Cell Stem Cell 5:515-526 (2009)), *Id1* está regulado de forma positiva selectivamente por la hepatectomía parcial en vasos VE-cadherina⁺. **I**, la delección de VEGFR2 disminuye la regulación positiva de *Id1* en el hígado en regeneración ($n = 5$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, frente a *VEGFR2^{fl/+}* (**B-E, I**), frente al grupo tratado con PIGF (**F**). Barra de escala, 50 μ m. Barras de errores, s.e.m. **J**, Inactivación génica selectiva de VEGFR2 en células endoteliales de hígado tras el tratamiento con tamoxifeno de ratones Rosa⁻CreER^{T2}VEGFR2^{fllox/fllox}, $N = 4$. **K**, Cuantificación de la inactivación génica de VEGFR2 específica de células endoteliales en ratones VE-cadherina⁻CreER^{T2}VEGFR2^{fllox/fllox}.

Figura 4A-K. La regulación positiva de *Id1* en LSEC es esencial para la regeneración del hígado. **A**, En comparación con las crías de camada naturales (WT), los ratones *Id1^{-/-}* manifiestan una regeneración deteriorada

de la masa hepática, que no se puede rescatar mediante la administración de VEGF-A₁₆₄ ($n = 5$). **B, C**, Proliferación deteriorada de hepatocitos (**B**) y el ensamblaje de vasos VE-cadherina⁺isolectina⁺ **C**) en ratones $Id1^{-/-}$ tras hepatectomía parcial ($n = 5$). **D, E**, La estimulación dependiente de LSEC de la proliferación de hepatocitos se inhibió específicamente mediante la inactivación génica de $Id1$. Scr, mezclado. CM, medio condicionada para LSEC ($n = 4$). **F**, Trasplante intraesplénico de LSEC marcadas con GFP incorporadas en la luz de la vasculatura sinusoidal de VEGFR3⁺ en el hígado $Id1^{-/-}$ (Follenzi, J. Clin. Invest: 118, 935-945 (2008)). **G, H**, El trasplante de LSEC $Id1^{-/-}$ restaura la regeneración de la masa (**G**) y la proliferación de hepatocitos (**H**) en el hígado $Id1^{-/-}$ ($n = 4$). Línea punteada, nivel del hígado $Id1^{-/-}$ sin trasplante de células endoteliales. **I**, La proximidad celular es esencial en la estimulación de la mitosis de hepatocitos por la vasculatura GFP⁺ $Id1^{+/+}$ trasplantada. * $P < 0,05$, frente a $Id1^{-/-}$ (**a**); ** $P < 0,01$, frente a $Id1^{-/-}$ con VEGF₁₆₄ (**A**), frente a WT (**B, C**). Barras de escala, 50 μm (**D, F**) y 20 μm (**H**). Barras de errores, s.e.m. **J**, Inhibición sostenida de la recuperación de la masa del hígado en ratones $Id1^{-/-}$. A lo largo del periodo indicado, la inyección de VEGF-A₁₆₄ no pudo rescatar la reconstitución hepática. * $P < 0,05$ frente a WT, $N = 4$. **K**, La regeneración mejorada de la función hepática (aumentó el nivel de bilirrubina en plasma) en ratones $Id1^{-/-}$ tras el PH. n.º, $P < 0,01$, frente a WT, $N = 3$.

Fig. 5A-G. La Inducción mediada por $Id1$ -de Wnt2 y HGF en LSEC estimula la regeneración hepática. **A**, La regulación positiva de HGF y Wnt2 en LSEC $Id1^{-/-}$ se deteriora tras hepatectomía parcial ($n = 5$). **B**, El trasplante intraesplénico de LSEC $Id1^{-/-}$ marcadas con GFP que transporta Wnt2 y HGF ($Id1^{-/-}$ Wnt2⁺HGF⁺GFP⁺) rescata la regeneración de la masa del hígado $Id1^{-/-}$ ($n = 4$). **C**, El trasplante de LSEC $Id1^{-/-}$ Wnt2⁺HGF⁺ restaura la proliferación de hepatocitos deteriorada en el hígado $Id1^{-/-}$ ($n = 4$). **D**, La proximidad entre los hepatocitos mitóticos y las LSEC $Id1^{-/-}$ Wnt2⁺HGF⁺GFP⁺ en el hígado $Id1^{-/-}$. **E**, Requerimientos de LSEC $Id1^{+/+}$ en los sinusoides hepáticos $Id1^{-/-}$ restaura la regeneración vascular hepática. **F**, Las LSEC $Id1^{+/+}$ o $Id1^{-/-}$ Wnt2⁺HGF⁺GFP⁺ trasplantadas se localizan cerca de los hepatocitos, promoviendo la angiogénesis inductiva y proliferativa que sostiene de esta forma la regeneración fisiológica del hígado. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Barra de escala, 20 μm . Barras de errores, s.e.m. **G**, Las LSEC angiogénicas inductivas inician y sostienen la regeneración de los hepatocitos proximales, mediante la elaboración de señales angiocrinas específicas.

Figura 6A-E. PNX induce la regeneración del pulmón derecho y la expansión de los precursores epiteliales del pulmón. (**A, B**) Restauración del peso y el volumen en los lóbulos del pulmón derecho intactos restantes tras la resección del pulmón izquierdo. **A**, Esquema que ilustra el procedimiento PNX e imagen representativa de los pulmones derechos regenerados 15 días después de la PNX. **B**, La regeneración del pulmón se inició 3 días después de la PNX y alcanza su tamaño y volumen máximos en el día 15, $n=5$. **C**, Amplificación de las células CCSP⁺ en la unión del conducto bronquioalveolar (BADJ) en el día 3 después de la PNX. Se alimentaron los ratones con agua de bebida que contenía BrdU para someter a pulsos los precursores pulmonares en proliferación. Existe una expansión específica de células CCSP⁺BrdU⁺ localizadas en BADJ en el día 3 después de la PNX (flechas). Se señala la distribución de células BrdU⁺ en el espacio alveolar distal posteriormente (puntas de flechas). **D, E**, Células de tipo BASC CCSP⁺SPC⁺Sca-1⁺VE-cadherina-CD31⁺ se identificaron y cuantificaron en ratones CCSP-YFP y SPC-YFP 3 días después de la PNX. Existe una captación mínima de BrdU en PCEC VE-cadherina⁺CD31⁺, indicando que en este punto temporal, las PCEC no experimentan proliferación. Ha de señalarse la yuxtaposición celular cercana de las PCEC VE-cadherina⁺ (flecha azul) y la proliferación de BASC CCSP⁺BrdU⁺ (flecha roja) en el recuadro inferior del panel **D**.

Figura 7A-E. En el día 7 después de la PNX, la expansión de las AEC y las PCEC sostiene la regeneración alveolar. **A**, Después de la PNX, se sometieron a pulsos las células que amplificaban el tránsito (TAC) con la administración I.P. de BrdU y desveladas por la tinción de BrdU. Las TAC BrdU⁺ aumentaron en los pulmones derechos con máximo en el día 7 después de la PNX. Barra de escala, 2,5 mm. **B, C**, Cuantificación de las TAC en el pulmón derecho restante en el día 7 después de la PNX. El análisis citométrico de flujo polivariante de las células mononucleares totales demuestra la expansión de las AECII SPD⁺SPC⁺E-cadherina⁺ y de las PCEC VE-cadherina⁺CD34⁺VEGFR2⁺FGFR1⁺CD45⁺. **D**, Proliferación de las AECII SPC⁺ y las PCEC VE-cadherina⁺ en la interfase alveolar-capilar de los pulmones restantes en el día 7 después de la PNX. Ha de señalarse la proximidad celular cercana entre las PCEC (flecha verde) y las AE-CII BrdU⁺ (flecha roja). Barra de escala, 100 μm . **E**, Cuantificación de las PCEC VE-cadherina⁺CD34⁺ y las AECII SPC⁺E-cadherina⁺ en los pulmones restantes 15 días después de la PNX; PNX induce la proliferación de las PCEC y las AEC. $n=5$.

Figura 8A-G. La delección inducible de $Vegfr2$ e inactivación génica parcial de $Fgfr1$ en las EC atenúa la regeneración pulmonar. **A**, Activación secuencial de VEGFR2 y regulación positiva de FGFR1 en las PCEC después de la PNX. PNX aumentó la fosforilación de VEGFR2, mientras que la expresión total de VEGFR2 en las PCEC sigue siendo constante. A diferencia de ello, la expresión de FGFR1 en las PCEC está regulada positivamente después de la PNX de una manera dependiente del tiempo. **B**, Inactivación génica de VEGFR2 y FGFR1 específica de EC en ratones adultos. Ratones transgénicos en los que el promotor de la VE-cadherina impulsa la expresión de CreERT2 sensible a tamoxifeno (ratones VE-Cad-CreERT2) se cruzaron con ratones $Vegfr2^{loxP/loxP}$ y $Fgfr1^{loxP/loxP}$ y se trataron con tamoxifeno para inducir la delección específica de EC de ratones $Vegfr2$ y $Fgfr1$ ($Vegfr2^{iAEC/iAEC}$ y $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$). **C**, La delección específica de EC $Vegfr2$ (ratones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}$) inhibe la expansión de las células de tipo BASC CCSP⁺Sca1⁺ después de la PNX. Ratones $Vegfr2^{iAEC/+}$ sirvieron como control. **D, E**, La proliferación defectiva de las PCEC (puntas de flecha rojas) y las AEC (flechas amarillas) en ratones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$ después de la PNX, $n=4$. Barra de escala, 100 μm . Ha de señalarse el aumento en el diámetro (flechas punteadas) en ratones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$ en comparación con ratones $Vegfr2^{iAEC/+}$ del control. **F**, Después de la PNX, la delección específica de EC de $Vegfr2$ y $Fgfr1$ deterioró la recuperación de la función pulmonar. La restauración de la función pulmonar en ratones

$Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}Fgfr1^{\Delta EC/+}$ se inhibió significativamente en comparación con ratones del control. Ha de señalarse la función pulmonar normal de los ratones inactivados génicamente antes de la PNx. n.º, $p < 0,01$, en comparación con los ratones $Vegfr2^{\Delta EC/+}$ del control, n=4. **G**, La restauración de la masa y el volumen del pulmón está deteriorada en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}Fgfr1^{\Delta EC/+}$, n=4.

5 **Figura 9A-E. Después de la PNx, las PCEC producen específicamente MMP14 e inducen la expansión de las AECII SPC⁺ y BASC CCSP⁺Sca1⁺CD31⁺.** **A**, La ablación específica de endotelio de $Vegfr2$ y $Fgfr1$ disminuyó la regulación positiva de MMP14 en las células endoteliales capilares pulmonares (PCEC) después de la PNx. Las PCEC se aislaron del pulmón de ratón en regeneración después de la PNx, como se ha descrito anteriormente (Ackah, The Journal of clinical investigation 115:2119-2127 (2005); Murakami, The Journal of
10 clinical investigation 121 (2011)). La regulación en exceso de la expresión de MMP14 con respecto a los ratones simulados se comparó entre los ratones del control y los ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}$ (izquierdo) o $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}Fgfr1^{\Delta EC/+}$ (derecha) en el día 3 y el día 7, respectivamente. Los datos se presentan de principio a fin como media \pm s.e.m; n = 4. **B**, Activación selectiva de VEGFR2 (fosforilación) en los pulmones, pero no en otros órganos vascularizados después de la PNx. Aunque no hubo diferencia significativa en el nivel de proteína VEGFR2 en diferentes órganos, la activación de VEGFR2 se produjo solo en los pulmones después de la PNx en el día 7. Este hallazgo demuestra una activación de VEGFR2 específica del pulmón después de la PNx. En la Figura 3A se muestra la cinética de la activación de VEGFR2 en los pulmones después de la PNx. **C**, MMP14 se reguló de forma positiva específicamente en la vasculatura del pulmón pero no en los lechos vasculares del corazón, el bazo, o el riñón después de la PNx. Se examinó la expresión y la localización de MMP14 (flecha) en diferentes órganos de los ratones después de la PNx. En la Figura 4C se muestra la expresión de MMP14 en el pulmón y el hígado después de la PNx. **D**, Las células endoteliales activadas por MAPKinasas y Akt (EC MAPK⁺Akt⁺) manifestaron la expansión más significativa de las AECII SPC⁺. El cultivo simultáneo de las EC con las AEC se describe en "métodos", n = 5. **E**, Las BASC CCSP⁺ mantuvieron sus marcadores fenotípicos después del cultivo simultáneo. Las células CCSP (YFP)⁺ se analizaron mediante citometría de flujo después del cultivo simultáneo con las EC. Tras el cultivo simultáneo, Las BASC retienen la firma fenotípica como células CCSP⁺Sca-1⁺CD31⁺. **Figura 10A-G. Después de la PNx, Las PCEC producen específicamente MMP14 e inducen la formación de sacos similares a capilares alveolares en un cultivo simultáneo de angioesferas en 3D con EC inductivas.** **A**, La PNx induce la regulación positiva dependiente del tiempo de la proteína MMP14 en los lóbulos derechos restantes. Se muestran imágenes de transferencia Western representativas. **B**, **C**, Después de la PNx, la regulación positiva específica de MMP14 en las PCEC VE-cadherina⁺ está atenuada en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}Fgfr1^{\Delta EC/+}$, como se muestra mediante citometría de flujo (**B**) e inmunotinción (**C**). Ha de señalarse la localización de MMP14 no regulado en las PCEC VE-cadherina⁺ (flecha), pero no en las EC del hígado en ratones pneumonectomizados del control. Barra de escala, 100 μ m. **D**, **E**, Un cultivo simultáneo 3D de AECII SPC (YFP)⁺ con MAPK y Akt que activó las EC primarias (MAPK⁺Akt⁺ EC) forma angioesferas y establece un biorreactor para la expansión de AEC SPC⁺ mediante la producción angiocrina de MMP14. Se generaron EC MAPK⁺Akt⁺ transduciendo cRaf, que activa la ruta MAPK y el gen E4ORF1 que sostiene la activación simultánea de Akt. Se muestran imágenes representativas (**D**) y cuantificación (**E**) de diferentes grupos. scr, ARNsh mezclado, CM, medio acondicionado. **F**, **G**, La producción angiocrina de MMP14 respalda la propagación de células de tipo BASC CCSP (YFP)⁺Sca-1⁺CD31⁺. Se muestran imágenes representativas (**F**) y la cuantificación (**G**) de diversos grupos.

35 **Figura 11A-F. MMP14 derivada de PCEC respalda la alveolarización regeneradora.** **A**, Después de la PNx, la neutralización del mAb contra MMP14 abolió la regeneración de la masa y el volumen del pulmón. **B**, Después de la PNx, la inhibición de MMP14 disminuyó la expansión de las AEC E-cadherina⁺, n=5. Barra de escala, 100 μ m. Ha de señalarse la carencia tanto de AECII SPC⁺E-cadherina⁺ cuboidales (flecha amarilla) como de y AEC análogas a SPC⁺E-cadherina⁺ de tipo I (punta de flecha roja) en los alvéolos tratados con el mAb de MMP14. **C**, **D**, Después de la PNx, la inhibición de MMP14 bloqueó la expansión de las AEC E-cadherina⁺, pero no las de las PCEC VE-cadherina⁺CD34⁺, n=5. **E**, **F**, Después de la PNx, la inhibición de MMP14 suprimió el recrecimiento alveolar y condujo a un tamaño alveolar agrandado. (**E**) Tinción con H y E representativa de los pulmones pneumonectomizados tratados con mAb neutralizante contra MMP14 y el isotipo IgG. Ha de señalarse el tamaño alveolar en los ratones tratados con mAb (líneas punteadas). (**F**) Cuantificación del número alveolar y el tamaño alveolar después de la PNx. Barra de escala, 100 μ m.

40 **Figura 12A-J. La producción angiocrina de MMP14 induce la alveologénesis eliminando ectodominios del tipo EGF de HB-EGF y la cadena γ 2 de laminina5.** **A**, **B**, PNx indujo la liberación dependiente del tiempo de HB-EGF en el espacio alveolar, que se inhibió en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}Fgfr1^{\Delta EC/+}$ o mediante la neutralización de MMP14. Se muestra en **A** la imagen de la transferencia Western representativa. Ratones $Vegfr2^{\Delta EC/+}$ del control tratados con mAb neutralizante contra MMP14 (mAb contra MMP14); BAL, lavado bronquioalveolar. BALF, fluido BAL; n=4. **C**, En el día 7 después de la PNx, la activación de VEGFR2 y FGFR1 en las PCEC regulada positivamente MMP14, produce la escisión de la cadena de la cadena γ 2 de laminina5. **D-F**, la inyección de EGF restauró la regeneración de la masa y el volumen del pulmón (**D**), la integración de las AEC E-cadherina⁺ en la función capilar (**E**) y pulmonar se midió por el volumen inspiratorio y la distensibilidad estática (**F**) en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}Fgfr1^{\Delta EC/+}$ después de la PNx. Ha de señalarse la asociación potenciada de las AECII SPC⁺E-cadherina⁺ (punta de flecha roja) y de las AECII SPC⁺E-cadherina⁺ (flecha amarilla) con el capilar. n=4. (**G-I**) En el día 7 después de la PNx, la inyección intravenosa de EGF restauró la fosforilación de EGFR (**G**) y aumentó la proliferación de AECII SPC⁺ (**H**, **I**) en el pulmón $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}Fgfr1^{\Delta EC/+}$. Ha de señalarse la proliferación aumentada de las AECII SPC⁺ (flecha blanca). La cuantificación de la población de células amplificadora después de la PNx se muestra en **I**, n=4. Barra de escala, 100 μ m. **J**, La liberación de HB-EGF en
55
60
65

el medio cultivado simultáneamente con ECAEC/BASC y el medio acondicionado con MAPK⁺Akt EC (CM) es dependiente de MMP14. **K**, La administración local (intratraqueal) de EGF dio como resultado una mejora en la regeneración de la masa y el volumen del pulmón, n = 5.

Figura 13A-G. El trasplante de PCEC naturales (WT) restaura la regeneración alveolar defectiva en ratones deficientes en Vegfr2 y Fgfr1 endoteliales. **A**, Estrategia de trasplante de las EC para definir la contribución de las PCEC en la promoción de la regeneración alveolar. Después de la PNx, las EC se purificaron a partir del pulmón y el hígado de las crías de camada WT, transducidas con GFP lentivírico, y trasplantadas a través de la vena yugular a ratones *Vegfr2*^{ΔEC/ΔEC} y *Vegfr2*^{ΔEC/ΔEC}*Fgfr1*^{ΔEC/+} pneumonectomizados en el día 3 y 7, respectivamente. **B**, Incorporación de GFP⁺ PCEC trasplantadas a capilares de pulmón funcionales. Se usó la infusión intravenosa de isolectina vascular específica para identificar la vasculatura patente. Ha de señalarse la presencia de las PCEC isolectina⁺GFP⁺ perfundidas, lo que indica la incorporación funcional de PCEC WT trasplantadas a capilares *Vegfr2*^{ΔEC/ΔEC}*Fgfr1*^{ΔEC/+} receptores. Barra de escala, 100 μm. **C, D**, Restauración de la expansión potencial de células de tipo BASC CCSP⁺ en ratones *Vegfr2*^{ΔEC/ΔEC} tras el trasplante de PCEC. Ha de señalarse en **(D)** la localización única de células de tipo BASC BrdU⁺CCSP⁺ en proliferación (flecha roja) que están en estrecha proximidad con las PCEC GFP⁺ trasplantadas (flecha verde). **E-G**, El trasplante de las PCEC WT restaura la proliferación de las AEC SPC⁺ (**E, F**) y la función pulmonar (**G**) en ratones *Vegfr2*^{ΔEC/ΔEC}*Fgfr1*^{ΔEC/+}. Se detectaron AEC Br-dU⁺SPC⁺ en expansión (flecha roja) en asociación celular estrecha con las PCEC trasplantadas (flecha verde) (**F**).

20 Descripción detallada

En la siguiente descripción, se hace referencia a los dibujos acompañantes que forman parte de la misma, y en los que se muestra por medio de ilustración las realizaciones específicas que se pueden llevar a la práctica. Estas realizaciones se describen en detalle para permitir a los expertos en la materia llevar a la práctica la invención, y debe entenderse que se pueden utilizar otras realizaciones y que se pueden realizar cambios lógicos sin apartarse del alcance de la presente invención. La siguiente descripción de las realizaciones ilustrativas, por lo tanto, no debe tomarse en un sentido limitado y el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

El resumen se proporciona para permitir al lector discernir rápidamente la naturaleza y la esencia de la divulgación técnica. El resumen se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o el significado de las reivindicaciones.

Los inventores han descubierto que se puede inducir o potenciar la regeneración de un órgano mediante la aplicación y/o la activación de las células endoteliales específicas de tejidos. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, se postula que estas células endoteliales específicas de tejidos promueven la organogénesis, por ejemplo, desarrollando la vasculatura necesaria para el intercambio de oxígeno y nutrientes, y además, liberando factores de crecimiento "angiocrinos" que promueven la angiogénesis y estimulan las células tisulares específicas de órganos a crecer y repoblar el tejido perdido en el órgano afectado.

Células endoteliales y células endoteliales específicas de tejidos. Las expresiones "células endoteliales" y "células endoteliales capilares" (EC) se usan de manera indistinta en el presente documento para referirse a las células del endotelio las superficies de los vasos o capilares sanguíneos o linfáticos, forman la microvasculatura de los órganos, tienen características fenotípicas específicas de órganos, tales como una expresión superficial celular o una ausencia de expresión de las proteínas específicas, y llevar a cabo las actividades funcionales específicas de órganos. En general, las células endoteliales se caracterizan por la expresión del receptor-2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2⁺) y VE-cadherina⁺. Las EC pueden opcionalmente expresar además positivamente uno o más de CD62E/E-selectina (molécula de adhesión celular), VEGFR1 (Flt1), VEGFR3 (Flt4), factor de Von Willebrand (vWF; transportador del Factor VIII), CD31 (FL-3 o PECAM-1), lyve-1, y Tie-2.

Las "células endoteliales específicas de tejidos" (TSEC) son células endoteliales que son específicas de un órgano concreto. Las TSEC proporcionan una fuente para el recrecimiento de tejidos de órganos, induciendo la proliferación de otras células específicas de órganos, y además mediante la autoproliferación para formar nueva vasculatura para la regeneración del tejido. Las TSEC se pueden expresar mediante la expresión de marcadores de EC junto con marcadores adicionales específicos de un tejido divulgado en el presente documento. Esta divulgación proporciona métodos para aislar y expandir las EC específicas de tejidos para su uso de acuerdo con la invención, mediante la identificación de marcadores específicos de tejidos que se pueden usar para separar las TSEC de otras células, y mediante métodos de cultivo como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, las EC sinusoidales específicas de hígado (LSEC) se caracterizan como VEGFR2⁺, VE-cadherina⁺, VEGFR3⁺, CD34⁺, y factor VIII⁺. Las LSEC pueden caracterizarse mediante uno o más marcadores adicionales de Sca-1⁺, podoplanina⁺ (glicoproteína transmembrana de tipo mucina), lyve-1⁺ (receptor de hialuronano), prox-1⁺, y estabilina-1⁺ (receptor de hialuronano).

En un ejemplo comparativo, las EC capilares específicas de pulmón (PCEC) expresan VEGFR2⁺, VE-cadherina⁺, CD34⁺, CD31⁺, y FGFR1⁺ (receptor de FGF-2). Los marcadores característicos opcionales adicionales de las PCEC incluyen uno o más de c-kit⁺, cxcr-4⁺ y CD45⁻.

Como ejemplo adicional, las EC sinusoidales específicas de médula ósea se caracterizan por marcadores característicos: VEGFR2⁺, VE-cadherina⁺, VEGFR3⁺, y CD34⁺. Los marcadores opcionales adicionales característicos de las EC sinusoidales específicas de médula ósea incluyen uno o más de c-kit⁺, cxcr-4⁺, CD45⁺, y Sca-1⁺.

Como ejemplo adicional, las TSEC de los islotes pancreáticos expresan VEGFR2⁺, VE-cadherina⁺ y CD34⁺. Las TSEC del cerebro expresan VEGFR2⁺, VE-cadherina⁺ y CD133⁺ y expresan opcionalmente además el ligando Notch⁺ e IGFBP1⁺ (proteína-1 de unión al factor de crecimiento análogo a insulina)⁺.

Aislamiento de las EC y TSEC. La presente divulgación proporciona EC y TSEC aisladas para su uso en los métodos de la invención. Los términos "aislado" y "purificado" se usan de manera indistinta en el presente documento para referirse a un material que está sustancialmente o esencialmente eliminado o concentrado en su entorno natural. Por ejemplo, una célula está aislada si está sustancialmente separada de otros tipos de células, tejidos y materiales endógenos que se encontrarían normalmente cerca de un sujeto. Los métodos para la purificación y el aislamiento de tipos de células de acuerdo con la expresión de los marcadores superficiales celulares son metodologías documentadas. Una célula o población de células "sustancialmente aislada" es una célula o una población de células que está al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más aislada de otros tipos de células, tejidos o materiales que se encuentran en el tejido de un sujeto. Además, una célula o una población de células está "sustancialmente purificada" cuando al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más de las células en una muestra de células expresa los marcadores superficiales celulares de interés.

Las EC y las TSEC pueden aislarse disgregando una muestra de un órgano o tejido fuente adecuado. Por "órgano o tejido fuente" se entiende el órgano o tejido a partir del cual se obtienen las células. La disgregación puede llevarse a cabo fácilmente usando las técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen, aunque no de forma limitativa la disgregación mecánica y/o el tratamiento con enzimas digestivas y/o agentes quelantes que debilitan las conexiones entre las células adyacentes haciendo por tanto posible dispersar el tejido en una suspensión de células individuales sin rotura celular apreciable. Específicamente, la disociación enzimática se puede llevar picando el tejido y tratando el tejido picado con cualquiera de las numerosas enzimas digestivas, tanto solas como en combinación. Las enzimas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, tripsina, quimiotripsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa, ADnasa, pronasa, y/o dispasa. La rotura mecánica puede llevarse a cabo mediante numerosos métodos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el uso de equipos de molienda, mezcladoras, tamices, homogeneizadores, celdas de presión, sonicadores o trituración. Véase Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 2^a Ed., A. R. Liss, Inc., Nueva York, 1987, Capítulo 9, páginas 107 26.

Una vez que el tejido fuente se ha reducido a una suspensión de células individuales, la suspensión se puede fraccionar en subpoblaciones a partir de las cuales se pueden recuperar las EC y las TSEC. El fraccionamiento puede llevarse a cabo usando técnicas normalizadas para la separación celular que incluyen, aunque no de forma limitativa, clonación y la selección de tipos celulares específicos, destrucción selectiva de las células no deseadas (selección negativa), separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta, procedimientos de congelación-descongelación, propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, elutriación centrífuga (centrifugación contracorriente), separación por gravedad unitaria, distribución contracorriente, electroforesis y clasificación celular activada por fluorescencia. Véase Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, 2^a Ed., A. R. Liss, Inc., Nueva York, 1987, Capítulo 11 y 12, páginas 137 68.

Como etapa adicional en el aislamiento de las EC y las TSEC, se emplea la selección celular. La selección puede ser "positiva", cuando se utilizan características o marcadores de las EC y las TSEC para seleccionar las células, o puede ser "negativa", cuando se utilizan características de otros tipos de células en el tejido o el aglomerado centrifugado para excluir o eliminar aquellos otros tipos de células de las EC y las TSEC. Los tipos de procedimientos de clasificación incluyen el aislamiento mediante perlas magnéticas (MACS), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), y elutriación. Los marcadores específicos de endotelio que se pueden usar para la selección se han descrito anteriormente para las EC; La selección de las TSEC varía por el modelo de expresión de las TSEC deseadas.

El cultivo, la diferenciación, y la expansión. Las EC y las TSEC aisladas de acuerdo con la invención pueden cultivarse y diferenciarse a partir de una variedad de fuentes. Por ejemplo, las EC y las TSEC pueden diferenciarse de las células pluripotentes inducidas (IPC) (Yu *et al*, 2007), hemocitoblastos (HSC) u otros diversos citoblastos derivados de otras muestras celulares del sujeto que se va a tratar empleando métodos conocidos en la técnica. De manera similar, las EC y TSEC pueden obtenerse mediante diferenciación de una variedad de dichos citoblastos que no son autólogos. Las EC y las TSEC adicionales pueden diferenciarse de los embriocitoblastos humanos (HESC) (Butler, Cell stem cell 6:251-264 (2010b)). Las EC y las TSEC obtenidas pueden además transfectarse con E4ORF1 (Seandel, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105:19288-93 (2008)) para prolongar su vida.

Esta divulgación proporciona métodos para cultivar las EC y las TSEC, por ejemplo, como una población celular aislada para la activación de las TSEC, o para el trasplante para inducir o potenciar la regeneración del órgano. Las EC y las TSEC pueden aislarse de una muestra de tejido, como se ha descrito anteriormente y expandirse en cultivo.

5 Por ejemplo, Las EC o las TSEC pueden aislarse a partir de vasos sanguíneos de un tejido u órgano fuente, lavado con PBS (exento de Ca^{2+} , Mg^{2+}) y transferirse a placas de cultivo de tejidos revestidas con gelatina que contienen medio de crecimiento de células endoteliales (por ejemplo, Medio de crecimiento de células endoteliales EGM, Lonza, Inc.; o Medio de cultivo de células endoteliales, Becton Dickenson) de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante. Usando una hoja de escalpelo n.º 10 estéril, se realizan cortes de la sección transversal de 1 mm a lo
10 largo de la longitud de los vasos. se cortan en primer lugar los vasos más grandes longitudinalmente con tres incisiones, para abrir y aplanar el vaso, y a continuación se invierte para orientar la luz del vaso hacia la superficie de la placa de cultivo de tejidos. Inmediatamente después de la disección, se puede añadir adicionalmente medio de células endoteliales a capa placa. El medio de cultivo puede contener opcionalmente elementos del medio, por ejemplo, suero, tal como suero bovino, para obtener una concentración en el medio del 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 8 %, o
15 10 % o más de suero; factores de crecimiento tales como EGF, VEGF, FGF, y/o IGF; y agentes adicionales tales como hidrocortisona, ácido ascórbico, inhibidores de la tripsina, antibióticos, y/o heparina. Los cultivos se colocan en una atmósfera de CO_2 al 5% humidificada al 37 °C.

20 Las colonias de EC pueden ser evidentes en 5-21 días de cultivo. Tras el establecimiento de monocapas confluentes (óptimamente en 30 días), el medio de cultivo gastado se recogió y las monocapas de células endoteliales se lavaron vigorosamente con PBS (exentas de Ca^{++} , Mg^{++}), tripsinizadas (0,25 mg de tripsina/ml, 5 mmol/l de EDTA, 37 °C., 10 minutos; GIB-CO) y se subcultivaron en matraces de 75 cm² de gelatina revestida (Costar, Cambridge, Mass.) que contenían 20 ml de medio de cultivo de células endoteliales. Las monocapas de EC se alimentaron semanalmente con medio de cultivo y se pueden establecer varios pases de células primarias, y opcionalmente depositarse.
25

En una realización específica, Las TSEC en la forma de EC específicas de hígado (EC sinusoidales de hígado, o LSEC) se aíslan. Se puede llevar a cabo el aislamiento y la purificación de las LSEC, por ejemplo, mediante digestión con colagenasa del tejido hepático, seguido por separación de las LSEC sobre perlas magnéticas de unión específicas de marcadores de LSEC, como se describe en el Ejemplo 1, en "Aislamiento y cultivo de células de
30 ratón". El cultivo de LSEC aisladas se puede llevar a cabo como se describe en el Ejemplo 1, en "Determinación de la proliferación de hepatocitos en cultivo simultáneo con células endoteliales". Las LSEC se caracterizan como $\text{VEGFR3}^+\text{CD34}^+$, mientras que las EC no sinusoidales se caracterizan como $\text{VEGFR3}^+\text{CD34}^+$. Las LSEC se pueden aislar de tejidos fuente mediante el uso de perlas magnéticas específicas de los marcadores de LSEC
35 $\text{VEGFR3}^+\text{CD34}^+\text{VEGFR2}^+\text{VE-cadherina}^+\text{Factor VIII}^+$.

El cultivo de LSEC aisladas se puede llevar a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, en "Determinación de la proliferación de hepatocitos en cultivo simultáneo con células endoteliales". Por ejemplo, Las LSEC se pueden cultivar en un medio adecuado para cultivar EC (por ejemplo, medio E de Williams (Invitrogen)),
40 suplementado con factor-A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A_{164}) (por ejemplo, 5 ng ml⁻¹), y en algunas realizaciones, también con suero de feto de bovino (FBS, por ejemplo, 1 %). Los suplementos adicionales adecuados incluyen L-glutamina (por ejemplo, 2 mmol l⁻¹), dexametasona (por ejemplo, a 10⁻⁹ mol l⁻¹), estreptomycin (100 U ml⁻¹) y penicilina (100 U ml⁻¹). Las células se pueden cultivar durante unos pocos días a varias semanas, por ejemplo, al menos 5 días, hasta 2 o 3 semanas, para generar un número deseable de células. Un experto en la
45 materia entenderá que son aceptables las modificaciones de las condiciones de cultivo, con la condición de que el medio contenga elementos para mantener el cultivo de las LSEC según se desee, tales como la inclusión de VEGF-A y/o VEGF-E en el medio de cultivo.

En una divulgación, Se aíslan las TSEC en la forma de EC específicas de pulmón (EC capilares pulmonares, o PCEC). El aislamiento y purificación de las PCEC, así como el cultivo de las PCEC primarias, se pueden llevar a
50 cabo como para el tejido hepático como se ha descrito anteriormente, con separación de las PCEC mediante el uso de perlas magnéticas específicas de marcadores de las PCEC $\text{VE-cadherina}^+\text{VEGFR2}^+\text{FGFR1}^+\text{CD34}^+\text{CD31}^+$.

Se puede llevar a cabo el cultivo de PCEC primarias como para el tejido hepático como se ha descrito anteriormente, con la adición de FGF, VEGF-A, y/o VEGF-E al medio para generar las PCEC $\text{VE-cadherina}^+\text{VEGFR2}^+\text{FGFR1}^+\text{CD34}^+$.
55

TSEC inductivas y células precursoras endoteliales. Esta divulgación proporciona además TSEC inductivas. Una TSEC "inductiva" se refiere a una TSEC en la que está inducida o inducidas una o más actividades organogénicas.
60 Dichas actividades organogénicas incluyen, por ejemplo, la formación de vasculatura, la producción y liberación de "factores angiocrinos", que son factores de crecimiento paracrinos específicos de tejidos, y la inducción de la mitosis celular específica de tejidos y/o de la proliferación. En general, Las TSEC inductivas expresan la mayoría o todos los marcadores característicos de las TSEC descritas anteriormente en el presente documento, así como marcadores adicionales o marcadores. Por ejemplo, las LSEC inductivas pueden definirse mediante la expresión de $\text{VEGFR2}^+\text{VE-cadherina}^+\text{VEGFR3}^+\text{CD34}^+\text{factor VIII}^+\text{wnt2}^+$ y HGF^+ (factor de crecimiento de hepatocitos)⁺. Las PCEC
65 inductivas pueden definirse mediante la expresión de $\text{VEGFR2}^+\text{VE-cadherina}^+\text{CD34}^+\text{CD31}^+\text{FGFR1}^+\text{MMP14}^+$.

Para producir TSEC inductivas, Se pueden aislar las TSEC del tejido como se ha descrito anteriormente de acuerdo con los modelos de expresión específicos de tejidos, y activarse cultivándolos con factores de crecimiento específicos de tejidos. Por ejemplo, Se pueden activar las LSEC cultivándolas con VEGF-A y/o VEGF-E para activar las rutas de las LSEC VEGFR2/ Id1, mientras que se puede activar las PCEC cultivándolas con VEGF-A, FGF-2, EGF, y/o MMP14 para activarlas rutas de las PCEC VEGFR2/ FGFR1/ MAPK y producir PCEC inductivas.

Como alternativa, Se pueden aislar las TSEC inductivas a partir de tejidos escindidos quirúrgicamente mediante aislamiento de las TSEC que soportan marcadores inductores, por ejemplo, por selección positiva de las TSEC que soportan marcadores inductores mediante aislamiento de perlas magnéticas (MACS) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de acuerdo con marcadores específicos. La pérdida de órganos está sensibilizada por las TSEC y conduce a la activación de las TSEC para regenerar la pérdida de masa del tejido; por tanto, se pueden aislar las TSEC inductivas directamente de tejidos dañados o escindidos. Como un ejemplo específico, se pueden seleccionar directamente las LSEC inductivas en estos métodos mediante el aislamiento de las células VEGFR2⁺VE-cadherina⁺VEGFR3⁺CD34⁺factor VIII⁺wnt2⁺HGF⁺ de tejido hepático extraído quirúrgicamente. Como un ejemplo adicional, Se pueden seleccionar directamente las PCEC mediante el aislamiento de células VEGFR2⁺VE-cadherina⁺CD34⁺CD31⁺FGFR1⁺MMP14⁺ de tejido de pulmón extraído quirúrgicamente.

Las EC, las TSEC, y las TSEC inductivas, de acuerdo con la invención pueden ser autólogas, alogénicas, o xenogénicas para el sujeto que necesita la regeneración del órgano. Lo más preferentemente, los tipos celulares usados en la presente invención son autólogos. Se pueden aislar las células xenogénicas por ejemplo, a partir de animales transgénicos que expresan los marcadores celulares adecuados.

Interacciones de las TSEC y otras células específicas de tejidos no endoteliales que regeneran la masa del órgano. La presente divulgación proporciona TSEC inductivas que interactúan con células específicas de tejidos no endoteliales, *in vivo* e *in vitro*, para promover el crecimiento del tejido. La activación de las TSEC conduce a la inducción de la mitosis y a la proliferación de células específicas de tejidos no endoteliales. La proliferación de células específicas de tejidos no endoteliales es necesaria para la restauración de la masa y la función del órgano, y está impulsada en parte por las señales angiocrinas mediadas por las TSEC y el contacto célula a célula. Un ejemplo de una célula no endotelial específica del hígado es un hepatocito; los ejemplos de células no endoteliales específicas de pulmón incluyen células precursoras epiteliales alveolares (AEC, tales como células AECII) y BASC.

Por ejemplo, en el hígado, las LSEC inductivas estimulan la proliferación de hepatocitos mediante un proceso de "angiogénesis inductiva"; es decir, Las LSEC promueven la proliferación de hepatocitos mediante la producción angiocrina del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y Wnt2. Posteriormente a esta angiogénesis inductiva, las propias LSEC experimentan una "angiogénesis proliferativa" para cumplir con la demanda creciente en el suministro de sangre para el tejido hepático en regeneración.

Como un ejemplo adicional, Las PCEC inductivas estimulan la proliferación de las células precursoras epiteliales pulmonares que reconstruyen en conjunto los sacos capilares alveolares funcionales en el pulmón. En las fases tempranas de la regeneración del pulmón, la activación de VEGFR2 en las PCEC da lugar a la regulación positiva de las MMP14 y la expansión de las células precursoras epiteliales pulmonares. el nivel de expresión de las PCEC FGFR1 se indujo posteriormente a una activación de VEGFR2, FGFR1 entra en sinergia a continuación con VEGFR2 para aumentar la generación de MMP14, sosteniendo por tanto la regeneración alveolar. La activación secuencial de VEGFR2 y FGFR1 en las PCEC induce por tanto la regeneración de las unidades de capilares alveolares en parte por la producción de MMP14 que conduce a la proliferación de células precursoras epiteliales pulmonares.

Esta divulgación proporciona además métodos para cultivar simultáneamente las TSEC y otras células específicas de tejidos no endoteliales, para potenciar o inducir la regeneración del órgano. El cultivo de tejidos de células específicas de tejidos no endoteliales con TSEC puede aumentar los números de células de las células específicas de tejidos no endoteliales y las TSEC en cultivo. Por ejemplo, el cultivo simultáneo de las TSEC y las células específicas de tejidos no endoteliales se espera que aumente el número de las TSEC en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 % o más desde el número inicial de las TSEC sembradas en el cultivo. De forma alternativa o adicional, el cultivo simultáneo de células TSEC y células específicas de tejidos no endoteliales se espera que aumente el número de células específicas de tejidos no endoteliales en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 % o más desde el número inicial de células específicas de tejidos no endoteliales sembradas en el cultivo. Se conocen en la técnica métodos para determinar los números de células *in vitro*.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para expandir hepatocitos en cultivo cultivando simultáneamente dichos hepatocitos con células endoteliales sinusoidales del hígado. Para el cultivo simultáneo de LSEC con hepatocitos, se sembraron en placas 10.000 hepatocitos primarios aislados en una placa de 100 mm revestida con colágeno de tipo I y sembradas con 500.000 LSEC. Las condiciones del cultivo comprendían medio E de Williams (Invitrogen) suplementado con L-glutamina (2 mmol l⁻¹), suero de feto de bovino al 1 % (FBS), factor-A

de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A₁₆₄) (5 ng ml⁻¹), dexametasona a 10⁻⁹ mol l⁻¹, estreptomina (100 U ml⁻¹) y penicilina (100 U ml⁻¹). Se recogieron las células después de 2 semanas de incubación. La incubación simultánea de hepatocitos aislados con LSEC puede conducir a dos veces, tres veces, cinco veces, siete veces, o nueve veces o más de aumento en el número de hepatocitos.

Por lo tanto, esta divulgación proporciona métodos para expandir los hepatocitos en cultivo cultivando simultáneamente los hepatocitos con células endoteliales sinusoidales del hígado. Los inventores han determinado que el cultivo simultáneo de hepatocitos y LSEC conduce a la expansión de los hepatocitos. A continuación, dichos hepatocitos pueden prepararse para la administración a un sujeto que necesita de la regeneración del hígado.

En otra divulgación, la presente divulgación proporciona un método para expandir las células precursoras epiteliales del pulmón en cultivo, cultivando simultáneamente dichas células precursoras epiteliales del pulmón con células endoteliales capilares pulmonares. Para el cultivo simultáneo de las PCEC y las células precursoras epiteliales AECII SPC⁺ y BASC específicas de pulmón, se sembraron células precursoras epiteliales aisladas con 10 veces más PCEC en las condiciones de cultivo que se han descrito anteriormente, con la adición de c-Raf al medio de cultivo para generar EC activadas con MAPK (PEC Akt + MAPK). Para el cultivo simultáneo, las AECII SPC⁺ y BASC se sembraron en placas en placas no adherentes, y se sembraron 10 veces más de PCEC Akt + MAPK. Se añadió medio acondicionado procedente de las EC Akt⁺ MAPK a las AEC. Tras el cultivo simultáneo, las AECII, las BASC, y las PCEC se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis citométrico de flujo.

Tras la expansión en el cultivo, las TSEC y otras células específicas de tejidos no endoteliales se pueden preparar para la introducción en un sujeto que necesita la regeneración del órgano. Las TSEC cultivadas y/o las células específicas de tejidos no endoteliales se pueden cultivar en un medio consistente con el crecimiento de las células para la reintroducción en un sujeto humano, por ejemplo, utilizando medio de cultivo con componentes derivados de fuentes no animales para minimizar la respuesta inmunógena a las células reintroducidas. Dicho medio especializado y los componentes del medio están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Lonza, Inc.) y puede usarse de acuerdo con los protocolos del fabricante. Antes de la introducción en un sujeto, las células se lavan para eliminar el medio de cultivo residual y se formulan en una preparación celular para la administración a un sujeto. Como se usa en el presente documento, una "preparación celular" se refiere a una composición de TSEC, TSEC inductivas, EPC, y/o células específicas de tejidos no endoteliales que se pueden administrar a un sujeto. Una preparación celular puede opcionalmente combinarse con excipientes adicionales para formar una composición farmacéutica para la introducción en un sujeto.

Regeneración del órgano. La divulgación proporciona un método para potenciar o iniciar la regeneración de un órgano en un sujeto que lo necesita que comprende la administración de células endoteliales específicas de dicho órgano o células endoteliales inductivas específicas de dicho órgano, en el área del cuerpo en la que se desea la regeneración del órgano en dicho sujeto, en una cantidad suficiente para potenciar o iniciar la regeneración del órgano.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" incluye cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferentemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado, ovejas, caballos, o primates, y lo más preferente seres humanos. Los métodos y composiciones de la invención se pueden administrar a un mamífero, tal como un ser humano, pero también pueden ser otros mamíferos tales como animales que necesitan tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares). El sujeto tratado en los métodos de la invención es un sujeto en el cual se desea la regeneración de un órgano.

Como se usa en el presente documento, la expresión de "regeneración de un órgano" se refiere al crecimiento o al recrecimiento de un órgano, o de una porción de un órgano. Un resultado preferido de la regeneración de un órgano es la mejora de la restauración de la función del órgano. La regeneración del órgano se puede caracterizar, por ejemplo, en un aumento de las células específicas del órgano, el tejido específico del órgano, y/o la función específica del órgano, con respecto a la cantidad de células específicas del órgano, el tejido específico del órgano, y/o la función específica del órgano antes del tratamiento. Se puede determinar un aumento en las células específicas del órgano o en el tejido específico de órgano, por ejemplo, midiendo el número de células específicas de órgano, o midiendo la cantidad de tejido por masa o volumen, tras el tratamiento con los métodos y composiciones de la invención, y comparando dichas mediciones con las mediciones de las células específicas del órgano o el tejido antes del tratamiento. Las mediciones de la masa o el volumen del órgano pueden calcularse *in vivo*, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de diagnóstico de imágenes tales como IRM. El aumento en el número de células, la masa, o el volumen de un órgano tras el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención puede ser un aumento de al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 % o más del número de células, la masa, o el volumen, con respecto al número de células estimado o real, la masa, o el volumen de dicho órgano antes del tratamiento.

De manera similar, se puede determinar un aumento en la función específica del órgano midiendo uno o más

aspectos de la función del órgano tras el tratamiento con los métodos y las composiciones de la invención, y comparando dichas mediciones con las mediciones de la función del órgano antes del tratamiento. El aumento en la función específica del órgano tras el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención puede ser un aumento de al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 % o más en uno o más aspectos de la función del órgano, con respecto a uno o más aspectos de la función del órgano antes del tratamiento. Se conocen en la técnica los métodos para llevar a cabo dichas mediciones.

Como se usa en el presente documento, "potenciar" la regeneración del órgano se refiere a aumentar la cantidad del número de células, la masa, el volumen, o la función de un órgano que necesita la regeneración, o aumentar la velocidad de regeneración del órgano, en un sujeto donde algo de la regeneración del órgano puede producirse naturalmente, pero donde dicha regeneración del órgano que se produce naturalmente es inadecuada en la cantidad o velocidad de regeneración. Una cantidad inadecuada o velocidad de regeneración, por ejemplo, podría ser un aumento de menos del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, o 20 % del número de células específico de órgano, la masa, el volumen, o la función durante un periodo de 90 días. "Iniciar" la regeneración del órgano se refiere a aumentar la cantidad del número de células, la masa, o el volumen de un órgano que necesita la regeneración, o aumentar la velocidad de la regeneración del órgano, en un sujeto donde no se produce evidentemente la regeneración del órgano.

La presente divulgación proporciona además preparaciones y composiciones celulares que contienen EC específicas de tejidos, y TSEC inductivas, opcionalmente en combinación con un transportador biológicamente aceptable y opcionalmente además en combinación con células específicas de tejidos no endoteliales. Por ejemplo, Las células divulgadas en el presente documento pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones pueden incluir la preparación celular y un transportador adicional aceptable. Como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" se pretende que incluya cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración biológica. Los transportadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia convencional en el campo.

Los ejemplos preferidos de dichos transportadores o diluyentes incluyen, aunque no de forma limitativa, agua; solución salina; solución de dextrosa; albúmina sérica humana; HBSS y otras soluciones tamponadas (incluyendo aquellos con y sin Ca^{++} y Mg^{++}) conocidas por los expertos en las técnicas relevantes; y los medios basales. Se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente factores de crecimiento tales como VEGF-A, VEGF-E, FGF-2, EGF, o MMP14.

Para la regeneración del hígado, la composición farmacéutica en las realizaciones específicas incluye células $\text{VEGFR3}^+\text{CD34}^-\text{VEGFR2}^+\text{VE-cadherina}^+\text{Factor VIII}^+\text{Prox-1}^-\text{CD45}^-$. Para la regeneración del pulmón, la composición farmacéutica en las realizaciones específicas incluye células $\text{VE-cadherina}^+\text{VEGFR2}^+\text{FGFR1}^+\text{CD34}^-$.

Una preparación celular de acuerdo con la invención puede incluir TSEC, y TSEC inductivas, opcionalmente en combinación con células específicas de tejidos no endoteliales, y premezclarse o combinarse adicionalmente con una matriz extracelular sintética o biológica de apoyo o un material de matriz (EC M). Un experto en la materia reconocerá que el término "ECM" se refiere a un material no celular distribuido a través del cuerpo de organismos multicelulares. Dicha premezcla puede proporcionar una estructura principal para el crecimiento del tejido del órgano. El ECM está comprendido por diversos constituyentes tales como glicoproteínas, proteoglicanos, carbohidratos complejos, y otras moléculas. Las funciones principales del ECM incluyen, aunque no de forma limitativa, proporcionar un soporte estructural, una resistencia o atenuación a la tracción; proporcionar sustratos y rutas para la adhesión celular y la migración celular; y regular la diferenciación celular y la función metabólica. Las proteínas ECM incluyen, por ejemplo, colágeno, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos, vitronectina, tromboespondina, tenascina (citoactina), entactina (nidogen), osteonectina (SPARC), ancorina CII, condronectina, proteína de unión, osteocalcina, sialoproteína ósea, osteopontina, epinectina, hialuronectina, componente P amiloide, fibrilina, merosina, s-laminina, undulina, epiligrina, y kanilina. Las proteínas ECM preferidas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen colágeno, alginato, agarosa, fibrina, pegamento de fibrina, fibrinógeno, laminina, fibronectinas, HSP, quitosano, heparina y/u otros polímeros sintéticos o estructuras principales de polímeros.

Las composiciones o las preparaciones pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden comprender agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, agentes estabilizantes y/o dispersantes. Las composiciones o preparaciones pueden prepararse alternativamente como un injerto que se va a administrar, por ejemplo, a un área

afectada durante un procedimiento quirúrgico, tal como de forma inmediatamente posterior a la eliminación de un órgano afectado o una porción del mismo.

5 La administración de una composición de acuerdo con la invención se lleva a cabo de acuerdo con una variedad de factores, incluyendo la especie, la edad, el peso, el sexo, y la dolencia médica del paciente; el tipo y la gravedad de órgano dañado o enfermo para el cual se desea la regeneración; la ruta de administración; y las células concretas empleadas. Un médico o veterinario normalmente experto puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz requerida para potenciar o inducir la regeneración del órgano.

10 Como se usa en el presente documento, una "cantidad suficiente" es la cantidad de células o composición farmacéutica que se va a administrar a un sujeto para conseguir un aumento en las células específicas de órganos, el tejido específico del órgano, y/o la función específica del órgano, como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, el tratamiento con los métodos o las composiciones de la invención puede aumentar el número de células específicas de órganos, la masa, el volumen, o la función, en más de un 1 %, más de un 2 %, más de un 5 %, más
15 de un 10 %, o más de un 20 % durante un periodo de 180 días, con respecto a la cantidad del número de células específicas de órganos, la masa, el volumen, o la función previa al tratamiento.

Las TSEC, las TSEC inductivas, o las composiciones de la invención se administran a pacientes en cantidades suficientes para tratar al paciente, como puede determinarse por un técnico experto. Los números de células necesarios para el tratamiento dependerán de numerosos factores que incluyen el tipo de órgano, el tamaño (o el área) de la pérdida o el componente del órgano dañado como se determina usando una técnica médica de diagnóstico por imágenes tal como IRM, la edad y/o el peso del paciente, y similares. En general, se espera que los números de células que estén en el intervalo de 1×10^6 a 10×10^6 , y más preferentemente 2×10^6 a 8×10^6 puedan administrarse a los pacientes. dependiendo por tanto del paciente concreto y del órgano que se va a tratar, el número de células administradas puede ser de aproximadamente 2×10^6 , aproximadamente 3×10^6 , aproximadamente 4×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 6×10^6 , aproximadamente 7×10^6 , o aproximadamente 8×10^6 . Estas cantidades pueden referirse al número total de TSEC, o al total de todas las células administradas al sujeto, por ejemplo, si se administran simultáneamente las TSEC con otras células específicas de tejidos no endoteliales, como en la administración simultánea hepática de las LSEC y los hepatocitos. En una realización adicional, los factores de crecimiento de las TSEC, tales como VEGF para la activación de las LSEC, o EGF para la activación de las PCEC, se administran durante o después de la administración de las TSEC a un sujeto.

Tras la administración de las células o las composiciones de acuerdo con la invención, se puede medir la regeneración del órgano por el aumento en el número de células, la masa o el volumen del órgano, y/o la función del
35 órgano, como se ha descrito anteriormente.

En una realización de la invención, una composición farmacéutica o preparación celular de la invención se administra durante o después de la escisión quirúrgica de un órgano, por ejemplo, durante o después de hepatectomía o pneumonectomía.

40 **Regeneración específica del hígado.** La divulgación proporciona métodos para potenciar la regeneración del hígado. Una realización de la invención proporciona un método para potenciar la regeneración del hígado en un mamífero que lo necesita que comprende la administración intrahepática de las células endoteliales específicas del hígado o las células endoteliales inductivas específicas del hígado.

45 La enfermedad hepática que conduce a la degeneración del hígado puede ser carcinoma hepatocelular, cirrosis hepática, fibrosis hepática y hepatitis. La fibrosis hepática se refiere al crecimiento de tejido cicatrizado en el hígado debido a cualquiera de una variedad de ataques crónicos tóxicos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, alcoholemia crónica; exposición crónica a fármacos (por ejemplo, acetaminofeno, amiodarona, aspirina, azatioprina, isoniazid, metildopa, metotrexato, mitofurantoína, propiltiouracilo, estatinas, y sulfonamidas); exposición crónica a determinados agentes químicos (por ejemplo, tetracloruro de carbono, dimetil nitrosamina, cloruro de vinilo, bifenilos policlorados, aflatoxinas, y pesticidas); infección con *Schistosoma mansoni*; diabetes; trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis lupoide), y enfermedad inflamatoria del intestino; y otras dolencias. La cirrosis hepática es una dolencia degenerativa que la que se deteriora el parénquima hepático, los lóbulos se infiltran con grasa y se forma tejido conector perilobular denso. Como resultado, el suministro de sangre a las células restantes se reduce conduciendo a una hipertensión portal y eventualmente a la muerte. Además, existen algunas enfermedades genéticas, tales como la enfermedad de Wilson, HHC, y deficiencia de alfa-1 anti-Tripsina, que produce al hígado una disfunción, y puede producir cirrosis o hepatitis crónica.

60 Esta divulgación proporciona además métodos para potenciar o iniciar la regeneración del hígado, que comprenden la administración de VEGF, solo o en combinación con la administración de las LSEC. Los inventores han descubierto que las LSEC expresan VEGFR2 y VEGFR3 en el hígado, y la administración de VEGF-A y/o VEGF-E induce la activación de las LSEC, la estimulación mediada por Las LSEC de la proliferación de hepatocitos, la proliferación de las LSEC, la regeneración del hígado, y la revascularización del hígado.

65

5 La presente divulgación proporciona además métodos para potenciar o inducir la regeneración del hígado mediante la administración de VEGF-A, VEGF-E o FGF-2, y/o un agonista de Id1, a un sujeto que lo necesita. Los inventores han determinado que estos factores de crecimiento promueven la organogénesis mediante la inducción de hepatocitos y la regeneración de las LSEC y la angiogénesis en la regeneración de tejidos, promoviendo por tanto la función hepática normal.

10 La presente divulgación proporciona además métodos para potenciar o inducir la regeneración del hígado mediante la administración intrahepática de las LSEC. Los inventores han encontrado que las LSEC inducen los hepatocitos a proliferar y formar nuevos tejidos. Tras la inducción de la proliferación de hepatocitos, Las propias LSEC proliferan para proporcionar soporte vascular para la regeneración de tejidos.

15 La presente divulgación proporciona también un método para mejorar la función hepatovascular en un sujeto que padece una función hepática reducida, que comprende el cotrasplante intrahepático de hepatocitos con las LSEC, particularmente LSEC *VEGFR2⁺Id1⁺*.

20 Como se usa en el presente documento, la frase "función hepática" se refiere a una función del hígado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, síntesis de proteínas tales como proteínas séricas [por ejemplo, albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (por ejemplo, alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, gamma-glutamyltranspeptidasa, etc.], síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol, y síntesis de ácidos biliares; la función metabólica del hígado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el metabolismo de los carbohidratos, el metabolismo de los aminoácidos y del amoniaco, el metabolismo hormonal, y el metabolismo de los lípidos; la detoxificación de fármacos exógenos; función de esfuerzo del colesterol, ácidos biliares, fosfolípidos y bilirrubina; y la función hemodinámica, incluyendo la hemodinámica esplácnica y portal.

25 Regeneración específica del pulmón. La presente divulgación proporciona métodos para potenciar o inducir la regeneración del pulmón. La solicitud divulga un método para inducir la regeneración pulmonar o alveolar en un mamífero que lo necesita que comprende la administración intravenosa o intratraqueal de células endoteliales capilares pulmonares (PCEC) o PCEC inductivas, en una cantidad suficiente para potenciar o inducir la regeneración del pulmón.

30 La solicitud divulga además un método para inducir la alveolarización en un mamífero que lo necesita mediante la administración intravenosa o intratraqueal de PCEC o EC que expresan MMP14.

35 Se divulga además un método para inducir la alveolarización en un mamífero que lo necesita administrando MMP14.

Se divulga además un método para inducir la alveolarización en un mamífero que lo necesita mediante la administración intravenosa o intratraqueal de PCEC que expresan el factor de crecimiento epitelial (EGF) o los ligandos del receptor del EGF, incluyendo HB-EGF y el fragmento de tipo EGF-de la laminina5 y2.

40 Se divulga además un método para inducir la alveolarización en un mamífero que lo necesita administrando EGF.

Se divulga además un método para inducir la alveolarización en un mamífero que lo necesita mediante la administración de VEGF-A, VEGF-E o FGF-2 para la activación de VEGFR2 o FGFR1 expresada en las PCEC.

45 La regeneración del pulmón inducida por los métodos divulgados será útil en el tratamiento de diversas enfermedades y lesiones pulmonares donde la función pulmonar está deteriorada o la capacidad pulmonar está reducida. Estos métodos serán útiles para la regeneración del tejido pulmonar tras una escisión quirúrgica de tejido pulmonar dañado, enfermo, o canceroso. Estos métodos serán además útiles, por ejemplo, para enfermedades pulmonares que implican la inflamación y/o la muerte prematura de células endoteliales. Las enfermedades pulmonares que podrían tratarse con estos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, síndrome de la dificultad respiratoria del adulto (ARDS), ARDS postraumático, enfisema, síndrome de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica, asma, enfisema, hipoplasia del pulmón, hipertensión pulmonar, fibrosis quística, cáncer de pulmón, asma, trauma pulmonar, u otras anomalías pulmonares genéticas o congénitas, por ejemplo, quistes broncogénicos, agénesis e hipoplasia pulmonar, lóbulo polialveolar, displasia alveolocapilar, secuestro que incluye malformación arteriovenosa (AVM) y síndrome de la cimitarra, linfangiectasis pulmonar, o enfisema lobular congénito.

60 La lesión del pulmón puede ser una lesión pulmonar inducida químicamente. La lesión pulmonar puede estar producida por una enfermedad pulmonar. La lesión pulmonar puede estar producida por al menos una dolencia seleccionada entre el grupo que consiste en: fibrosis pulmonar, sarcoidosis, asbestosis, aspergiloma, como pergilosis, neumonía, tuberculosis pulmonar, enfermedad pulmonar reumatoide, bronquiectasis, bronquitis, displasia broncopulmonar o enfermedad pulmonar intersticial.

65 Como se usa en el presente documento, las frases "función del pulmón" y "función pulmonar" se refieren a una función de los pulmones y/o sistema pulmonar, incluyendo, aunque no de forma limitativa, la respiración, captación de oxígeno, expiración del CO, aspiración, intercambio de gases, y producción de moco y secreciones bronquiales.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como limitantes de ningún modo.

Ejemplo 1. Regeneración hepática

Indicadores transgénicos y animales con direccionamiento genético

Se obtuvieron ratones C57BL/6J de los Jackson Laboratories. Se adquirieron ratones VEGFR2-GFP de J. Rossant (Ema, Blood 107:111-117 (2006)). Se generaron ratones $Id1^{-/-}$ como se ha descrito anteriormente (Nam, Cell Stem Cell 5:515-526 (2009)) y se obtuvieron de R. Benezra y D. Lyden.

Se generó un ratón $VEGFR2^{lox/loxP}$ por T. N. Sato y se llevaron a cabo experimentos con ratones VEGFR2 inactivados génicamente inducibles, específicos de endotelio como se ha descrito anteriormente (Hooper, Cell Stem Cell 4:263-274 (2009)). En resumen, los ratones $VEGFR2^{loxP/loxP}$ se reprodujeron a continuación con ratones $RosaCre-ER^{T2}$ transgénicos para establecer la línea $RosaCre-ER^{T2}VEGFR2^{loxP/loxP}$ y la línea $RosaCreER^{T2}VEGFR2^{loxP/+}$ del control para tener en cuenta la toxicidad potencial mediada por Cre. Para inducir la inactivación génica de VEGFR2 específica de células endoteliales, ratones $VE-cadherina-CreER^{T2}$ proporcionados por L. Iruela-Arispa se cruzaron también con ratones $VEGFR2^{loxP/loxP}$ para generar ratones $VE-cadherina-CreER^{T2}VEGFR2^{loxP/loxP}$. Para inducir la ablación génica de VEGFR2, ratones macho de 6 a 8 semanas de edad se trataron con tamoxifeno a una dosis de 250 mg kg⁻¹ de aceite de girasol intraperitonealmente durante 6 días, interrumpida durante 3 días después de la tercera dosis. Después de 3 días de descanso, la cuarta dosis se recuperó durante 3 días más, dando como resultado ratones $RosaCreER^{T2}VEGFR2^{fl/lox}$ ($VEGFR2^{fl/fl}$) que eran deficientes en VEGFR2 en ambos alelos, los ratones $RosaCreER^{T2}VEGFR2^{fl/+}$ del control o los ratones $VE-cadherina-CreER^{T2}VEGFR2^{fl/fl}$ que tenían una inactivación génica de VEGFR2 específica de células endoteliales. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo bajo las directrices establecidas por the Institutional Animal Care and Use Committee.

Se usó un modelo de hepatectomía parcial del 70 % para inducir la regeneración fisiológica del hígado en ratones. Se resecaron los tres lóbulos más anteriores (lóbulos medial derecho, medial izquierdo y lateral izquierdo), que comprende un 70 % del peso del hígado, sin alterar el suministro de sangre a los lóbulos caudado y derecho. Se anestesiaron los ratones mediante 100 mg kg⁻¹ de ketamina intraperitoneal y 10 mg kg⁻¹ de xilazina. Se llevó a cabo una laparotomía mediana en los ratones anestesiados. Tras abrir el abdomen superior y exponer el hígado, el lóbulo izquierdo que se iba a resecar se levantó suavemente a la vez que se colocó un lazo de sutura de seda 5-0 (Roboz) por debajo del lóbulo y se situó tan próximo al origen del lóbulo como fue posible. Los dos extremos de la sutura se ataron sobre la parte superior del lóbulo hepático en la base del lóbulo próxima a la vena cava inferior. Se ataron tres nudos, y se usaron tijeras de microdissección para cortar el lóbulo atado exactamente distal a la sutura. se repitió este proceso para los otros lóbulos medianos para llevar a cabo una hepatectomía parcial del 70 %. A continuación se reaproximó el peritoneo con una sutura de seda 5-0 abierta y se cerró la piel con un sutura de seda 4-0 abierta.

Los ratones operados de forma simulada experimentaron una laparotomía sin resección hepática. Para caracterizar la regeneración de la masa y la función hepática, se midieron los pesos de los lóbulos hepáticos residuales y se normalizaron para el peso corporal de ratón en diversos puntos temporales, días después de la hepatectomía parcial, y se evaluaron los niveles de bilirrubina en plasma (Genzyme Diagnostics) después de la hepatectomía parcial del 70 %, respectivamente. para comparar el modelo de hepatectomía parcial con el modelo de lesión hepática inducido por CCl₄, se inyectó CCl₄ como se ha descrito anteriormente (LeCouter, Science 299:890-893 (2003)). Para ensayar la regeneración del hígado promovida por VEGF-A o PIGF, se trataron los ratones con 15 µg kg⁻¹ de VEGF₁₆₄ recombinante (Biovision) y las mismas cantidades de PIGF (Biovision) 12 h antes de la operación y dos veces al día posteriormente. Los ratones $Id1^{-/-}$ y las crías de camada naturales se sometieron también a un tratamiento con VEGF₁₆₄ y PBS similar antes y después de la operación.

Inmunofluorescencia hepática y detección de GFP

$VEGFR2-GFP$, $VEGFR2^{fl/fl}$, Ratones $Id1^{-/-}$ y crías de camada del control se sometieron a hepatectomía parcial o a operación simulada, se perfundieron con paraformaldehído al 4 %, se crioprotegieron y se congelaron instantáneamente en OCT. Para el análisis de la microvasculatura del hígado, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 2 mg kg⁻¹ de lectina de *Griffonia simplicifolia* (isolectina B4, Invitrogen) 5 min antes del sacrificio, como se ha descrito anteriormente (Hooper, Cell Stem Cell 4:263-274 (2009)). Para la microscopía de inmunofluorescencia, se bloquearon las secciones hepáticas (10 µm) (suero de burro al 5 %/Triton X-100 al 0,3 %) y se incubaron en anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGFR3 (mAb, mF4-31C1, 10 µg ml⁻¹, ImClone), Ab policlonal dirigido contra VE-cadherina (pAb, 2 µg ml⁻¹, R&D Systems), mAb dirigido contra CD34 (553731, 5 µg ml⁻¹, BD Biosciences), anticuerpo dirigido contra fosfo-Histona H3 (Millipore) y anticuerpo dirigido contra HNF4A (Abcam). Tras la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo (2,5 µg ml⁻¹, Jackson ImmunoResearch), se contratificaron las secciones con TOPRO3 o DAPI (Invitrogen).

Se midió la proliferación de células hepáticas *in vivo* mediante la captación de BrdU. En resumen, los ratones recibieron una única dosis de BrdU (Sigma) intraperitonealmente 60 min antes del sacrificio (a una dosis de 50 mg kg⁻¹ de peso animal). En el momento de la muerte, se anestesiaron los ratones, se recogió la sangre de la vena cava inferior, y se retiraron los lóbulos hepáticos restantes, se pesaron y se procesaron adicionalmente. Se tiñeron las criosecciones usando el Sistema de detección de BrdU (BD Biosciences) y anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo (2,5 µg ml⁻¹, Jackson ImmunoResearch).

Adquisición de imágenes y análisis de imágenes

Se capturaron imágenes inmunohistoquímicas de las secciones del hígado con el software AxioVision (Zeiss) montado en un microscopio Olympus BX51 (Olympus America). Se capturaron imágenes de inmunofluorescencia en un microscopio AxioVert LSM510 o un microscopio 710 confocal (Zeiss). Se analizaron las imágenes digitales para la determinación de la densidad del marcador endotelial (VE-cadherina⁺) y los vasos perfundidos funcionales (isolectina⁺) utilizando Image J (National Institutes of Health). Se expresó la densidad de los vasos mediante el porcentaje de componentes positivos del área total en cada campo de alta potencia, X400.

Aislamiento y cultivo de células de ratón

Se aislaron hepatocitos, LSEC, células estrelladas y células de Kupffer a partir de ratones que experimentaron una operación simulada y una hepatectomía parcial, mediante una técnica de perfusión de la colagenasa en dos etapas con modificadores (Tam, *Nature Med.* 12:793-800 (2006); Passino, *Science* 315:1853-1856 (2007); Kumar, *J. Clin. Invest.* 116:512-520 (2006); Winau, *Immunity* 26:117-129 (2007); Kreamer, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22:201-211 (1986)). En resumen, después de canular la vena cava inferior y se cortó la vena porta, se perfundió el hígado a 5 ml min⁻¹ a través de la vena cava inferior con Medio de perfusión hepática (Invitrogen) a 37 °C durante 10 min, seguido por perfusión con medio de digestión hepática (Invitrogen) durante 10 min más. Se disoció el hígado en medio de lavado de hepatocitos (Invitrogen), se pasó a través de tela de dracón con poros de 70-µm y se separó de la fracción agotada de hepatocitos no parenquimales (NPC) mediante centrifugación a baja velocidad (50 g X 5 min), que se purificaron adicionalmente mediante centrifugación en gradiente percoll, usando solución madre de percoll como se ha descrito anteriormente (Kreamer, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22:201-211 (1986)). El sobrenadante que contenía NPC se recogió y se lavó dos veces a 50 g durante 5 min, se aglomeró a 350 g durante 7 min y se fraccionó con centrifugación mediante gradiente de Percoll (900 g X 20 min) con una solución madre de Percoll al 75 % y una solución madre de Percoll al 35 %, como se ha descrito anteriormente (Kreamer, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22:201-211 (1986)). Se enriquecieron las fracciones que contenían LSEC, se mezclaron con un volumen igual de PBS y se centrifugaron a 900 g durante 7 min. El aglomerado se lavó con DMEM (Invitrogen) a 350 g durante 7 min y se marcó adicionalmente mediante perlas magnéticas de unión a LSEC de ratón (Miltenyi). La purificación de las LSEC se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se llevó a cabo la purificación de células estrelladas y de Kupffer como se ha descrito anteriormente (Passino, *Science* 315:1853-1856 (2007); Kumar, *J. Clin. Invest.* 116:512-520 (2006); Winau, *Immunity* 26:117-129 (2007)).

Análisis citométrico de flujo, identificación y cuantificación de las LSEC

Se conjugaron monoclonales purificados se conjugaron con colorantes de Alexa Fluor o Qdots según los protocolos del fabricante (Molecular Probes/Invitrogen). Los hepatocitos purificados-NPC agotados se analizaron en LSRII-SORP (BD). Se procesaron los datos con software FACSDiva 6.1 (BD). Se excluyeron los dobletes mediante el análisis de FSC-W x FSC-H y SSC-W x SSC-H, los canales teñidos individualmente se usaron para la distensibilidad y los controles de los fluoróforos menos uno se usaron para la clasificación. Se adquirieron anticuerpos monoclonales de BD excepto cuando se señalaron: VE-cadherina (BV13, ImClone); VEGFR3 (mF4-31C1, ImClone); VEGFR2 (DC101, ImClone); CD45 (30-F11, BD Biosciences); CD34 (14-0341, eBioscience).

Para la cuantificación de las LSEC, los hígados se prepararon mecánicamente como anteriormente y se cuantificó el número de SEC tiñendo simultáneamente con anticuerpos conjugados VEGFR2, VEGFR3, VE-cadherina, CD34. El número de SEC iguales al número de células VEGFR3⁺CD34⁺VEGFR2⁺VE-cadherina⁺. las células VEGFR3⁺CD34⁺VEGFR2⁺VE-cadherina⁺ se puntuaron como sin SEC.

Determinación de la proliferación de hepatocitos en cultivo simultáneo con células endoteliales

Las LSEC humanas eran de ScienCell Research Laboratories. Para inactivar génicamente *Id1* selectivamente en las LSEC, Se generaron lentivirus con ARN de horquilla corta mezclado con *Id1* (ARNsh) transfectando simultáneamente 15 µg del vector lentivirico lanzadera que contenía el ARNsh mezclado con *Id1*, 3 µg de pENV/VS-V-G, 5 µg de pRRE y 2,5 µg de pRSV-REV en células 293T por Fugene 6 (Roche Applied Science). Los sobrenadantes víricos se concentraron mediante ultracentrifugación. Estas preparaciones víricas concentradas se usaron para transducir las LSEC o los hepatocitos.

Para los estudios de cultivos simultaneos, se sembraron en placas 10.000 hepatocitos primarios aislados en una placa de 100 mm revestida con colágeno de tipo I, sembradas con 500.000 de LSEC, o con LESC tratadas con

ARNsh de lentivirus mezclado con *Id1*, respectivamente. Las condiciones del cultivo consistieron en medio E de Williams (Invitrogen) suplementado con L-glutamina (2 mmol l⁻¹), suero de feto de bovino al 1 % (FBS), factor-A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A₁₆₄) (5 ng ml⁻¹), dexametasona a 10⁻⁹ mol l⁻¹, estreptomina (100 U ml⁻¹) y penicilina (100 U ml⁻¹). Se recogieron las células de cada grupo después de 2 semanas. Para visualizar las LSEC y los hepatocitos, se marcaron las LSEC mediante el lentivirus mCherry // (en la estructura principal de pCCL) como se ha descrito anteriormente, y se infectaron los hepatocitos con lentivirus GFP. Se recogió también el medio acondicionado de 500.000 LSEC cultivadas durante 2 semanas, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se añadió a 10.000 hepatocitos a una dilución 1:2, en ausencia de un cultivo simultáneo de LSEC. Se evaluaron las cantidades de LSEC y hepatocitos mediante el análisis citométrico de flujo de ñas señales de mCherry y GFP. Se cuantificó la proliferación de hepatocitos comparando el número de hepatocitos recuperados con el número de hepatocitos inicialmente sembrados.

Análisis afimétrico y análisis cuantitativo de la PCR en tiempo real

El ARN se aisló recientemente del hígado usando RNeasy (Qiagen) y se convirtió en ADN complementario utilizando Superscript II (Invitrogen). Se llevó a cabo la micromatriz usando U133 2.0 (Affymetrix). Los detalles de los métodos para la determinación de la calidad del ARN, el marcado de la muestra, la hibridación y el análisis de la expresión estuvieron de acuerdo con el Kit de la Micromatriz Affymetrix. Se llevó a cabo la PCR cuantitativa usando los sistemas de expresión génica Taqman para VEGFR2 de ratón, VEGFR3, *Id1*, HGF, *Wnt2*, *Wnt9B* y *TM* (Applied Biosystems).

Trasplante de hígado de LSEC regeneradoras

Se llevó a cabo una hepatectomía parcial multilobular al 70 % en ratones (*Id1*^{+/+}) silvestres y en ratones *Id1*^{-/-} que correspondían en edad y sexo. Cuarenta y ocho horas después de la hepatectomía parcial, se aislaron las LSEC de los ratones silvestres (LSEC regeneradoras de *Id1*^{+/+}) y se marcaron mediante la transducción del lentivirus GFP (en la estructura principal de pCCL) como se ha descrito anteriormente. Se modificó el procedimiento de trasplante a partir del anteriormente descrito (Follenzi, J. Clin. Invest. 118, 935-945 (2008)). En resumen, 48 h después de la hepatectomía parcial, se anestesiaron los ratones *Id1*^{-/-} y se colocaron en la posición de decúbito lateral derecho. El flanco izquierdo se restregó con Betadine y se realizó una incisión en la piel y la pared abdominal longitudinalmente (paralela a la espina dorsal). Después se exteriorizó el bazo, se inyectaron LSEC regeneradoras de *Id1*^{+/+} en el parénquima del bazo a través de una aguja de calibre 27. Se llevó a cabo una esplenectomía tras la inyección. Para comparar el efecto de rescate de las LSEC regeneradoras de *Id1*^{+/+}, *Id1*^{-/-} y los ratones silvestres se sometieron también a una inyección intraesplénica de PBS y a esplenectomía 2 días después de la hepatectomía parcial (trasplante simulado). Para introducir la expresión de *Wnt2* y HGF en las LSEC, los ADN complementarios de *Wnt2* y HGF se adquirieron de Open Biosystems y se clonaron en el vector lentivírico como se ha descrito anteriormente. La infección de las LSEC con el virus que codificaba *Wnt2* o HGF o las mismas cantidades de *Wnt2* y HGF mixtos, se llevaron a cabo con la infección del lentivirus GFP.

Análisis de los datos

Todos los datos se presentaron como la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos separados. Se ensayaron las diferencias entre los grupos para la significancia estadística usando el test de la t de Student o el análisis de la varianza. La significancia estadística se ajustó a P < 0.05.

Hepatectomía parcial y regeneración hepática.

Los inventores utilizaron un modelo de hepatectomía parcial fisiológicamente relevante para elucidar el papel instructor de las LSEC en la mediación de la regeneración hepática (Fig. 1A). En contraste con la administración de sustancias químicas hepatóxicas, que perjudican la organización de las LSEC t dan lugar a la hipoxia del tejido, la muerte celular y la inflamación (Lee, Hepatology 45:817-825 (2007); LeCouter, Science 299:890-893 (2003); Friedman, Physiol. Rev. 88:125-172 (2008)), en el modelo de hepatectomía parcial, la resección del 70 % de la masa hepática sin perturbar la integridad de la vasculatura hepática residual (Greene, Ann. Surg. 237:530-535 (2003)) activa la regeneración de hepatocitos (Fausto, Hepatology 43:S45-S53 (2006); Michalopoulos, Science 276:60-66 (1997); Greenbaum, J. Clin. Invest. 102:996-1007 (1998)). Como tal, este modelo proporciona un modelo instructor para interrogar el papel de las LSEC estructural y funcionalmente intactas en el apoyo de la regeneración del hígado.

VEGF está implicado en la regeneración del hígado

Como la familia de VEGF juega un papel en la regeneración de las SEC de la médula ósea (Hooper, Cell Stem Cell 4:263-274 (2009); Ferrara, Nature Med. 9:669-676 (2003); Carmeliet, Nature 438:932-936 (2005); Alitalo, Nature 438:946-953 (2005)), los inventores han teorizado que los receptores de VEGF, incluyendo VEGFR2 o VEGFR3, modulan también la función de las LSEC. Por lo tanto, los inventores utilizaron ratones *VEGFR2-GFP*, en los que la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) está impulsada por el promotor nativo de VEGFR2, para demostrar que VEGFR2 y VEGFR3 se expresan exclusivamente en las células endoteliales del hígado. A diferencia de ello, los inventores descubrieron que VEGFR2 y VEGFR3 no se expresan en otros tipos de células del hígado,

tales como hepatocitos del factor nuclear 4 α , hepatocitos (HNF4A)⁺ (Fig. 2A). De forma notable, la distribución de la expresión de VEGFR3 está restringida a las LSEC VEGFR2⁺ que se ramifican a partir de los grandes vasos de CD34⁺VEGFR3⁻. La expresión de VEGFR3 no es típica de las EC que forman el sistema vascular más grande, tales como arterias y venas que transportan sangre alrededor del cuerpo. Por lo tanto, la expresión de VEGFR3 en las LSEC distingue las LSEC de las EC que no son específicas de órganos. (Fig. 2B).

La identificación de fenotipos de expresión única de las LSEC permite la cuantificación específica de células, la purificación y el perfilado molecular

Los inventores llevaron a cabo un análisis citométrico de flujo polivariante en células sin parénquima (NPC) para demostrar la expresión del marcador VE-cadherina específico de endotelio en LSEC VEGFR3⁺VEGFR2⁺CD45⁻ no hematopoyéticas. Los inventores descubrieron que el 97,6 % de estas células son células endoteliales Prox1⁺CD34⁻ que expresan el factor de coagulación VIII (Fig. 2C, D). Las células Prox1⁺CD34⁻ no son células linfáticas. (Alitalo, Nature 438:946-953 (2005)). Esto designa una única firma fenotípica y operativa para las LSEC de ratones adultos como vasos VEGFR3⁺CD34⁻VEGFR2⁺VE-cadherina⁺Factor VI-II⁺Prox-1⁺CD45⁻, lo que las distingue de las células endoteliales no sinusoidales VEGFR3⁻CD34⁺VEGFR2⁺VE-cadherina⁺CD45⁻ y de las células endoteliales linfáticas VEGFR3⁺CD34⁺Prox-1⁺Factor VIII⁺CD45⁻. La identificación de las LSEC como VEGFR3⁺CD34⁻ y de las células endoteliales no sinusoidales como VEGFR3⁻CD34⁺ es suficiente para la cuantificación, purificación y perfilado molecular de las LSEC procedentes de EC no sinusoidales.

Identificación de interacciones regeneradoras entre hepatocitos y LSEC

Para determinar el mecanismo por el cual las LSEC regulan la proliferación hepática, los inventores ensayaron la cinética regeneradora de los hepatocitos y las LSEC tras una hepatectomía parcial. Los inventores descubrieron que, dos días después de la hepatectomía parcial, los hepatocitos mitóticos P-H3⁺E-cadherina⁺ se situaron cerca de las LSEC no proliferantes, como se desveló por la tinción con la VE-cadherina, el marcador epitelial de hepatocitos (E)-cadherina y el marcador mitótico histona-3 fosforilada (P-H3; Fig. 2E). Esto sugiere que las LSEC liberan señales de crecimiento angiogénicas para inducir la mitosis y la proliferación de hepatocitos. Los inventores descubrieron que, tras la etapa inicial de señalización angiogénica de las LSEC después de la hepatectomía parcial, se observa la proliferación de las LSEC en el día 4 y una meseta en el día 8 (Fig. 2F). En contraste con la proliferación de LSEC, los inventores determinaron que los máximos de proliferación de los hepatocitos fueron en los primeros 4 días, y los niveles disminuyeron en el día 8, como se muestra por la cuantificación de los hepatocitos P- H3⁺HNF4A⁺ (Fig. 2G).

Estos resultados desvelan una contribución cronológicamente bifásica de las LSEC en la mediación de la reconstrucción hepática. En las fases tempranas de la hepatectomía parcial (días 1-3 después de la hepatectomía parcial), la angiogénesis inductiva en las LSEC no proliferativas estimula la regeneración hepática, por ejemplo, mediante la liberación de factores angiocrinos. Tras la etapa inicial de la proliferación de hepatocitos, en este modelo, 4 días después de la hepatectomía parcial, las LSEC proliferan para satisfacer la demanda creciente del suministro de sangre para la regeneración del hígado.

Por lo tanto, los inventores han determinado que, después de la hepatectomía parcial, las LSEC del hígado (LSEC) estimulan la proliferación de hepatocitos mediante un proceso de la "angiogénesis inductiva"; es decir, las LSEC promueven la proliferación de hepatocitos mediante la producción angiocrina del factor de crecimiento de hepatocitos y Wnt2. Los inventores han determinado además que, posteriormente a esta angiogénesis inductiva, las propias LSEC experimentan una "angiogénesis proliferativa" para cumplir con la demanda creciente en el suministro de sangre para el tejido hepático en regeneración.

La activación de VEGF-A/VEGFR2, pero no de P1-GF/VEGFR1, es crucial para cebar las LSEC e iniciar y mantener la proliferación hepática

Para investigar la significancia de los receptores VEGF durante la regeneración hepática impulsada por LSEC, se diseñaron experimentos para eliminar el gen *VEGFR2* condicionalmente cruzando ratones *VEGFR2*^{loxP/loxP} con ratones *ROSA-CreER*^{T2}, generando ratones *VEGFR2*^{loxP/loxP} (*VEGFR2*^{f/f}) deficientes en VEGFR2, (Fig. 3J) (Hooper, Cell Stem Cell 4:263-274 (2009)). Debido a la expresión específica de células endoteliales de VEGFR2 en el hígado, en ratones *VEGFR2*^{f/f}, solamente las células endoteliales hepáticas, pero no las células no endoteliales, manifestarán defectos funcionales. Los ratones del control tenían una delección heterocigótica del gen *VEGFR2* (*VEGFR2*^{f/+}). Cuarenta y ocho horas después de la hepatectomía parcial, disminuyó la proliferación de hepatocitos bromodesoxiuridina⁺ (número de células Br-dU⁺HNF4A⁺) en un 67 % en ratones *VEGFR2*^{f/f} (Fig. 3A, B). De forma notable, a pesar de la patencia de los vasos perfundidos VE-cadherina⁺isolectina⁺ en esta fase temprana, se atenuó la regeneración de la masa hepática en ratones *VEGFR2*^{f/f} (Fig. 3C). Por lo tanto, en las fases tempranas (hepatectomía parcial en los días 1-3) de la regeneración del hígado, el direccionamiento de VEGFR2 deteriora principalmente al efecto de los factores angiocrinos derivados de endotelio para inducir la regeneración de los hepatocitos, pero no a la capacidad de perfusión vascular. Por lo tanto, VEGFR2 es importante para la inducción de la proliferación de hepatocitos en respuesta a señales angiocrinas en las etapas tempranas de la regeneración del hígado.

Los inventores determinaron además que VEGF es también importante para la angiogénesis proliferativa y la restauración orgánica normal. Los inventores descubrieron que, en las últimas etapas de la regeneración del hígado (hepatectomía parcial en los días 4-8), la angiogénesis proliferativa era defectiva en ratones *VEGFR2^{fl/fl}* (Fig. 3C), interfiriendo con el ensamblaje de la vasculatura patente VE-cadherina⁺isolectina⁺ (Fig. 3D, E), restaurando por lo tanto el enromado de la masa hepática durante al menos 28 días. Además, en ratones *VEGFR2^{fl/fl}*, la función hepática después de la hepatectomía parcial era anómala, como se manifestó por los elevados niveles de bilirrubina en plasma. Para corroborar la función de VEGFR2 específica de endotelio en la mediación de la regeneración del hígado, los ratones *VEGFR2^{oxP/oxP}* se cruzaron también con ratones *VE-cadherina-CreER^{T2}* para inducir la delección selectiva de células endoteliales de VEGFR2 (Fig. 3K). La masa del hígado y la formación de vasos perfundidos en ratones *VE-cadherina-CreER^{T2}VEGFR2^m* disminuyeron después de la hepatectomía parcial, lo que resalta la significancia de VEGFR2 en la mediación de la regeneración del hígado.

Los inventores postularon que, si la ruta VEGF-A/VEGFR2 promueve la regeneración hepática impulsada por LSEC, entonces VEGF-A debe inducir o potenciar la regeneración del hígado. Los inventores descubrieron que la administración de VEGF-A promueve la regeneración del hígado. Los inventores compararon el efecto de VEGF-A₁₆₄ con el factor de crecimiento placentario (PI-GF), ya que el último activa selectivamente solo VEGFR1 (Carmeliet, Nature 438:932-936 (2005)). Después de la hepatectomía parcial, VEGF₁₆₄, pero no PLGF, aceleró la regeneración de la masa del hígado y el número de LSEC VEGFR3⁺CD34⁺, que se sostuvieron durante al menos 28 días (Fig. 3F, G). Por lo tanto, después de la hepatectomía parcial, la activación de VEGF-A/VEGFR2, pero no de PI-GF/VEGFR1, Es crucial para el cebado de las LSEC para iniciar y mantener la proliferación hepática.

La activación de la ruta VEGF-A/VEGFR2 mediante la regulación positiva de Id1 impulsa la regeneración del hígado

Se usó el análisis de la micromatriz para identificar las señales angiocrinas que estimulan la regeneración del hígado. Entre los genes específicos de endotelio, el factor de transcripción *Id1* estaba específicamente regulado en exceso en las células endoteliales activadas por hepatectomía parcial (Lyden, Nature 401:670-677 (1999)). Usando ratones indicadores *Id1^{venusYFP}* en que la expresión de YFP en venus está impulsada por el promotor *Id1* (Nam, Cell Stem Cell 5:515-526 (2009)), Se encontró que la regulación positiva de *Id1* era exclusiva en LSEC 48 h después de la hepatectomía parcial (Fig. 3H), que se enromó significativamente en ratones *VEGFR2^{fl/fl}* (Fig. 3I). Notablemente, la recuperación de la masa de hígado en ratones (*Id1^{-/-}*) deficientes en *Id1* después de la hepatectomía parcial se deterioró durante 28 días y permaneció sin cambiar tras la administración de VEGF-A₁₆₄ (Fig. 4A, J). Además, después de la hepatectomía parcial, los ratones *Id1^{-/-}* presentaron una disminución significativa en el número de hepatocitos BrdU⁺HNF4A⁺ mitóticos, alteró la formación de los vasos VE-cadherina⁺isolectina⁺ funcionales, disminuyó la proliferación de LSEC VEGFR3⁺CD34⁺, y la función hepática anómala, como se evidenció por un aumento en los niveles de bilirrubina en plasma (Fig. 4B, C, K). Por tanto, la activación de la ruta VEGF-A/VEGFR2 mediante la regulación positiva de *Id1* impulsa la regeneración del hígado.

El cultivo simultáneo de LSEC-hepatocitos desvela la necesidad de Id1 para la inducción funcional de las LSEC de la regeneración de hepatocitos

El papel de la regulación positiva de *Id1* en la mediación de la función angiocrina de las LSEC en la proliferación de hepatocitos se examinó también mediante un sistema de cultivo simultáneo de LSEC-hepatocitos. La incubación simultánea de los hepatocitos aislados con las LSEC primarias conducen a un aumento de nueve veces en el número de hepatocitos, que se eliminó selectivamente mediante la inactivación génica de *Id1* en LSEC (Fig. 4D, E μ). El medio acondicionado de las LSEC falló en soportar el crecimiento de los hepatocitos, subrayando la importancia del contacto célula-célula en la función angiocrina derivada de LSEC. Por tanto, la ausencia de *Id1* da como resultado una función inductiva defectiva de las LSEC, que deteriora la regeneración de los hepatocitos.

El trasplante de LSEC *Id1^{+/+}* restaura la regeneración del hígado en el hígado *Id1^{-/-}*

Para determinar si los efectos angiocrinos *in vivo* de las LSEC *d1^{+/+}* podrían iniciar la regeneración de hepatocitos en ratones *Id1^{-/-}*, se usó una estrategia de trasplante intraesplénico en el día 2 después de la hepatectomía parcial para injertar las LSEC en la vasculatura del hígado *Id1^{-/-}* (Fig. 4F) (Follenzi, J. Clin. Invest: 118, 935-945 (2008)). Las LSEC *Id1^{+/+}* marcadas con GFP incorporada selectivamente en la luz vascular sinusoidal VEGFR3 y restauró la regeneración de la masa del hígado y la expansión de las LSEC (Fig. 4G). A diferencia de ello, las LSEC *Id1^{-/-}* trasplantadas fallaron en restaurar la regeneración del hígado *Id1^{-/-}*. Además, en el hígado *Id1^{-/-}*, el trasplante de las LSEC GFP⁺*Id1^{+/+}* en el día 2 después de la hepatectomía parcial inició la proliferación de los hepatocitos en su proximidad inmediata (Fig. 4H, I). Por tanto, el quimerismo vascular parcial que dio como resultado la incorporación de LSEC competentes para *Id1* genera suficientes señales inductivas derivadas de células endoteliales para iniciar la proliferación hepática en el hígado *Id1^{-/-}*.

la regulación positiva de Id1 en las LSEC inicia la proliferación de hepatocitos mediante la inducción de la expresión de Wnt2 y HGF

Las LSEC purificadas a partir de ratones silvestres e *Id1^{-/-}* 48 h después de la hepatectomía parcial se analizaron

para identificar los factores angiocrinos derivados de endotelio que induce a la regeneración del hígado. Entre los tropógenos hepáticos conocidos (Klein, *Hepatology* 47:1018-1031 (2008); Huh, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:4477-4482 (2004); Goessling, *Cell* 136:1136-1147 (2009); Ober, *Nature* 442:688-691 (2006); Thompson, *Hepatology* 45:1298-1305 (2007), la expresión de Wnt2 y HGF, pero no la de otros tropógenos expresados por las LSEC, tales como Wnt9B y trombomodulina, disminuyó drásticamente en LSEC *Id1*^{-/-} (Fig. 5A). Estos resultados sugirieron a los inventores que la regulación positiva de *Id1* en las LSEC inicia la proliferación de hepatocitos mediante la inducción de la expresión de Wnt2 y HGF.

El trasplante intraesplénico de las LSEC induce la regeneración del hígado después de la hepatectomía mediante *Id1*/Wnt2/HGF

Para ensayar el efecto de la señalización de *Id1* y Wnt2/HGF sobre la regeneración del hígado, las LSEC *Id1*^{-/-} transducidas con Wnt2, HGF, o ambos se injertaron en la vasculatura del hígado *Id1*^{-/-} mediante el trasplante intraesplénico en el día 2 después de la hepatectomía parcial. Solo las LSEC *Id1*^{-/-} que transportaban Wnt2 y HGF (*Id1*^{-/-}Wnt2⁺HGF⁺) restauraron la regeneración de la masa y la expansión de las LSEC en el hígado *Id1*^{-/-} (Fig. 5B), lo que sugiere un efecto colaborador entre HGF y Wnt2. De forma notable, el trasplante de las LSEC *Id1*^{-/-}Wnt2⁺HGF⁺ o las LSEC *Id1*^{+/+} en ratones *Id1*^{-/-} aumentó el número de hepatocitos BrdU⁺HNF4A⁺ mitóticos en un alto grado (Fig. 5C). Los hepatocitos mitóticos se encontraban situados adyacentes a las LSEC *Id1*^{-/-}Wnt2⁺HGF⁺GFP⁺ trasplantadas (Fig. 5D). Por tanto las LSEC activadas con *Id1* inducen la proliferación de hepatocitos yuxtapuestos de Wnt2 y HGF (Fig. 5E).

Por lo tanto, el uso de la inactivación génica de VEGFR2 condicional, ratones *Id1*^{-/-}, y el trasplante de células endoteliales ha demostrado el papel angiocrino esencial de una célula de un órgano especializado-célula de un nicho vascular específico, definido operativamente como LSEC VEGFR3⁺CD34⁺VEGFR2⁺VE-cadherina⁺Factor VI-II⁺Prox1⁺CD45⁺, orquestando la regeneración fisiológica del hígado inducida por hepatectomía parcial. de forma similar a la regulación positiva de *Id1* en los vasos de tumores angiogénicos, (Lyden, *Nature* 401:670-677 (1999)), La expresión de *Id1* es mínima en las LSEC normales, pero después de la hepatectomía parcial, la activación de VEGFR2 induce la regulación positiva exclusiva de *Id1* en las LSEC angiogénicas.

Se ha demostrado además que en los primeros 3 días después de la hepatectomía parcial, la activación de la ruta VEGFR2-*Id1* conmuta el programa de la angiogénesis inductiva en las LSEC VEGFR3⁺CD34⁺VEGFR2⁺*Id1*⁺ no proliferativas, que, mediante la producción de los factores angiocrinos Wnt2 y HGF, provoca la proliferación hepática. Posteriormente, como la regeneración del hígado demanda un suministro de sangre adicional, la angiogénesis proliferativa mediada por VEGFR2-M1 de las LSEC reconstituye la masa hepatovascular. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, estos datos sugieren que las LSEC soportan la regeneración del hígado mediante un mecanismo bifásico: en la fase temprana inmediatamente después de la hepatectomía parcial, Las LSEC angiogénicas inductivas promueven la organogénesis mediante la liberación de factores angiocrinos, Mientras que las LSEC angiogénicas proliferativas vascularizan y sostienen la masa del hígado en expansión.

Estos estudios muestran que el trasplante de LSEC *Id1*^{-/-}Wnt2⁺HGF⁺ en ratones *Id1*^{-/-} induce y potencia la regeneración del hígado. Este hallazgo, y la observación de que la proliferación hepática está fuertemente enromada en ratones deficientes en *VEGFR2* y *Id1*, muestra que las LSEC están calificadas con la responsabilidad de establecer un nicho vascular inductivo para iniciar la proliferación hepática elaborando factores angiocrinos. Además, las células precursoras endoteliales (EPC) derivadas de tejidos no específicos pueden sustituir alternativamente las LSEC para iniciar y restaurar la regeneración del hígado. De forma notable, Las EPC VEGFR2⁺*Id1*⁺ pueden iniciar la angiogénesis mediante la liberación de factores angiocrinos más bien que incorporándolos estructuralmente en la pared del vaso. Como tal, el trasplante intrahepático de las EPC abrirá nuevas vías de terapia celular para promover la regeneración del hígado.

En el modelo de hepatectomía parcial usado en este estudio, la integridad vascular de lo lóbulos hepáticos residuales se mantiene con la respuesta inflamatoria mínima, Estableciendo por tanto un modelo ideal para estudiar la regeneración hepática dependiente de endotelio. Sin embargo, en la lesión hepática inducida químicamente, el daño vascular grave y la muerte celular pueden requerir el alistamiento de otras células no endoteliales, incluyendo células estrelladas (Friedman, *Physiol. Rev.* 88:125-172 (2008)) y células hematopoyéticas proangiogénicas, tales como hemangiocitos CXCR4⁺VEGFR1⁺ (Jin, *Nature Med.* 12:557-567 (2006)), para apoyar la regeneración del hígado.

La rápida regeneración del hígado después de la hepatectomía parcial requiere la proliferación colectiva y global de muchos hepatocitos. De hecho, ya que cada hepatocito reside en proximidad cercana a las LSEC, esta activación apreciablemente armoniosa de los hepatocitos se consigue interrumpiendo el programa regenerativo dependiente de un factor angiocrino para inducir la proliferación de hepatocitos maduros a través del hígado residual después de la hepatectomía parcial. Los factores angiocrinos pueden promover también la propagación de células precursoras del hígado (Zaret, *Science* 322:1490-1494 (2008)), además de hepatocitos maduros.

En este estudio, Wnt2 y HGF se reconocen como factores angiocrinos específicos del hígado que impulsan la regeneración hepática. La presente invención proporciona también la presencia de otros factores angiocrinos que

pueden colaborar con Wnt2 y HGF para modular la regeneración del hígado, por ejemplo, los componentes de la matriz extracelular específicos de endotelio, proteasas, moléculas de adhesión y quimioquinas.

5 Esta divulgación proporciona además la expresión específica de tejido de factores angiocrinos que pueden elucidar la especificación de la vasculatura en la regulación de la organogénesis en el desarrollo y el adulto.

Hasta el momento, los intentos en la regeneración del hígado mediante el trasplante de hepatocitos han culminado en un éxito limitado (Follenzi, J. Clin. Invest: 118, 935-945 (2008)). Los estudios que se muestran aquí indican que el trasplante simultáneo de hepatocitos o sus células precursoras (Zaret, Science 322:1490-1494 (2008)) con las LSEC o EPC *VEGFR2⁺Id1⁺* permiten ahora el diseño de estrategias eficaces para rescatar la función hepatovascular en pacientes que padecen un daño hepático traumático o infeccioso.

Ejemplo 2. Regeneración del pulmón

15 Indicadores transgénicos y animales dirigidos a genes.

Se llevó a cabo la generación de ratones inactivados génicamente inducibles por *Vegfr2* y *Fgfr1* específicos de endotelio como se describe (Hooper, Cell stem cell 4: 263-274 (2009); Wang, Nature 465:483-486 (2010)). En resumen, Ratones *Vegfr2^{loxP/loxP}* y *Fgfr1^{loxP/loxP}* se reprodujeron con ratones *VE-cadherina-CreERT2* transgénicos para establecer ratones *VE-cadherina-CreERT2⁺ Vegfr2^{loxP/loxP}* y *VE-cadherina-CreERT2⁺ Vegfr2^{loxP/loxP} Fgfr1^{loxP/+}*. Estos ratones se trataron i.p. con tamoxifeno, conduciendo a la delección específica de endotelio de *Vegfr2* y *Fgfr1*.

Los ratones que soportan rTA (*SPC-rtTA* estimulado por el promotor *SPC* y *CCSP*, cre (*(tetO)₇cre*) estimulado por *CCSP-rtTA*) y (*tetO*)7CMV (Perl, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:10482-10487 (2002)) se cruzaron con ratones Rosa26R-eYFP como se ha descrito (Rawlins, Cell stem cell 4:525-534 (2009)), dando como resultado ratones *SPC-YFP* y *CCSP-YFP* indicadores tras el tratamiento con tetraciclina. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo las directrices establecidas por el Institutional Animal Care and Use Committee.

30 Modelo PNX y mediciones fisiológicas de la mecánica pulmonar

Se adaptó el procedimiento PNX como se describe (Nolen-Walston, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:L1158-1165 (2008)). En resumen, se llevó a cabo la intubación orotraqueal en ratones anestesiados y ventilados mecánicamente. El lóbulo izquierdo del pulmón se levantó con un lazo de sutura alrededor del hilio y se reseco. Los ratones experimentaron una toracotomía simulada sin resección del lóbulo. Se midieron la masa y el volumen del pulmón y se normalizaron al peso corporal después de la PNX. Se llevó a cabo el aislamiento de las PCEC y el examen de la fosforilación y el nivel de proteínas de VEGFR2 y FGFR1 como se ha descrito en el Ejemplo 1 y como en Murakami, The Journal of clinical investigation 121 (2011). Se determinó la capacidad inspiratoria entre las mediciones de presión de la meseta de la capacidad pulmonar (TLC) y el volumen residual funcional (FRC) utilizando el software Flexivent (Scireq). Se determinó la distensibilidad estática a partir de las curvas de presión volumen.

Inmunofluorescencia (IF) y análisis citométrico de flujo

45 Para llevar a cabo los estudios de IF, las secciones criopreservadas se incubaron en anticuerpo que reconocían VE-cadherina (R&D), CD34 (BD), E-cadherina (eBiosciences), y SPC (Abcam) y anticuerpos 2^{os} conjugados con fluoróforos (Jackson Immuno Research). Se midió la amplificación de la célula en tránsito mediante la captación de BrdU (Ding, Nature 468:310-315 (2010)). Para rastrear la proliferación de células de tipo BASC, se introdujo BrdU en agua corriente (Nolen-Walston, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:L1158-1165 (2008)). Se capturaron imágenes en un microscopio AxioVert LSM710 (Zeiss). Se llevó a cabo el análisis morfológico del número alveolar y la intercepción lineal media (DeLisser, The Journal of biological chemistry 281:8724-8731 (2006)). Se aislaron las células totales del pulmón y se analizaron en LSRII-SORP (BD) (Ding, Nature 468:310-315 (2010)). Se cuantificaron las AEC y las PCEC tiñendo con anticuerpos conjugados contra SPC⁺E-cadherina y VE-cadherina⁺CD34, respectivamente.

55 Administración farmacológica de EGF y neutralización del mAb contra MMP14

Se inyectaron los ratones con mAb contra MMP14 de ratón (mAb MMP14, 50 mg/kg, Abcam) e IgG del control 12 horas antes de PNX y en días alternos. Para determinar el papel del EGF recombinante en la regeneración alveolar, se inyectaron ratones por vía i.v. con 500 µg/kg EGF (Abcam) sobre una base diaria después de la PNX. Se inyectaron también los ratones intratraquealmente con 100 µg/kg de EGF (en 50 µl) cada día alterno para ensayar el efecto local de EGF.

65 Determinación de AECII y proliferación de BASC en cultivo simultáneo con EC primarias

Para mantener la activación de Akt, EC primarias se transdujeron con el gen E4ORF1 (Seandel, Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 105:19288-93 (2008)). Para activar simultáneamente la ruta de la MAPkinasa, se introdujo c-Raf en las EC E4ORF1⁺ primarias. Las EC MAPK+Akt resultantes Kobayashi, Nature cell biology 12:1046-1056 (2010)) se cultivaron simultáneamente con AECII y BASC aisladas de ratones SPC y CCSP-YFP (Kim, Cell 121:823-835 (2005)). Se usó ARNsh de *Mmp14* o mezclado para inactivar génicamente *Mmp14* en EC o AEC MAPK+Akt (Ding, Nature 468:310-315 (2010)). Para los estudios de cultivos simultáneos, las AECII y las BASC SPC⁺ se sembraron en placas en placas no adherentes, sembradas con 10 veces más de EC MAPK+Akt. Se añadió medio acondicionado procedente de las EC MAPK+Akt a las AEC. Tras el cultivo simultáneo, Se cuantificaron las AECII y las BASC mediante el análisis citométrico de flujo.

10 Análisis de qPCR, ELISA, e inmunotransferencia

Después de la PNx, se aisló el ARN total de los pulmones del ratón para llevar a cabo la qPCR usando los sistemas de expresión Taqman (Applied Biosystems). Se examinó la concentración de HB-EGF en BALF mediante el ELISA de tipo sándwich y la transferencia western usando anticuerpos dirigidos contra HB-EGF (Santa Cruz), y se ensayó la escisión de la cadena de laminina5 γ 2 con un anticuerpo contra la cadena γ 2 (Santa Cruz).

Análisis de los datos

Todos los datos se presentan como Media \pm sem. Se ensayaron las diferencias entre grupos para determinar la significancia estadística usando el test de la t de Student o el análisis de la varianza (ANOVA). La significancia estadística se ajustó a P < 0.05.

PNX induce la expansión de las células precursoras epiteliales

En los 15 días después de la PNx, hubo una regeneración drástica en la masa y el volumen de los lóbulos del pulmón derecho restantes (Fig. 6A, B). Células precursoras epiteliales de pulmón, incluyendo los subconjuntos de BASC por las proteínas secretadas por las proteínas secretadas por células Clara (CCSP)⁺proteína C protensioactiva (SPC) células Sca-1⁺ (CCSP⁺SPC⁺Sca-1⁺) y las células AEC de tipo II (AECII) por la SPC⁺E-cadherina⁺ que contribuyen a la epitelización alveolar (Beers, The Journal of clinical investigation 121: 2065-2073 (2011)). Para determinar la contribución de las células precursoras epiteliales a la regeneración del pulmón, después de la PNx, los inventores introdujeron BrdU en el agua corriente para detectar las células de ciclo lento. En el día 3 después de la PNx, los inventores observaron la amplificación de las células BrdU⁺CC-SP⁺ en la unión del conducto bronquioalveolar (BADJ) (Fig. 6C). Para rastrear la expansión de las células BrdU⁺CCSP⁺, los inventores utilizaron ratones transgénicos indicadores en los que los promotores CCSP y SPC estimulan la expresión de YFP (ratones CCSP-YFP y SPC-YFP) (Perl, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:10482-10487 (2002)) (Fig. 6D, E). Los inventores llevaron a cabo análisis polivariantes citométricos de flujo de todas las células mononucleares en los pulmones en regeneración en el día 3 después de la PNx. Las células CCSP⁺BrdU⁺ localizadas en la región BADJ eran células CCSP⁺SPC⁺Sca-1⁺VE-cadherina⁻CD31⁻, una firma fenotípica observada en las BASC (Kim, Cell 121:823-835 (2005)). En este punto temporal temprano, los inventores no detectan la proliferación de AE- CII SPC⁺Sca-1-CCSP⁺ o PCEC VE-cadherina⁺CD31⁺. Por lo tanto, PNx induce la expansión de células de tipo BASC CCSP⁺SPC⁺Sca-1⁺ de ciclo lento en las fases tempranas de la regeneración pulmonar, Cuando hubo una mínima proliferación de AEC y PCEC.

45 PNX induce la expansión de las PCEC y las AEC localizándolas simultáneamente en la interfase alveolar-capilar

Para identificar los puntos temporales después de la PNx cuando las AEC y las PCEC experimentan una proliferación significativa, los inventores examinaron la cinética de la incorporación de BrdU inyectado intraperitonealmente en los lóbulos restantes y encontraron una evidencia global de las células amplificadoras en tránsito (TAC) que tenían su máximo en el día 7 después de la PNx (Fig. 7A). En ratones operados de pulmón simulados, hubo una pequeña captación de BrdU. Para caracterizar los tipos de células en TAC en el día 7 después de la PNx, los inventores llevaron a cabo PNx en ratones indicadores SPC-YFP. Se aumentó la proliferación de células SPC⁺ que expresan simultáneamente la proteína D protensioactiva (SPD) y la E-cadherina, los marcadores que representan las AECII (Beers, The Journal of biological chemistry 269:20318-20328 (1994); Whitsett, Annual review of medicine 61:105-119 (2010)) (Fig. 7B).

Las TAC SPC⁻ restantes consisten en una pequeña fracción de las células Clara CCSP⁺ de las vías aéreas (Rawlins, Cell stem cell 4:525-534 (2009)) y las PCEC VE-cadherina⁺. El análisis de la incorporación de BrdU mostró que en el día 7 después de la PNx, la proliferación de las PCEC VE-cadherina⁺CD34⁺FGFR1⁺VEGFR2⁺CD45⁻ contabilizó un 7 % de células mononucleares (Fig. 7C), que se localizaron en la proximidad de las AECII SPC⁺ (Fig. 7D). Usando la SPC⁺E-cadherina⁺ y la VE-cadherina⁺CD34⁺ como marcadores operativos para las AECII y las PCEC, respectivamente, los inventores descubrieron que en el día 15 después de la PNx hubo un aumento de 3 veces en la población de las AECII y las PCEC (Fig. 7E). Por lo tanto, después de la PNx, el aumento en la masa y el volumen del pulmón es debido a la proliferación de PCEC y células precursoras epiteliales, con células de tipo BASC que se expanden en los puntos temporales tempranos (día 3) mientras que las AECII proliferan en los puntos temporales tardíos.

La activación secuencial de VEGFR2 y FGFR1 en PCEC es esencial para la regeneración alveolar funcional

PNX inicia la regeneración pulmonar mediante la activación de las PCEC para producir factores epiteliales angiocrinos activos. Como VEGFR2, el principal receptor de la tirosina quinasa de VEGF-A, juega un papel crítico en la inducción de los factores angiocrinos (Ding, Nature 468:310-315 (2010); Hooper, Cell stem cell 4: 263-274 (2009)), los inventores analizaron la activación de VEGFR2 en las PCEC después de la PNX. Aunque el nivel de proteína VEGFR2 en las PCEC está sin alterar, después de la PNX, la extensión de VEGFR2 fosforilado está aumentado, indicando la activación de este receptor de VEGF-A en las EC de los lóbulos derechos en regeneración (Fig. 8A).

Debido a que FGFR1 se expresa en las PCEC y puede modular recíprocamente la expresión y el estado de activación de VEGFR2 (Murakami, The Journal of clinical investigation 121 (2011); White, Development 134:3743-3752 (2007)) para estimular la producción de factores angiocrinos, los inventores estudiaron la expresión de FGFR1 por las PCEC. Después de la PNX, la proteína FGFR1 se reguló en exceso de una manera dependiente del tiempo. Por lo tanto, aunque en las fases tempranas de la regeneración pulmonar, la activación de VEGFR2 en las PCEC inicia la alveologénesis, en las fases tardías la activación simultánea de FGFR1 puede inducir la sinergia con VEGFR2 para sostener la epitelización regenerativa. Para elucidar la función específica endotelial de VEGFR2 y FGFR1 en los pulmones, los inventores emplearon una estrategia de inactivación génica inducible para eliminar selectivamente el gen *Vegfr2* en las EC de un ratón adulto (Fig. 8B), usando ratones transgénicos en los que el promotor de la *VE-cadherina* estimula la expresión de Cre sensible a tamoxifeno (*VE-Cad-CreERT2*) (Wang, Nature 465:483-486 (2010)).

El tratamiento con tamoxifeno elimina selectivamente *Vegfr2* en EC (ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}*). Para tener en cuenta la toxicidad fuera del objetivo por CreERT2, los inventores usaron ratones deficientes en *Vegfr2* heterocigóticos (*Vegfr2^{iΔEC/+}*) como control. Los inventores generaron también ratones en los que *Vegfr2* y *Fgfr1* se eliminaron en las EC. Sin embargo, debido a que estos ratones podrían no tolerar los procedimientos quirúrgicos debido a la inestabilidad vascular, los inventores investigaron el papel de la activación simultánea de FGFR1 y VEGFR2 en el apoyo de la alveologénesis mediante la delección inducible de *Vegfr2* y la delección parcial de *Fgfr1* en las EC (ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}Fgfr1^{iΔEC/+}*).

Antes de PNX, los ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}* y *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}Fgfr1^{iΔEC/+}* no manifiestan alteraciones en la masa o la función pulmonar. Por el contrario, En el día 3 después de la PNX, la proliferación de células de tipo BASC CCSP⁺Sca1⁺ fue suprimida en ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}* (Fig. 3C), mientras que no hubo inhibición adicional en la expansión de estas células en ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}Fgfr1^{iΔEC/+}* después de la PNX. Estos datos establecen el papel crítico de la activación de VEGFR2 en el apoyo a la epitelización en las fases tempranas de la regeneración pulmonar.

Los inventores estudiaron a continuación el papel de la activación simultánea de VEGFR2 y FGFR1 en la amplificación de las PCEC y las AECII. La tinción simultánea de los pulmones en regeneración con BrdU, VE-cadherina, y SPC en el día 7 indicó que la inactivación génica específica del endotelio de *Vegfr2* en ratones (*Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}*) abrogó la propagación de las PCEC y las AECII (Fig. 8D, E). De forma notable, la inactivación génica específica del endotelio de *Vegfr2* y *Fgfr1* (*Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}Fgfr1^{iΔEC/+}*) suprimió la proliferación de las PCEC y las AECII en este punto temporal, sugiriendo que FGFR1 induce la sinergia con VEGFR2 en la estimulación de las PCEC para apoyar la amplificación de las AECII y la neoangiogénesis.

La delección de *Vegfr2* y *Fgfr1* en las PCEC deteriora la restauración de la estructura y la función alveolar

Para determinar si la activación simultánea de VEGFR2 y FGFR1 juega un papel en el deterioro de la función pulmonar, los inventores examinaron el volumen inspiratorio y la distensibilidad estática en ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}Fgfr1^{iΔEC/+}* y del control antes y después de la PNX. Estos parámetros de la función pulmonar proporcionan índices fisiológicamente relevantes de la capacidad respiratoria. La restauración de la función pulmonar después de la PNX estaba significativamente deteriorada en ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}Fgfr1^{iΔEC/+}* en un punto temporal cuando los ratones del control presentaron una recuperación completa (Fig. 8F). De manera similar, la restauración de la masa, el volumen, y la expansión de células del pulmón después de la PNX se deterioró en todos los ratones *Vegfr2^{iΔEC/iΔEC}Fgfr1^{iΔEC/+}* (Fig. 8G). Estos datos indican que después de la PNX, las EC VE-cadherina no proliferantes inducen la expansión temprana de las células de tipo BASC mediante la activación de VEGFR2. En las fases tardías después de la PNX, la regulación positiva de FGFR1 junto con las VEGFR2 activa las PCEC para instruir tanto la epitelización como el brote vascular, restaurando la capacidad respiratoria (Fig. 1B). Por lo tanto, Las PCEC producen factores angiocrinos y participan en la angiogénesis fomentando la generación de unidades alveolares respiratorias funcionales.

PNX induce la regulación positiva específica de MMP14 en las PCEC expandiendo las células precursoras epiteliales

Para identificar la señal angiocrina inductiva que inicia la epitelización, los inventores compararon los perfiles de expresión génica de los pulmones regenerativos, y encontraron que entre los factores alveologénicos, la

metaloproteinasas de matriz de membrana de tipo 1 (MMP14) estaba específicamente regulada positivamente en las PCEC naturales, pero no en ratones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}$ o $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$ (Fig. 9A). El análisis del nivel de proteína MMP14 en los pulmones pneumonectomizados desveló que su regulación positiva temporal presenta máximo en el día 7 y se nivela después (Fig. 10A). La inmunotinción y el análisis citométrico de flujo ilustró la

- 5 localización de MMP14 específica de las PCEC después de la PNx, que disminuyó en los pulmones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$ (Fig. 10B, C). MMP14 no estaba regulada positivamente en otros órganos ricos en vasculatura, incluyendo el hígado, corazón, bazo y riñón (Fig. 9B, C), indicando que después de la PNx MMP14 está regulada positivamente selectivamente en las PCEC inductivas VEGFR2 y FGFR1.
- 10 Para definir el mecanismo por el cual la expresión angiocrina de MMP14 promueve la propagación de las células precursoras epiteliales, los inventores aislaron AECII y BASC de ratones *SPC-YFP* y *CCSP-YFP*, respectivamente y las cultivaron simultáneamente con EC primarias. Se utilizó la expresión de YFP para rastrear su destino durante el cultivo simultáneo. El gen *E4ORF1*, que mediante la activación de la ruta de Akt mantiene la capacidad angiocrina, se introdujo en las EC primarias (Seandel, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
- 15 America, 105:19288-93 (2008), Kobayashi, Nature cell biology 12:1046-1056 (2010)). Debido a que MMP14 estaba regulado en exceso en las EC activadas por la quinasa MAP, los inventores introdujeron también c-Raf para estimular constitutivamente la quinasa MP en las EC *E4ORF1*⁺ (EC MAPK+Akt) (Kobayashi, Nature cell biology 12:1046-1056 (2010)). A continuación, las EC MAPK+Akt se cultivaron simultáneamente con AECII/BASC en un ensayo de angioesferas tridimensionales (3D). El cultivo simultáneo con las EC MAPK+Akt condujo a la expansión
- 20 más significativa de las AECII SPC⁺ y los BASC CCSP⁺Sca-1⁺CD31⁻ (Fig. 10D-G, Fig. 9D, E), dando como resultado la formación de angioesferas 3D, rodeando las EC las células epiteliales en expansión, que se asemeja a la estructura de un saco alveolar-capilar. La inactivación génica de MMP14 en las EC MAPK+Akt suprimió la expansión de los BASC y las AECII (Fig. 10D, F). El medio acondicionado (CM) de las EC MAPK+Akt mostró un efecto despreciable en la promoción de las AECII y la propagación de BASC, subrayando el requerimiento para el contacto
- 25 célula-célula entre las EC y las células epiteliales (Fig. 10E, G). Por lo tanto, la resección del pulmón izquierdo activa VEGFR2 y FGFR1 en las PCEC estimulando la producción de MMP14, que a la vez estimula la propagación de las células precursoras epiteliales.

Después de la PNx, la inhibición de MMP14 abroga la reconstitución de las AEC, pero no las PCEC

- 30 Para determinar la significancia fisiológica de MMP14 en la modulación de la alveologénesis, los inventores inyectaron a ratones WT un anticuerpo monoclonal neutralizante (mAb) contra MMP14. Después de la PNx, el mAb MMP14 atenuó el aumento de la masa y el volumen de los pulmones restantes en ratones WT pero no en ratones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$, indicando que MMP14 se derivó de las PCEC inductivas VEGFR2 y FGFR1 (Fig. 11A). La inhibición de MMP14 bloqueó la expansión de las AECbE-cadherina⁺ sin deteriorar la reconstitución de las PCEC VE-cadherina⁺ (Fig. 11B). La expansión emparejada incorrectamente de las AEC y las PCEC después de la inhibición de MMP14 indica que MMP14 induce la propagación de las AEC (angiogénesis inductiva), más bien que la promoción de la proliferación de las PCEC (angiogénesis proliferativa).
- 40 La expansión reducida de las AEC, pero no de las PCEC, mediante la neutralización de MMP14 se demostró adicionalmente mediante el análisis citométrico de flujo (Fig. 11C, D). Además, en ratones inyectados con mAb contra MMP14, el examen morfológico desveló la inhibición del recrecimiento alveolar, como se evidenció por una disminución en el número de alvéolos y un aumento en el tamaño de los alvéolos medido por la intercepción de la media alveolar (Fig. 11E, F). La síntesis de colágeno permaneció sin cambiar en ratones a los que se había
- 45 inyectado mAb contra MMP14. Por lo tanto, MMP14 derivado de las PCEC estimula la neoalveolarización, formando sacos alveolares reminiscentes de alvéolos adultos normales.

MMP14 estimula la alveologénesis mediante el enmascaramiento de los ligandos de tipo EGF crípticos

- 50 A continuación, los inventores desearon desvelar el mecanismo por el cual MMP14 regula la alveologénesis regenerativa. Se había demostrado que MMP14 desprendía el factor de crecimiento análogo a EGF de unión a heparina (HB-EGF) (Koshikawa, Cancer research 70:6093-6103 (2010); Stratman, Blood 116:4720-4730 (2011)). Además, MMP14 escinde la cadena $\gamma 2$ de laminina5 para generar un fragmento análogo a EGF que activa el receptor de EGF (EGFR) (Schenk, The Journal of cell biology 161:197-209 (2003)). Los inventores descubrieron que
- 55 en el día 3 y el día 7 tras la PNx, aumentó el HB-EGF en el fluido de lavado bronquioalveolar (BALF) (Fig. 12A, B). El fragmento escindido de la cadena $\gamma 2$ de laminina5 pareció regenerar los pulmones en el día 7 después de la PNx (Fig. 12C). Sin embargo, el nivel de estos ligandos del EGFR disminuyó tanto en los ratones del control tratados con mAb contra MMP14 y en ratones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$, en los que se produce una disminución en la expresión de MMP14. La desactivación genética de MMP14 en las EC MAPK⁺Akt en el cultivo simultáneo endotelial 3D con las BASC y las AEC también eliminó la liberación de ligandos del EGFR hacia el sobrenadante del cultivo (Fig. 12J). Por lo tanto, después de la PNx, la activación de VEGFR2 y FGFR1 en las PCEC lleva a la producción angiocrina de MMP14, lo que a su vez desenmascara ligandos del EGFR crípticos que estimulan la regeneración alveolar.

EGF restaura la alveologénesis en ratones $Vegfr2^{iAEC/iAEC}Fgfr1^{iAEC/+}$

- 65 Tanto el HB-EGF diseminado como la cadena $\gamma 2$ de laminina5 activan el EGFR que impulsa la epitelialización. Estos

hallazgos sugieren que, después de la PNX, una alveolarización desequilibrada en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ se debe a una disminución en la biodisponibilidad de ligandos EGFR, lo que implica que la inyección de EGF restauraría la alveolarización en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ potenciando la epitelialización. Una inyección intravenosa del EGF recombinante restauró la masa y el volumen del pulmón en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ y en los ratones tratados con mAb contra MMP14 (Fig. 12D). La introducción directa del EGF en el epitelio broncoalveolar mediante inyección intratraqueal mostró un efecto similar para rescatar la regeneración alveolar (Fig. 12K). Por lo tanto, la regeneración defectiva de las AEC en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ está producida por una disminución en la producción de MMP14 por las PCEC lo que atenúa la biodisponibilidad de ligandos EGFR.

De forma notable, en los ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ inyectados con EGF, se potenció la asociación celular de las AEC E-cadherina⁺ con las PCEC VE-cadherina⁺ (Fig. 12E), restaurando la función del pulmón (Fig. 12F). La inyección a ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ estimuló la regeneración de las AEC, pero no de las PCEC, lo que sugiere que EGF tiene un efecto poco importante en la estimulación de la angiogénesis, siendo más eficaz para impulsar la epitelialización. Para analizar esta hipótesis, los inventores analizaron el efecto de la administración de EGF sobre la amplificación celular en el día 7 después de la PNX. La inyección de EGF produjo una mejora en la fosforilación de EGFR en el pulmón $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ (Fig. 12G). El análisis de incorporación de BrdU reveló que EGF restaura la proliferación de las AECII, pero no de las PCEC en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ (Fig. 12H, I). Por lo tanto, el defecto alveolar en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ se debe a una generación defectuosa de los factores angiocrinos activos en el epitelio, y no a una perfusión vascular afectada negativamente para regenerar el pulmón.

El trasplante de PCEC WT restaura la alveolarización en ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$

La expresión pan-endotelial impulsada mediante el promotor de la *VE-cadherina* de CreERT2 podría eliminar *Vegfr2* y *Fgfr1* en las EC de otros lechos vasculares. Para investigar la contribución específica de las PCEC inductivas a la regeneración del pulmón, los inventores diseñaron un modelo de trasplante de EC. Las EC se purificaron de cualquiera del pulmón o el hígado de crías de ratones de la misma camada WT sometidos a pneumotomía y se infundieron a ratones $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC}$ y $Vegfr2^{\Delta EC/\Delta EC} Fgfr1^{\Delta EC/+}$ en la vena yugular (Fig. 13A). También se recogió el plasma de los ratones WT sometidos a pneumotomía y se inyectaron a ratones con desactivación genética receptores para investigar la contribución de los factores de crecimiento solubles sistémicos a la regeneración del pulmón.

Las EC GFP⁺ trasplantadas se incorporaron a ~26 % de los capilares pulmonares de los ratones receptores (Fig 13B). De manera importante, las EC injertadas obtenidas de los pulmones pneumotomizados, pero no del hígado, restauraron la amplificación de las células epiteliales (Fig. 13C-F). Las células análogas a BASC BrdU⁺CCSP⁺ y las AECII BrdU⁺SPC⁺ se colocaron cerca de las PCEC GFP⁺ trasplantadas, lo que indica que las señales inductoras derivadas de las PCEC WT infundidas restauran la regeneración del pulmón. En consecuencia, la función pulmonar mejoró por el trasplante de las PCEC pero no por la inyección del plasma provisto por los ratones WT pneumotomizados (Fig. 13G). Por lo tanto, PNX induce una activación específica del pulmón para que las PCEC elaboren factores angiocrinos que respaldan la alveolarización regeneradora del pulmón (Fig. 13H).

Sistema y resultados del modelo de pneumonectomía

Para identificar las rutas implicadas en la regeneración del pulmón adulto, los inventores utilizaron un modelo de pneumonectomía unilateral (PNX) que fomenta la alveolarización regeneradora en el pulmón remanente intacto. Los inventores utilizaron un modelo de pneumonectomía unilateral (PNX) para investigar el papel de las PCEC en el respaldo de la regeneración alveolar. La resección quirúrgica del pulmón izquierdo, que no perturba la integridad vascular de los lóbulos derechos remanentes, induce el recrecimiento de estos lóbulos residuales. Los inventores han determinado que la PNX, mediante activación de VEGFR2 y FGFR1, induce a las PCEC de los lóbulos remanentes a producir la metaloproteasa MMP14 de la matriz angiocrina. A su vez, MMP14 fomenta la alveolarización regeneradora desenmascarando ligandos análogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF) crípticos que estimulan la proliferación de células epiteliales precursoras. Por lo tanto, las PCEC se pueden aprovechar terapéuticamente para el tratamiento de los trastornos del pulmón.

Estos estudios demuestran que la PNX estimula las células endoteliales capilares pulmonares (PCEC) para que produzcan factores de crecimiento angiocrinos que inducen la proliferación de células epiteliales precursoras que respaldan la alveologénesis. Además, las células endoteliales, mediante la expresión de MMP14, aceleran la proliferación formando angiosferas tridimensionales, reminiscentes de los sacos capilares alveolares. Después de la PNX, la eliminación genética inducible de *Vegfr2* y *Fgfr1* específica del endotelio inhibe la producción de MMP14, alterando negativamente la alveolarización. MMP14 fomenta la expansión de las células epiteliales precursoras desenmascarando ectodominios análogos a EGF crípticos que activan el receptor de EGF (EGFR). Consistente con esto, la neutralización de MMP14 altera negativamente la regeneración alveolar mediada por EGFR, mientras que la administración de EGF o el trasplante intravascular de las PCEC MMP14⁺ a ratones *Vegfr2/Fgfr1* deficientes pneumonectomizados restaura la alveologénesis y el volumen inspiratorio pulmonar y el cumplimiento de la función. La activación de VEGFR2 y FGFR1 en las PCEC aumenta, por tanto, la biodisponibilidad de ligandos EGFR dependiente de MMP14 para iniciar y sostener la alveologénesis.

Después de la PNX, la activación de las PCEC respalda la expansión de las células epiteliales precursoras.

5 Usando un modelo de regeneración alveolar inducida por PNX, una desactivación genética de *Vegfr2* y *Fgfr1* específica del endotelio y biorreactores de angiosfera para cocultivo endotelial-epitelial tridimensional, los inventores han establecido el papel esencial de las PCEC para fomentar la alveologénesis regeneradora. Los estudios descritos en el presente documento han descubierto el papel angiocrino de MMP14, que mediante la
10 diseminación de HB-EGF y la generación de un fragmento análogo a EGF a partir de la cadena $\gamma 2$ de laminina5, estimula la amplificación de las células epiteliales precursoras del pulmón, incluidos subconjuntos de BASC y AEC, que respaldan la alveolarización. El papel de la activación de MMP14/EGFR para fomentar la alveologénesis se confirmó en estudios en los que la administración de EGF a ratones *Vegfr2^{ΔE/C/ΔE/C}Fgfr1^{ΔE/C/+}* restauró la regeneración alveolar tras la PNX. Además, los inventores establecieron un modelo de trasplante de PCEC de pulmón para definir el papel esencial de las PCEC incorporadas funcionalmente para restaurar la epitelialización en ratones con una capacidad deteriorada para experimentar la neoalveolarización. En conjunto, los inventores han
15 demostrado que después de la PNX, las PCEC orquestan la alveolarización regenerativa mediante la formación de nuevos vasos y mediante la producción instructiva de factores angiocrinos activos en el epitelio.

PNX induce la regeneración alveolar mediante la amplificación de las células epiteliales precursoras.

20 En las fases tempranas (día 0-3), PNX induce la expansión de las células análogas a BASC CCSP⁺SPC⁺Sca-1⁺CD31⁻VE-cadherina⁻ BASC situadas en BADC. En las fases tardías (día 7-15), las AECII SPC⁺E-cadherina⁺ y las PCEC se expanden, reestableciendo las unidades alveolares-capilares funcionales. Tras la inhibición de MMP14, la pérdida de cobertura alveolar no solo en las SPC⁺E-cadherina⁺ cuboidales, sino también en las AEC SPC⁺E-cadherina⁺ escamosas, implica que las AECII SPC⁺E-cadherina⁺ amplificadas transitoriamente potencialmente
25 generan AEC SPC⁺E-cadherina⁺ de tipo I (Beers, *The Journal of clinical investigation* 121: 2065-2073 (2011); Morrisey, *Developmental cell* 18:8-23 (2010); Rock, *Annual review of cell and developmental biology* (2011)), que lleva a la reconstitución completa de la superficie alveolar tras la PNX. Por lo tanto, las PCEC inductivas impulsan la regeneración de las células epiteliales pulmonares especializadas que reconstruyen en conjunto los sacos capilares alveolares funcionales en el pulmón.

Las PCEC inician la alveologénesis mediante la liberación mediada por MMP14 de ligandos del EGFR.

MMP14 derivado de las PCEC es necesario para la expansión de células epiteliales y la restauración de la estructura alveolar y de la función pulmonar. En pulmones de feto de ratón, MMP14 regula la formación alveolar (Atkinson, *Dev Dyn* 232:1079-1090 (2005); Irie, *Medical molecular morphology* 38:43-46 (2005); Oblander, *Developmental biology* 277:255-269 (2005)), produciendo la proliferación y migración epitelial (Chun, *Cell* 125:577-591 (2006); Hiraoka, *Cell* 95:365-377 (1998); Stratman, *Blood* 114:237-247 (2009); Yana, *Journal of cell science* 120:1607-1614 (2007)). Después del nacimiento, los ratones deficientes en MMP14 presentan defectos de alveolarización, formación anómala de los sacos, y una alteración negativa de la integración vascular con las AEC, lo que sugiere que MMP14
40 media en la densidad de reticulación alveolar-vascular (Lee, *Nature medicine* 10:1095-1103 (2004); Li, *Cell* 111:635-646 (2002); Morris, *Nature* 422:169-173 (2003); Page-Mc-Caw, *Nature reviews* 8:221-233 (2007)). Por lo tanto, los inventores han mostrado que después de la PNX, la inhibición de MMP14 interfiere con el recrecimiento alveolar pero no en la proliferación endotelial, produciendo un tamaño alveolar agrandado. Aunque se puede prescindir de MMP14 en la angiogénesis proliferativa, tiene un papel fundamental en la inducción de la alveolarización regenerativa. Estos estudios demuestran que el mecanismo por el cual MMP14 modula la alveologénesis implica la diseminación de HB-EGF en el espacio alveolar y la generación de un fragmento análogo a EGF procedente de la cadena $\gamma 2$ de laminina5. Posteriormente, un aumento en los ligandos de EGFR biodisponibles inicia la regeneración de los precursores epiteliales. A este respecto, MMP14 se comporta como una cola angiocrinos específica de PCEC que impulsa la alveolarización regenerativa.

La inducción de la MMP14 específica de las PCEC define una única firma funcional de la vasculatura del pulmón.

55 Cada órgano se vasculariza mediante poblaciones especializadas de EC capilares identificadas mediante atributos fenotípicos, funcionales y estructurales únicos. Las SEC de la médula ósea (Butler, *Cell stem cell* 6:251-264 (2010b); Hooper, *Cell stem cell* 4: 263-274 (2009)) y del hígado, que están marcadas con vasos VEGFR2⁺VEGFR3⁺VE-cadherina⁺, expresan conjuntos definidos de factores angiocrinos que impulsan la regeneración del órgano. Como se ha descrito anteriormente, después de la hepatectomía parcial, las SEC VEGFR2⁺ e Id1⁺ inductoras del hígado producen HGF y WNT2 para inducir la proliferación de hepatocitos. A diferencia de ello, las SEC VEGFR2⁻ inductoras de la médula ósea expresan ligandos Notch e IGFBP (Butler, *Cell stem cell* 6:251-264 (2010b); Kobayashi, *Nature cell biology* 12:1046-1056 (2010)) para inducir la reconstitución de células hematopoyéticas.

65 Las PCEC tienen una firma fenotípica distintiva identificada como vasos VEGFR2⁺FGFR1⁺CD34⁺VE-cadherina⁺. Notablemente, después de la PNX, la producción de MMP14 se restringe a las PCEC activadas con VEGFR2 y FGFR1, pero no otros órganos ricos en vasculatura, destacando una única firma funcional de las PCEC en la regeneración alveolar. El efecto insignificante del plasma obtenido de los ratones WT pneumonectomizados para

restaurar la alveologénesis demuestra la mínima contribución de uno o más factores de crecimiento solubles sistémicos derivados de la vasculatura no pulmonar en la mediación de la alveologénesis. Estos datos establecen claramente la noción de que la PNx activa un programa específico de las PCEC para fomentar la regeneración alveolar.

5

La activación secuencial de VEGFR2 y FGFR1 ceba las PCEC durante la regeneración alveolar.

El mecanismo por el cual las PCEC se inducen a expresar MMP14 tras la PNx está mediado por una activación y regulación positiva jerárquica de VEGFR2 y FGFR1. En la fase temprana de la PNx, la expansión de las células de tipo BASC es muy dependiente de la activación de VEGFR2 en las PCEC, lo que produce una regulación positiva de MMP14 sin inducir la proliferación de las EC. A diferencia de la activación temprana y la expresión estable de VEGFR2 tras la PNx, el nivel de expresión de FGFR1 se induce posteriormente, con un máximo el día 7. FGFR1 entra en sinergia con VEGFR2 para aumentar la generación de MMP14, sosteniendo por tanto la regeneración alveolar. Por tanto, la activación secuencial de VEGFR2 y FGFR1 en las PCEC induce la producción de MMP14, acelerando la regeneración de las unidades alveolares-capilares funcionales.

10

15

El trasplante de PCEC y la administración de factores angiocrinos derivados de PCEC ofrecen nuevos enfoques para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

El desarrollo de estrategias terapéuticas para reparar la capacidad respiratoria en pacientes con trastornos pulmonares se ha visto impedido por la falta de comprensión de los mecanismos de regeneración del pulmón (Jiang, Nature medicine 11:1173-1179 (2005); Kajstura, The New England journal of medicine 364:1795-1806 (2011); Matthay, Annual review of pathology 6:147-163 (2011); Morris, Nature 422:169-173 (2003); Petrache, Nature medicine 11:491-498 (2005); Whitsett, Annual review of medicine 61:105-119 (2010)). Los estudios descritos en el presente documento demuestran que, después de la PNx, las PCEC inductoras tienen un papel fundamental en la restauración de la capacidad respiratoria, tal como se mide por el volumen inspiratorio y la distensibilidad estática. De forma notable, la administración de EGF o el trasplante de PCEC inductoras mejoró la función respiratoria en ratones. Por lo tanto, el trasplante de PCEC correctamente activadas o la inyección de mediadores angiocrinos específicos del pulmón puede mejorar en subconjuntos de pacientes con trastornos pulmonares.

20

25

30

35

Los estudios descritos en el Ejemplo 2 muestran que las PCEC orquestan la alveologénesis regenerativa liberando señales inductivas del crecimiento angiocrino tales como MMP14. La activación secuencial de VEGFR2 y FGFR1, o el aumento en la producción de MMP14, así como de otros factores angiocrinos como se describe en el presente documento puede facilitar la alveolarización del pulmón, mejorando de esta forma la hipoxemia en pacientes con enfermedades pulmonares debilitantes.

REIVINDICACIONES

1. Células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) o LSEC activadas para su uso en un método para potenciar la regeneración del hígado en un mamífero que lo necesita, comprendiendo dicha regeneración del hígado la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa hepática, y comprendiendo dicho método el trasplante intrahepático de dichas LSEC a dicho mamífero, en el que dicho mamífero necesita la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa hepática.
- 5
2. Las LSEC o las LSEC activadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las LSEC o las LSEC activadas son LSEC VEGFR2⁺VE-cadherina⁺VEGFR3⁺CD34⁻ factor VIII⁺ Prox1-CD45⁻.
- 10
3. Las LSEC o las LSEC activadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las LSEC o las LSEC activadas son LSEC VEGFR2⁺VEGFR3⁺CD34⁻Id1⁺ que inducen la proliferación hepática.
- 15
4. Las LSEC o las LSEC activadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende además la administración de hepatocitos.
5. Una composición farmacéutica para su uso en un método para potenciar la regeneración del hígado en un mamífero que lo necesita, comprendiendo dicha regeneración del hígado la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa hepática, y comprendiendo dicha composición farmacéutica las LSEC o LSEC activadas como se ha enumerado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un transportador farmacéuticamente aceptable; en el que dicho mamífero necesita la proliferación de hepatocitos y la regeneración de la masa hepática.
- 20

Figura 1

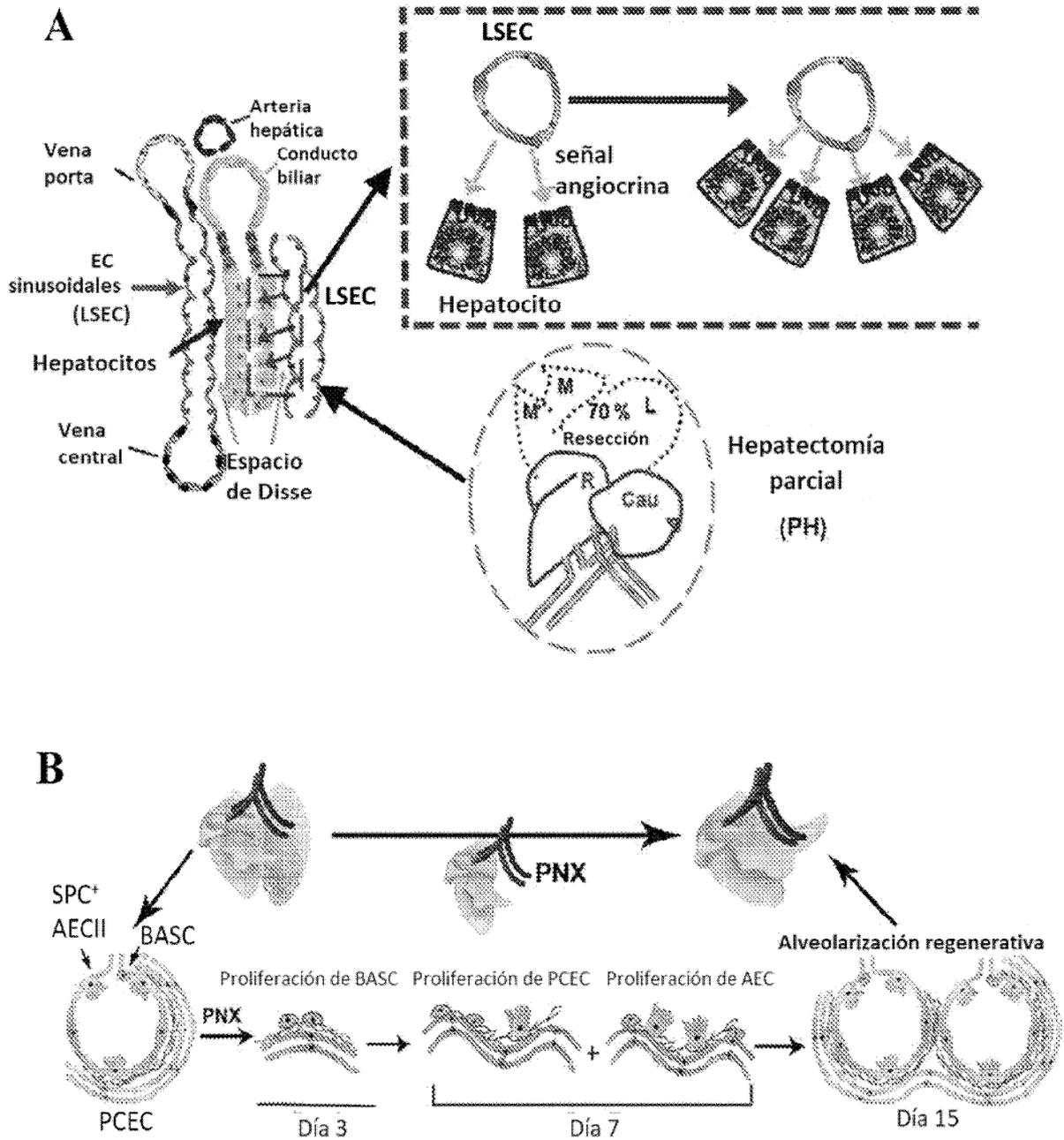
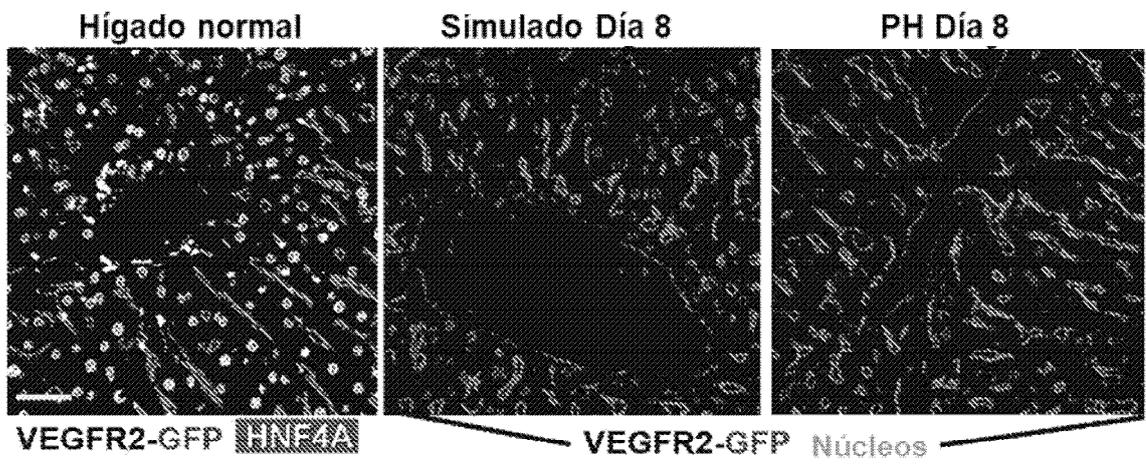


Figura 2

A



B

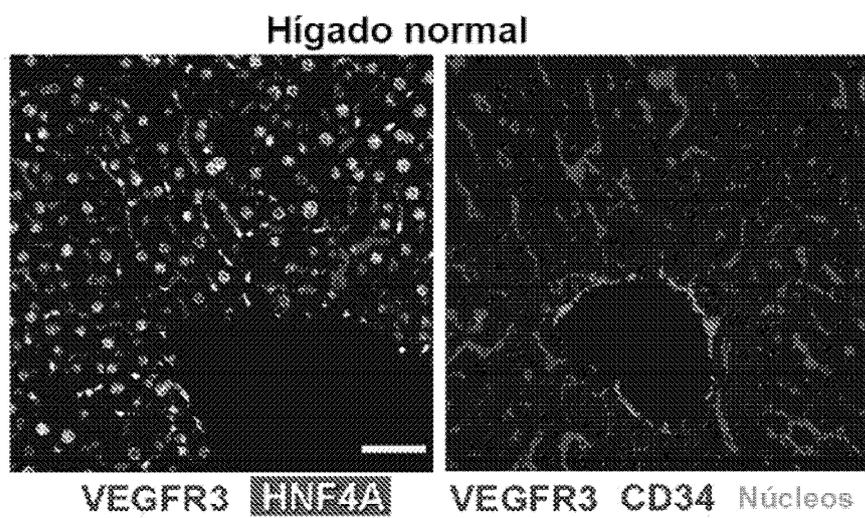


Figura 2

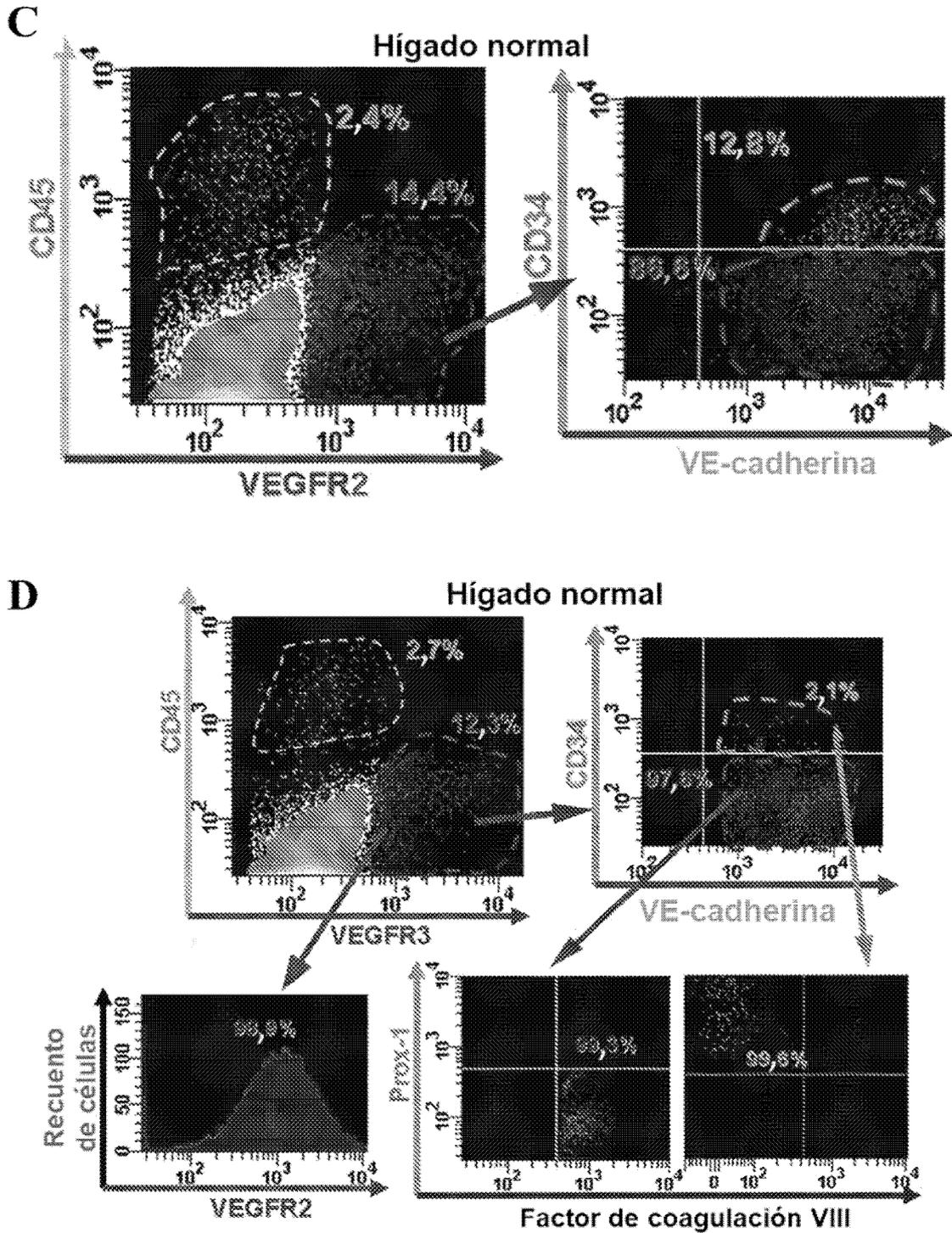


Figura 2

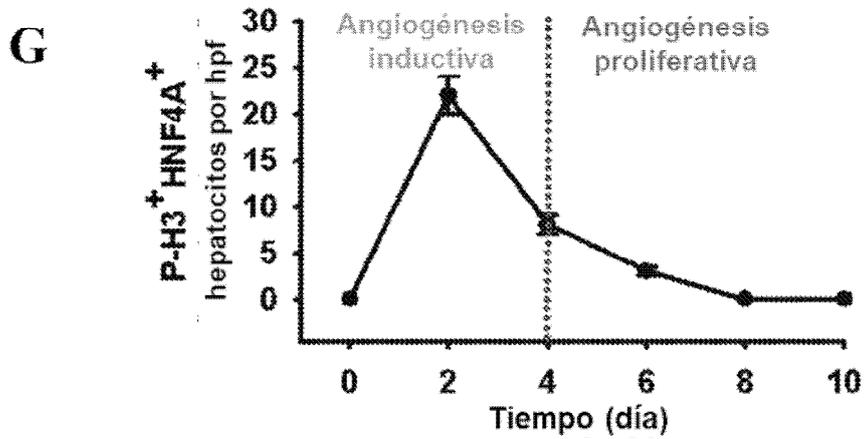
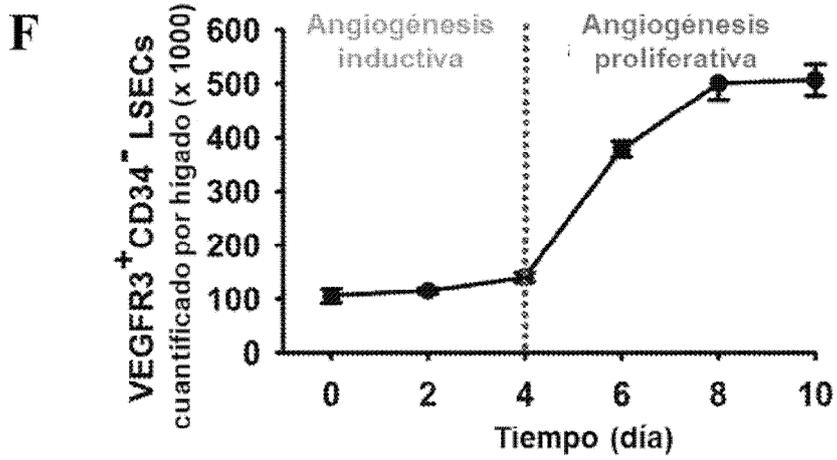
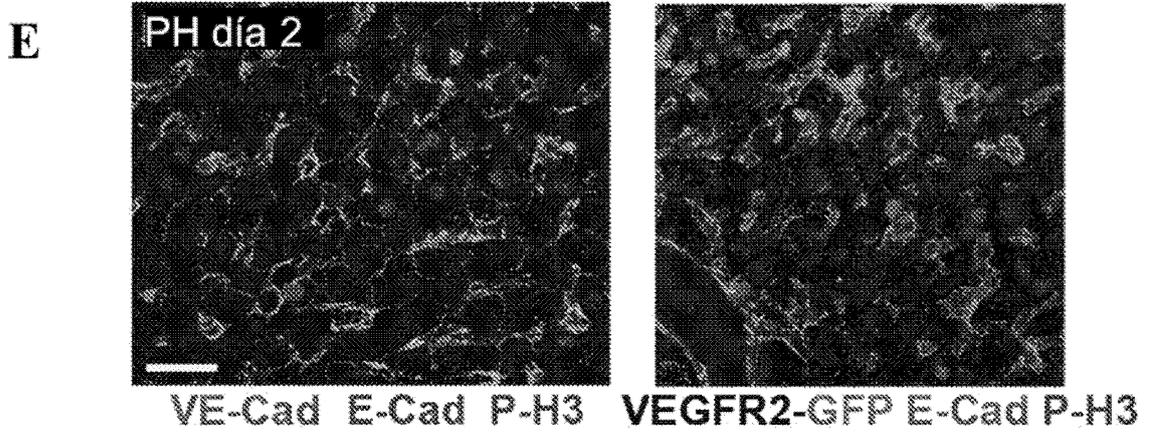


Figura 3

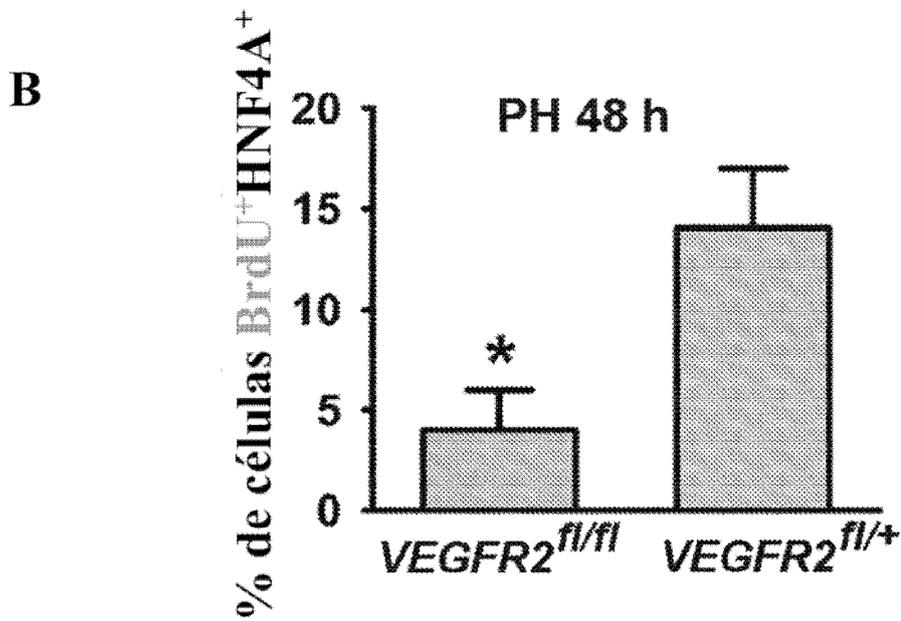
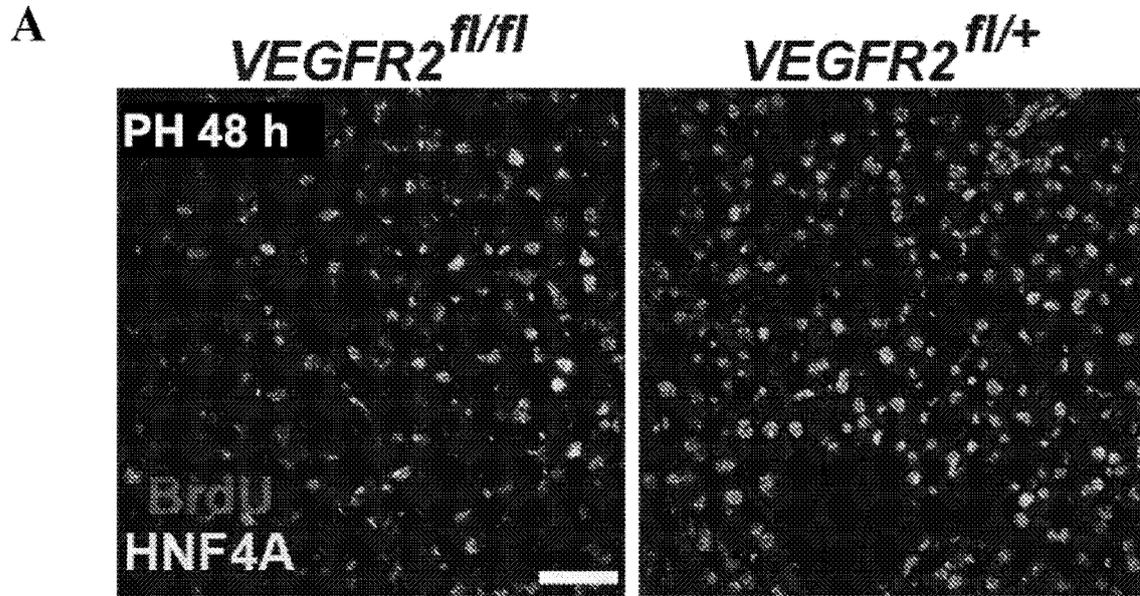


Figura 3

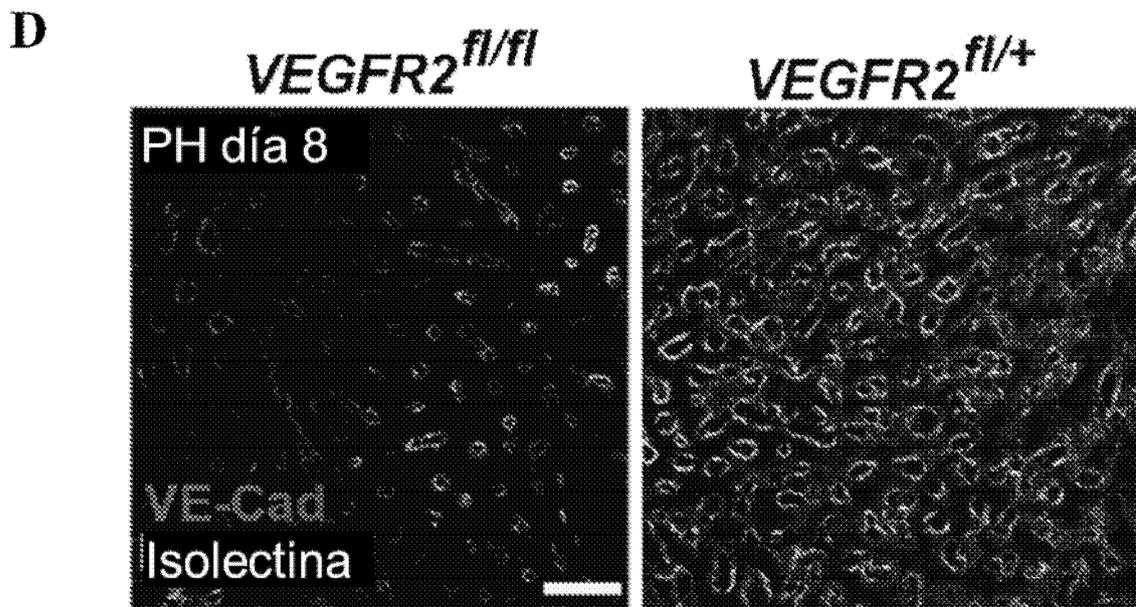
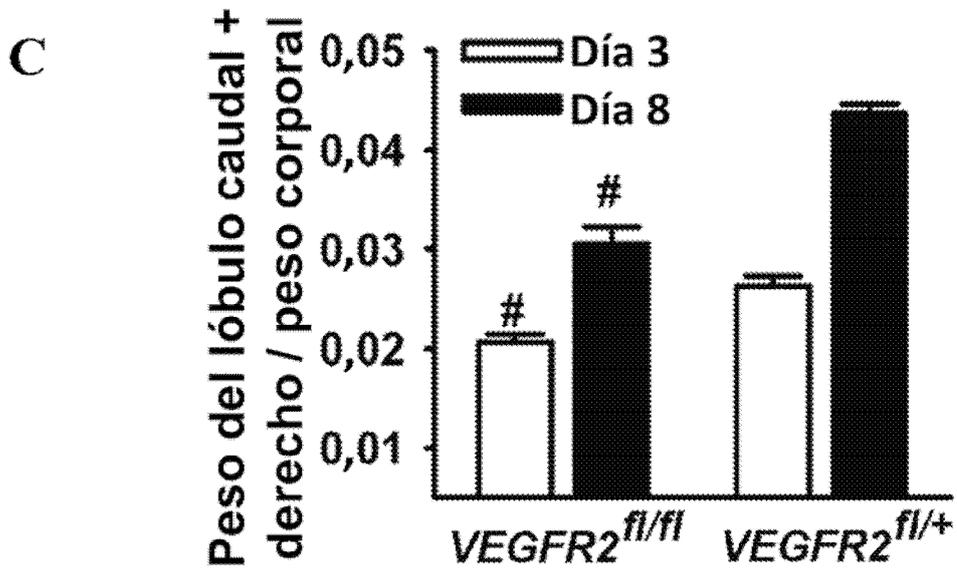


Figura 3

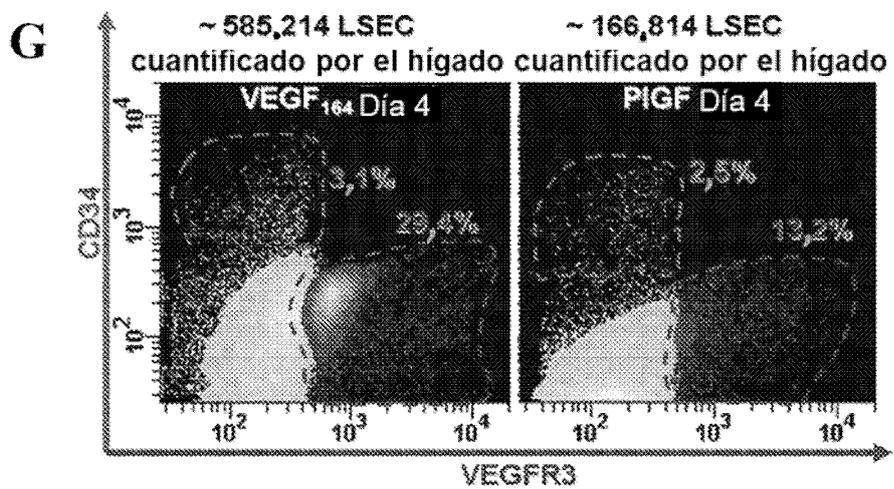
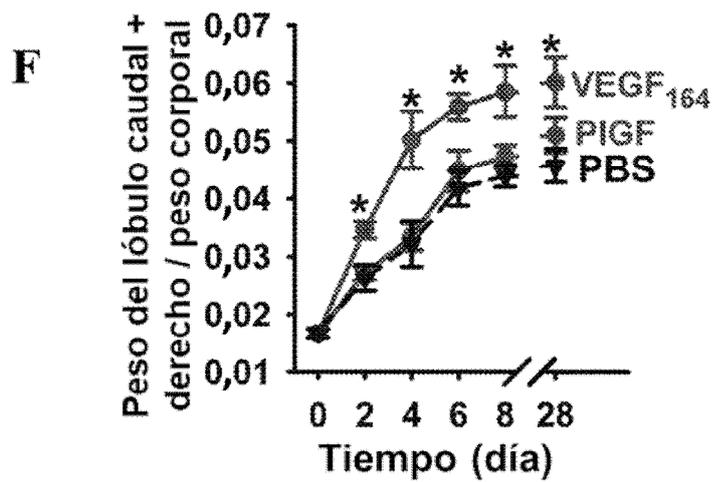
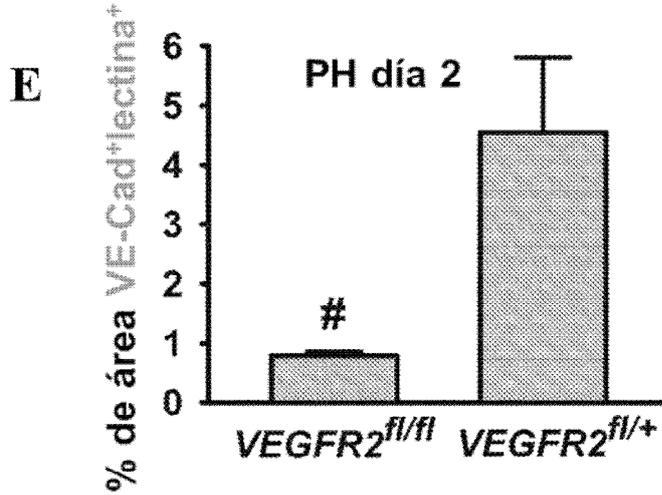
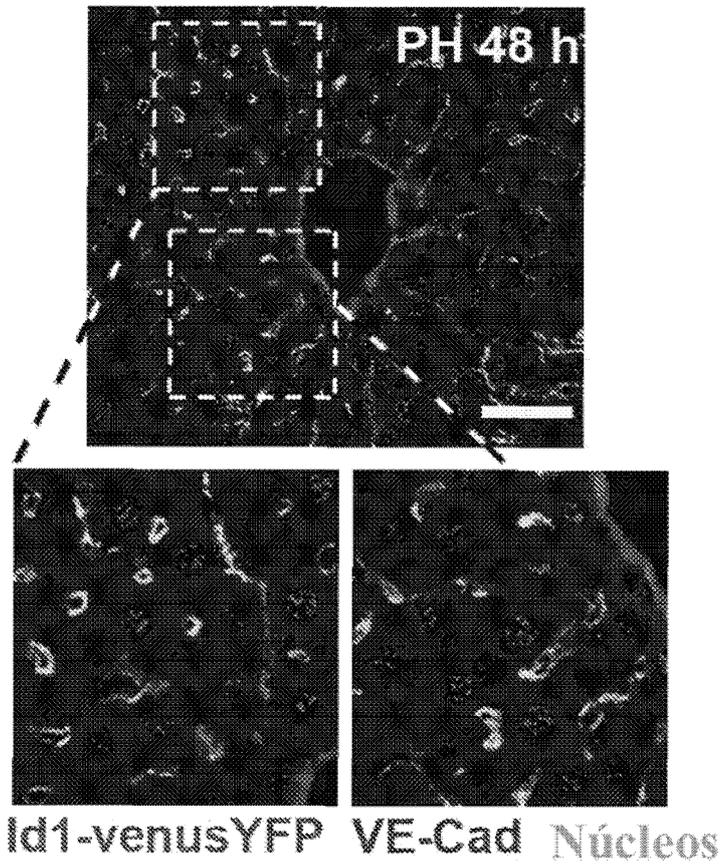


Figura 3

H



I

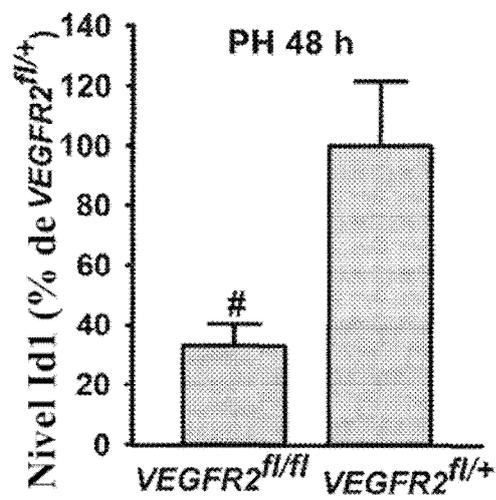
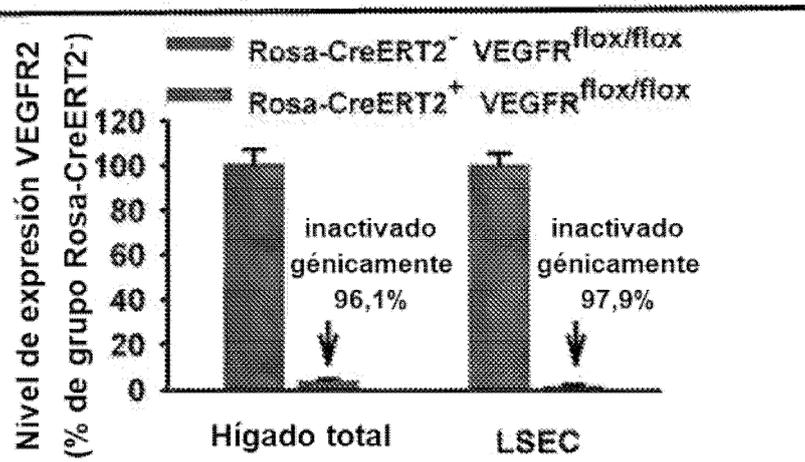


Figura 3

J



K

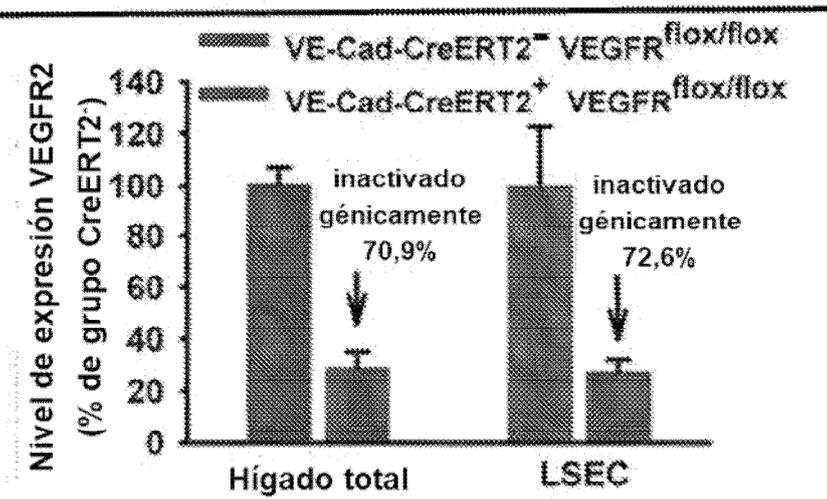


Figura 4

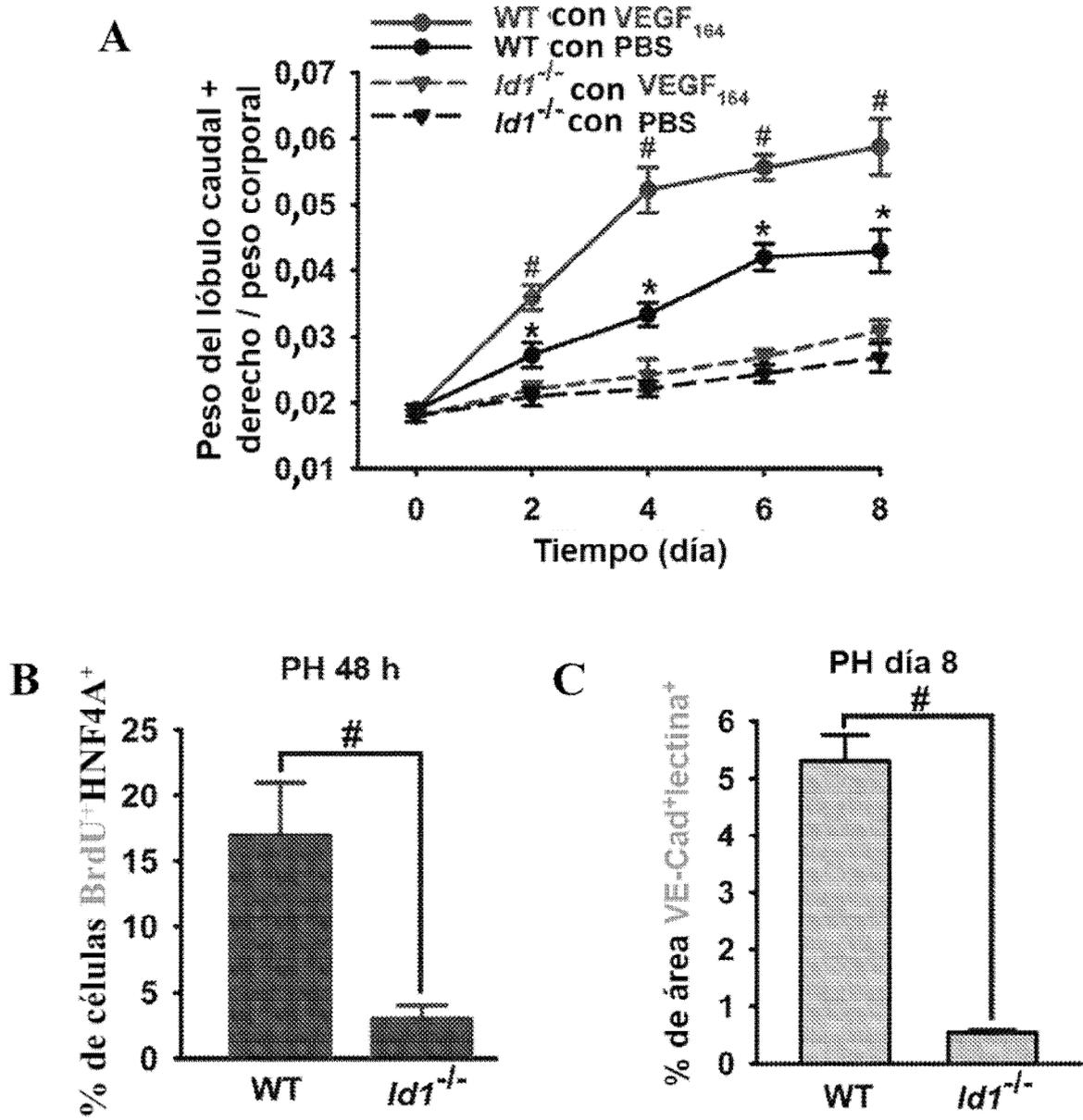


Figura 4

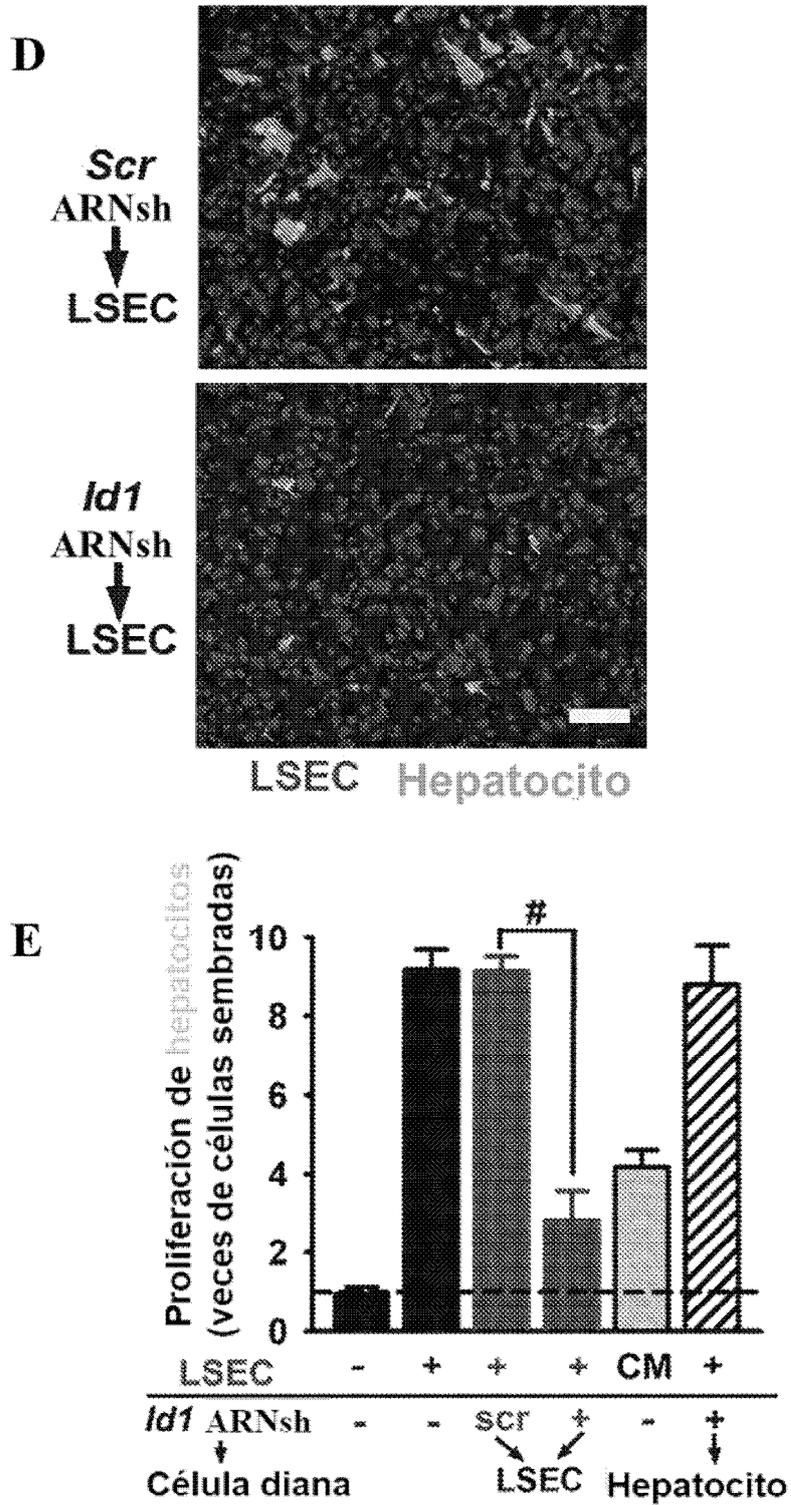


Figura 4

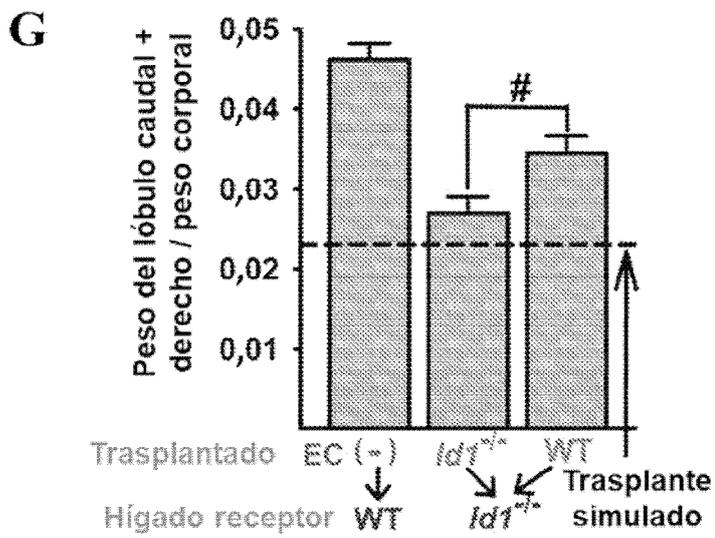
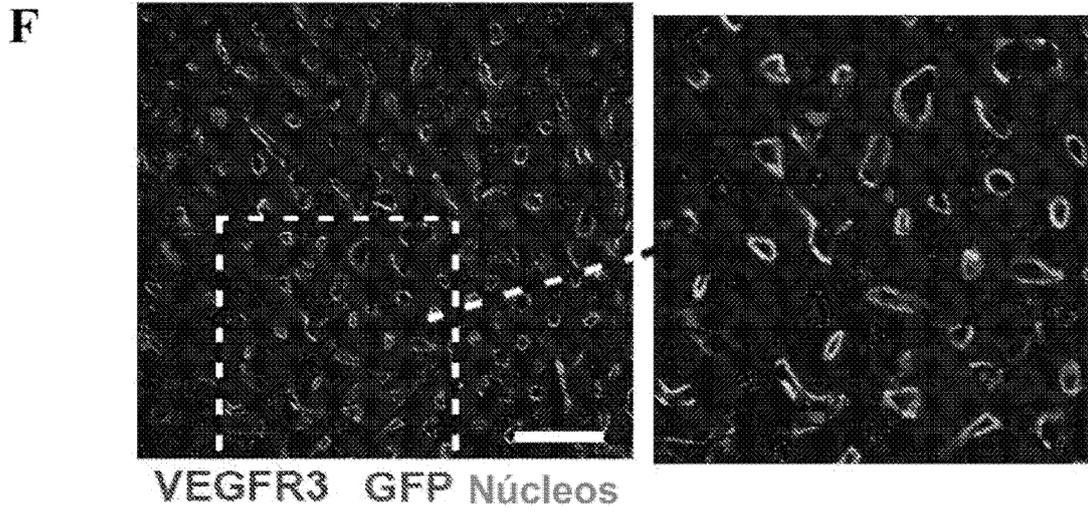
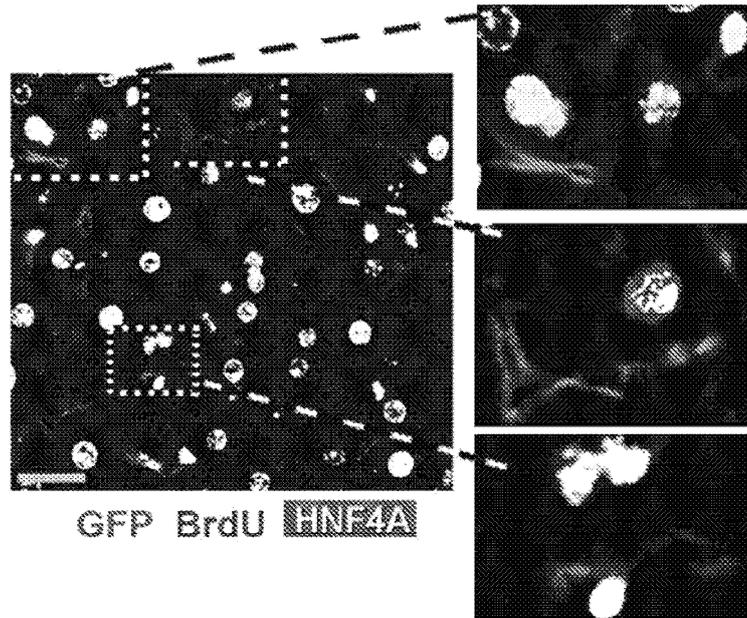


Figura 4

H



I

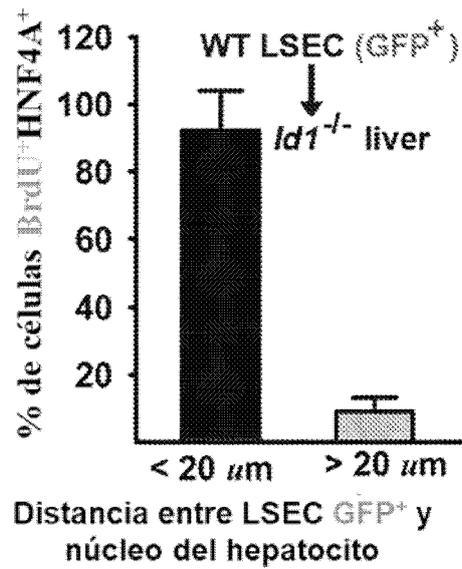


Figura 4

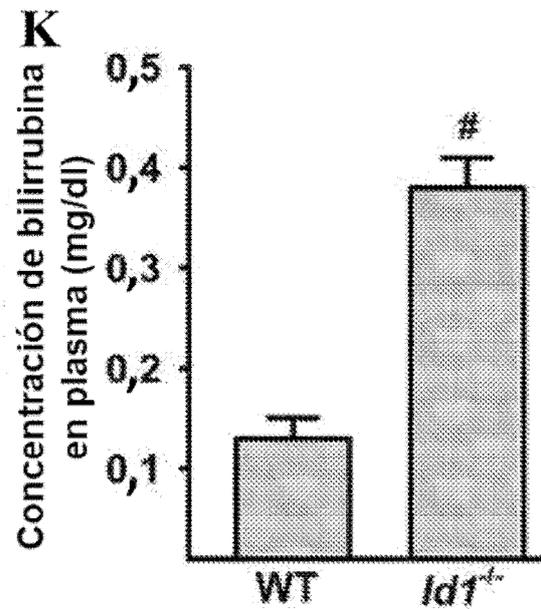
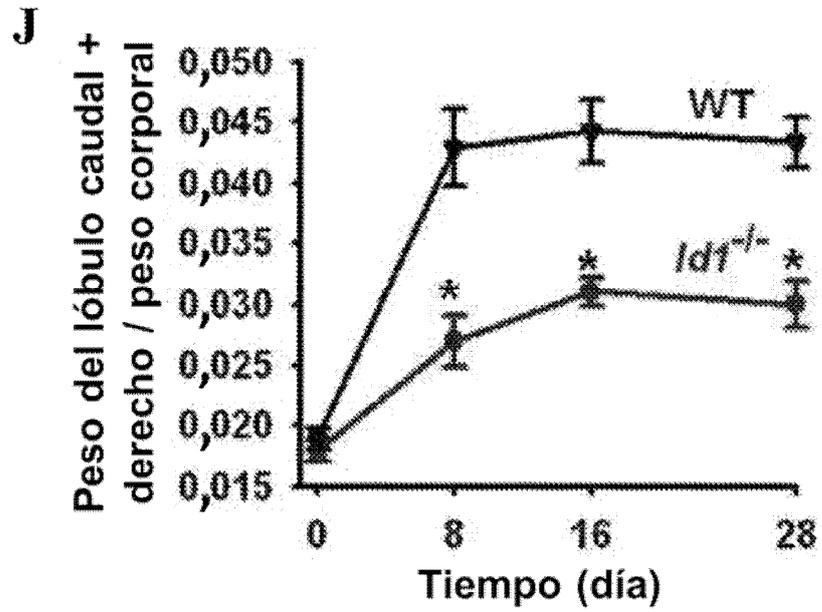


Figura 5

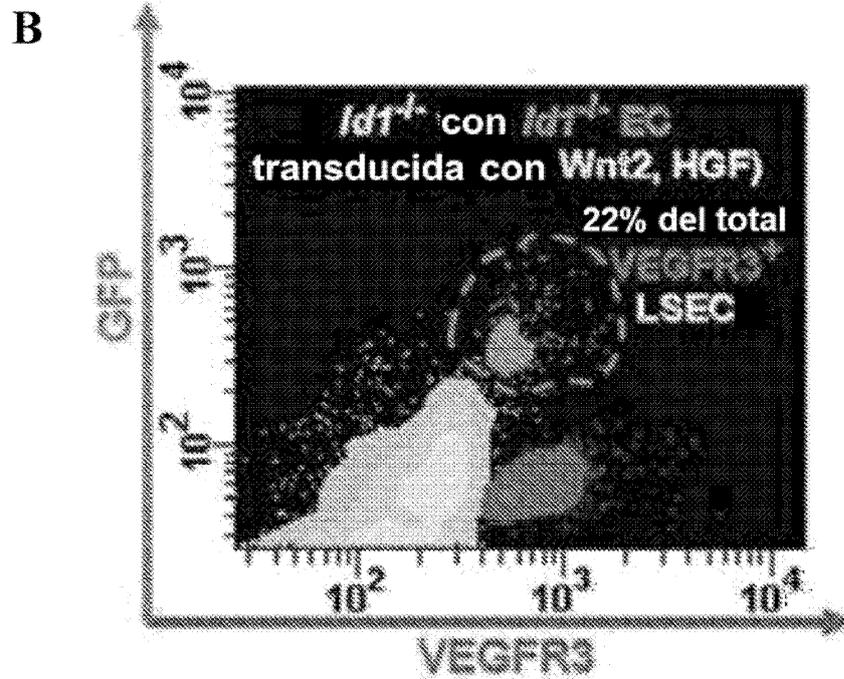
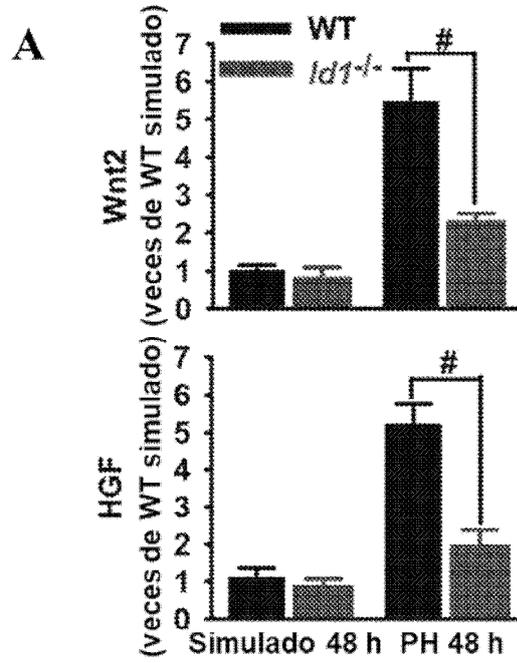


Figura 5

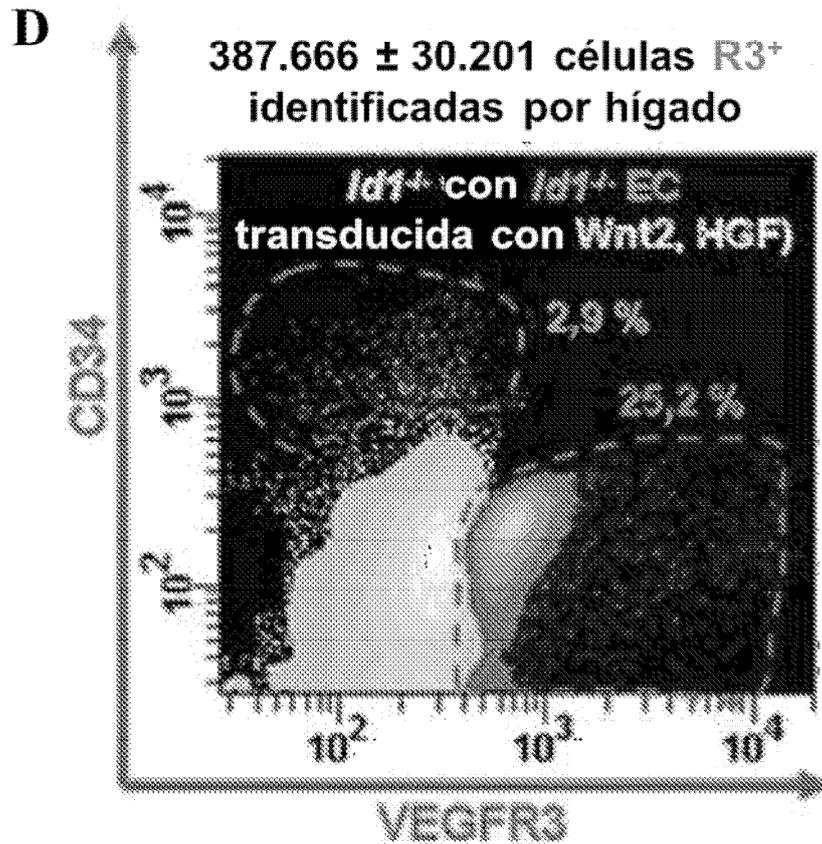
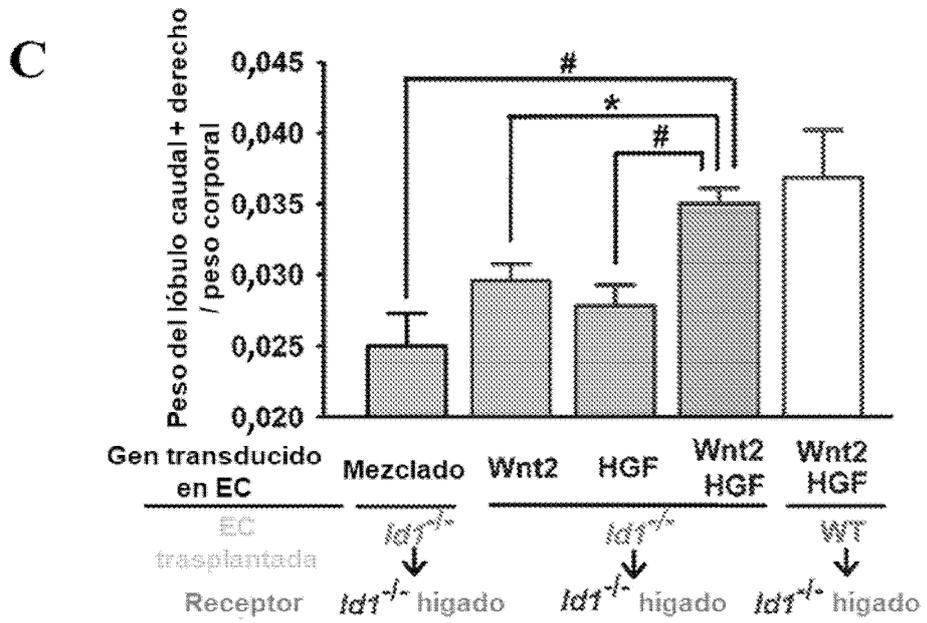
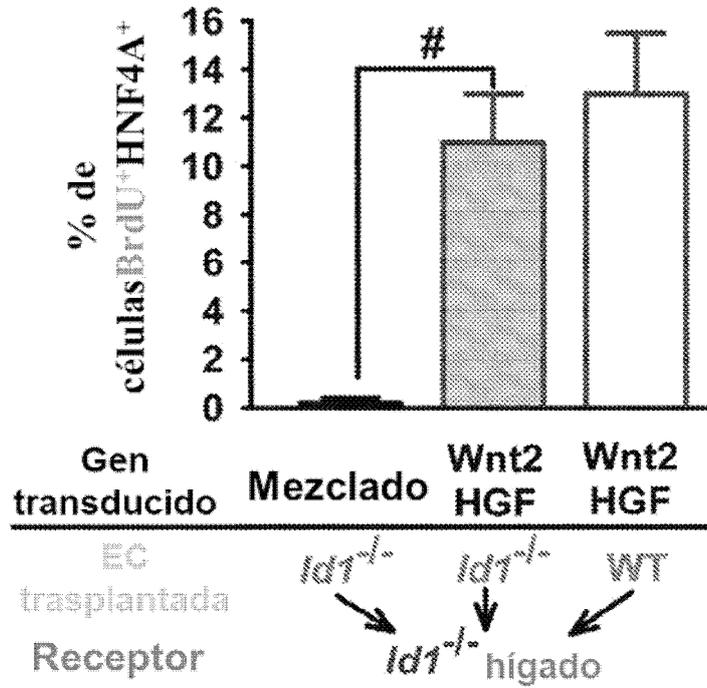


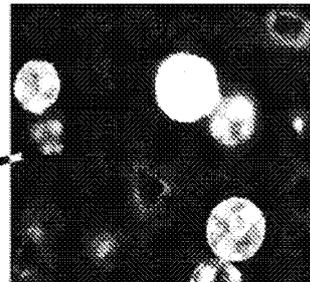
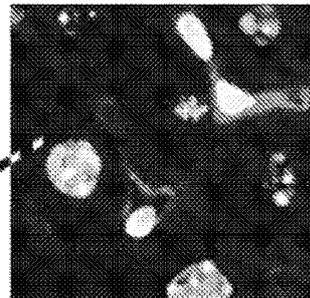
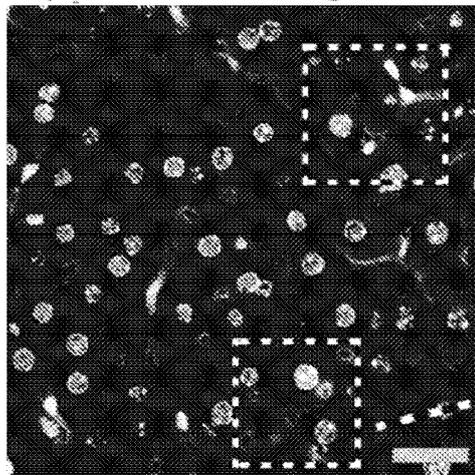
Figura 5

E



F

Id1^{-/-} *Wnt2*⁺ *HGF*⁺ *GFP*⁺ LSEC
trasplantada en el hígado *Id1*^{-/-}



GFP BrdU HNF4A

Figura 5

G

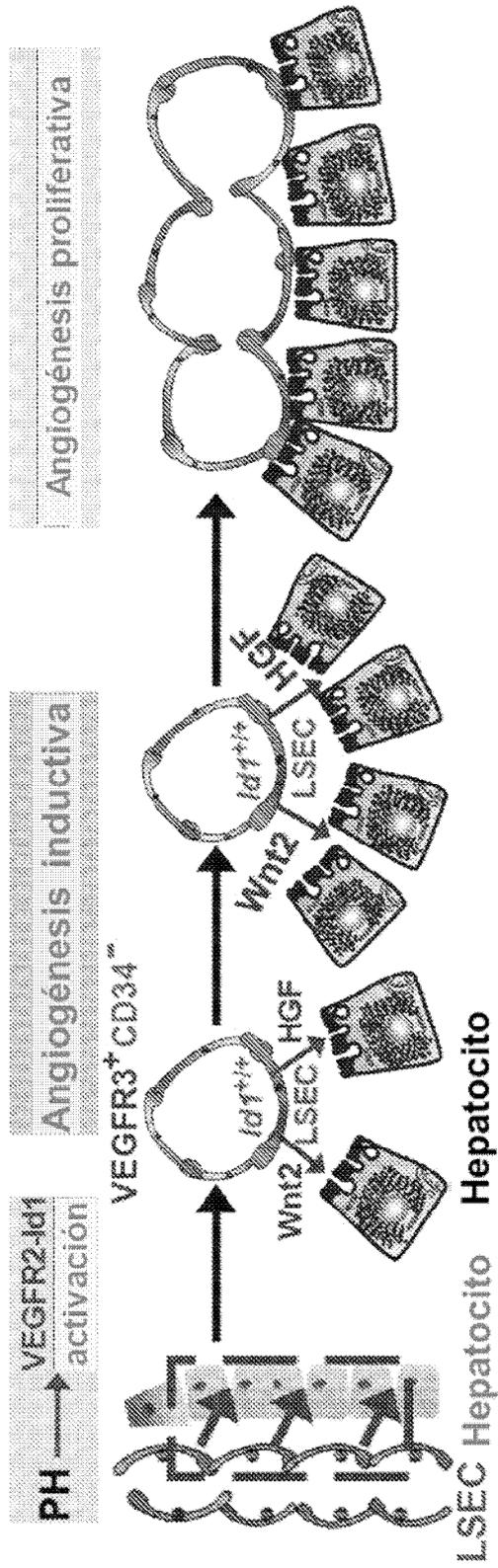


Figura 6

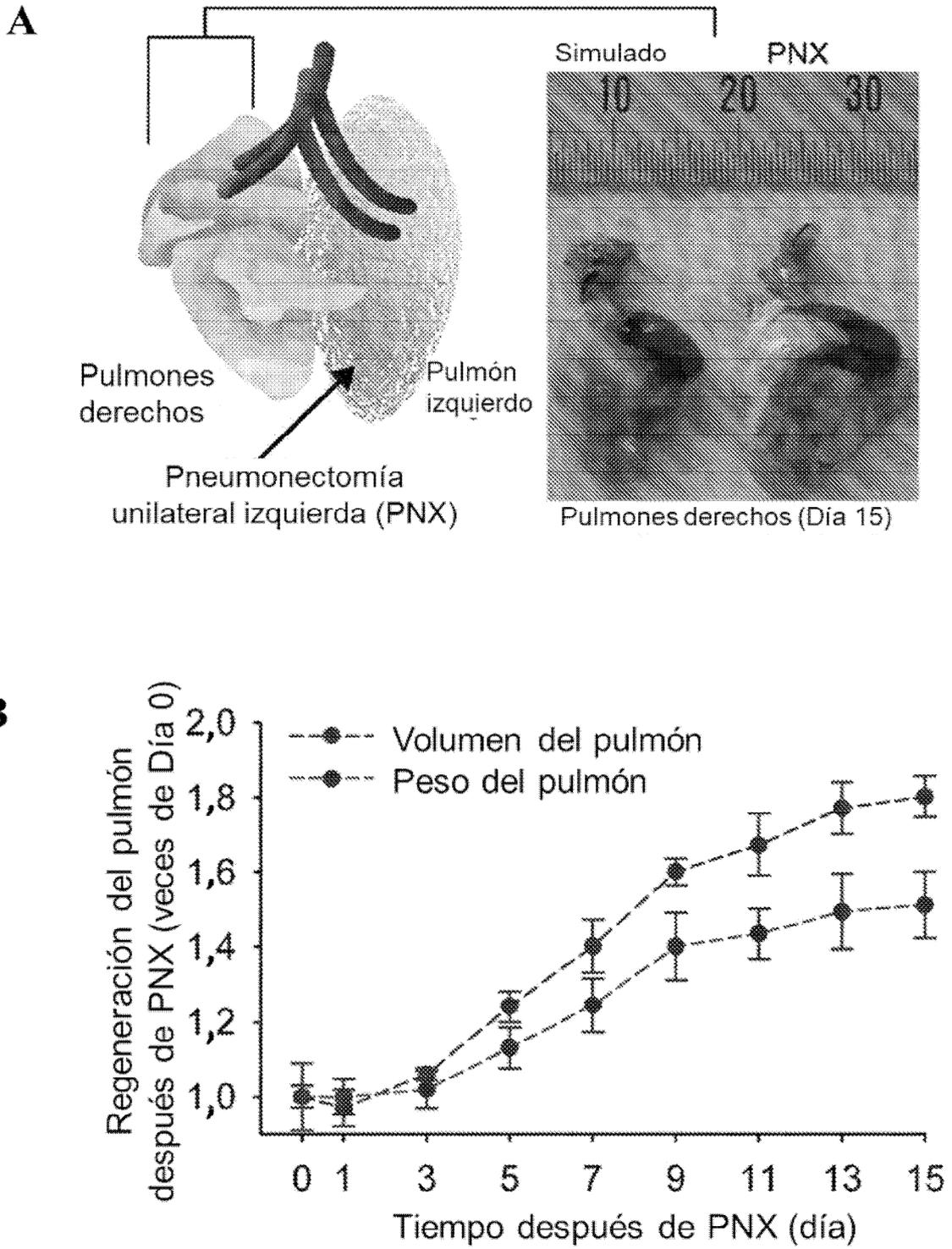


Figura 6

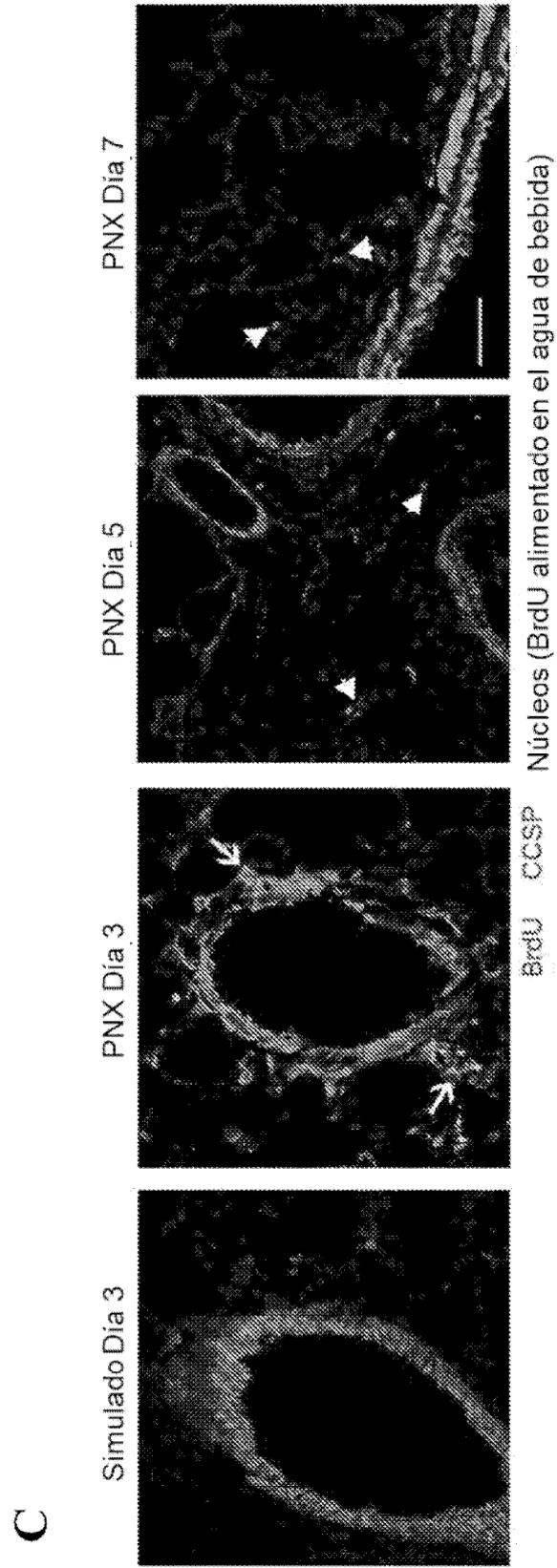
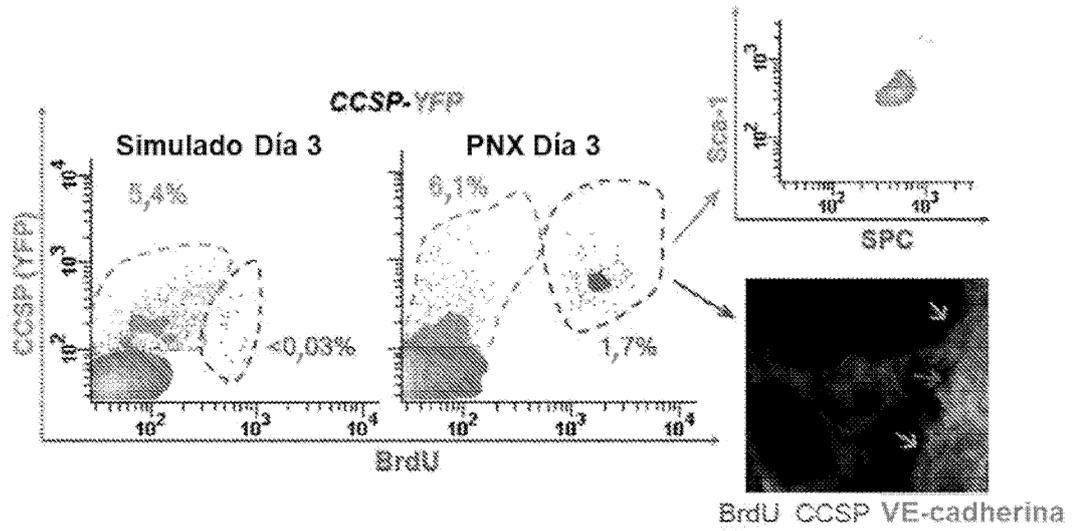


Figura 6

D



E

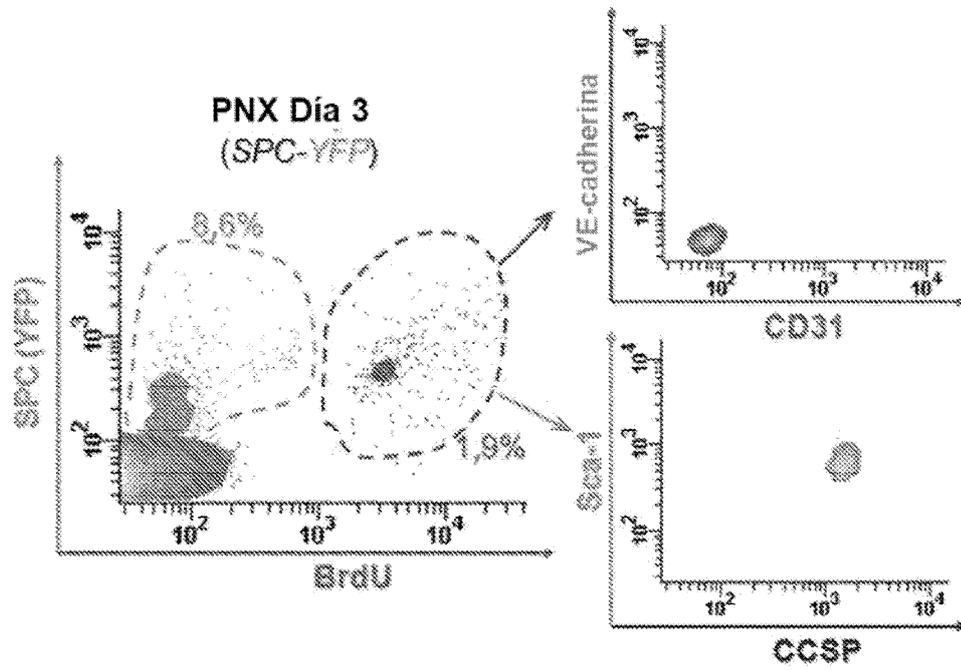


Figura 7

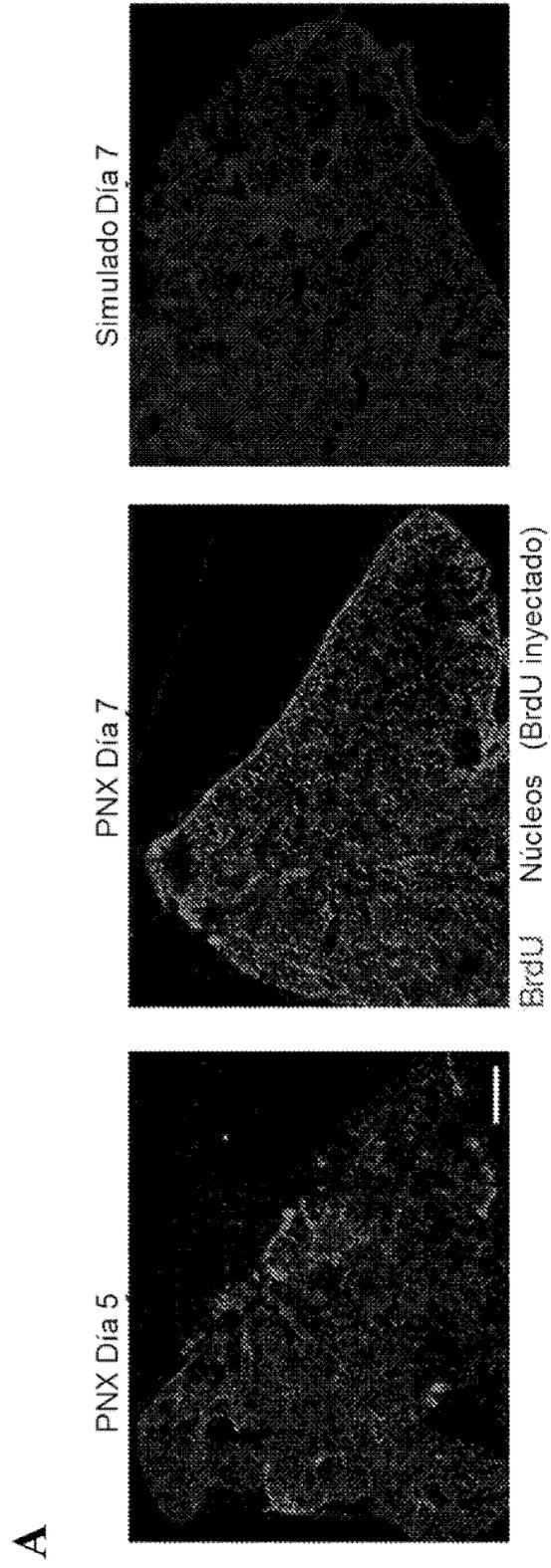
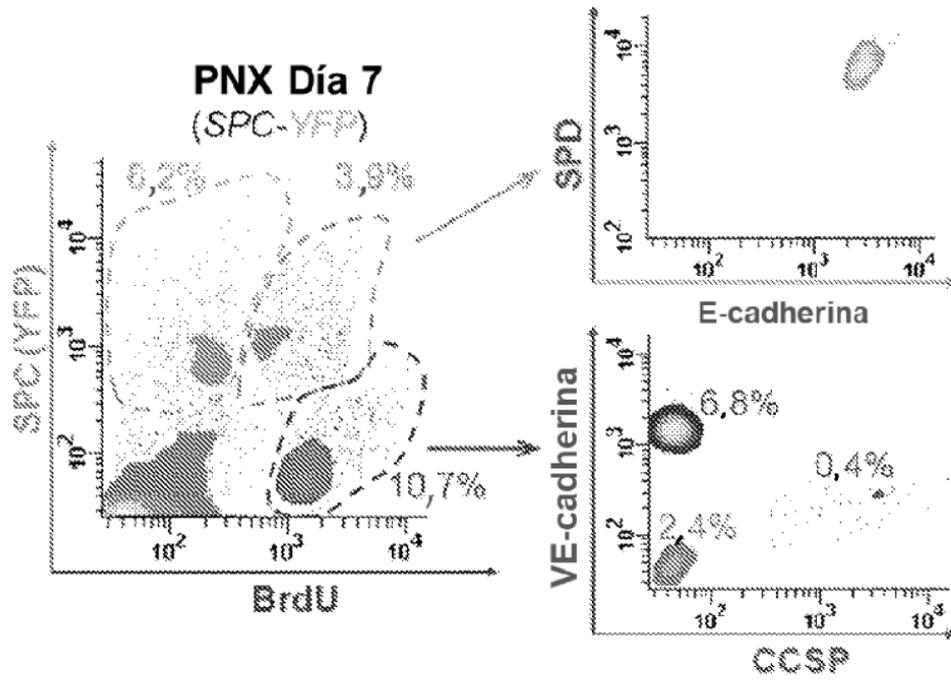


Figura 7

B



C

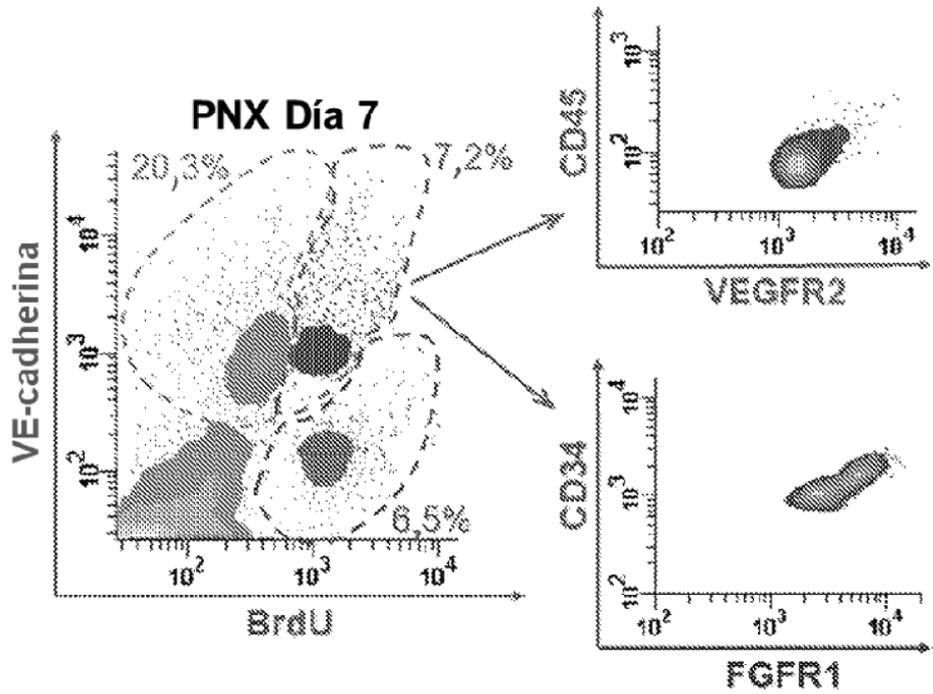


Figura 7

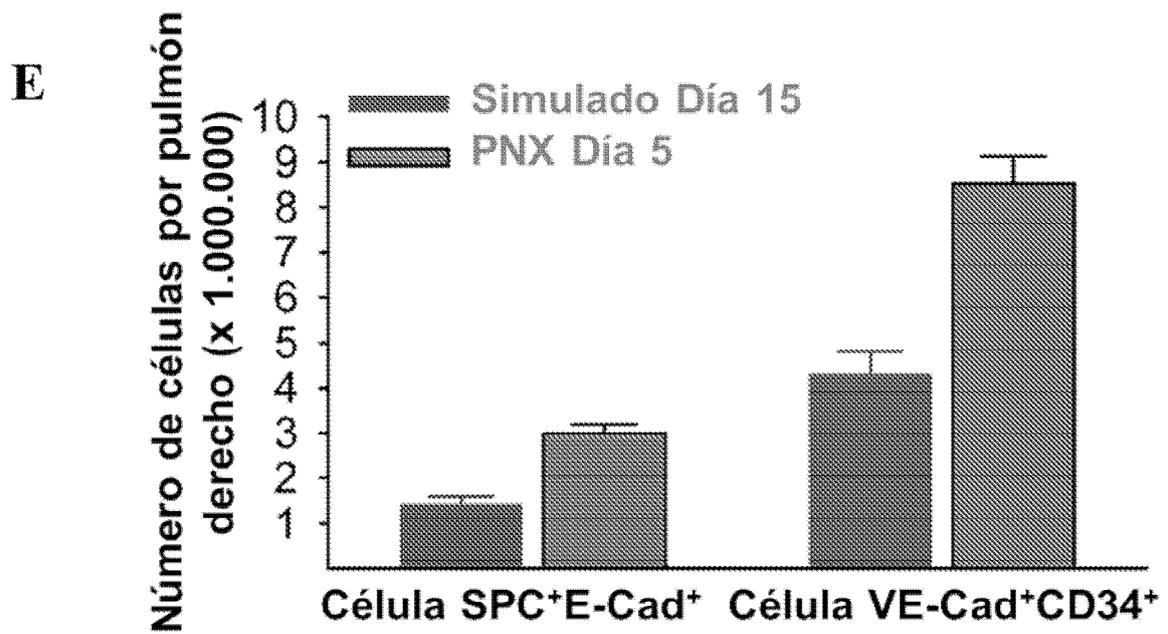
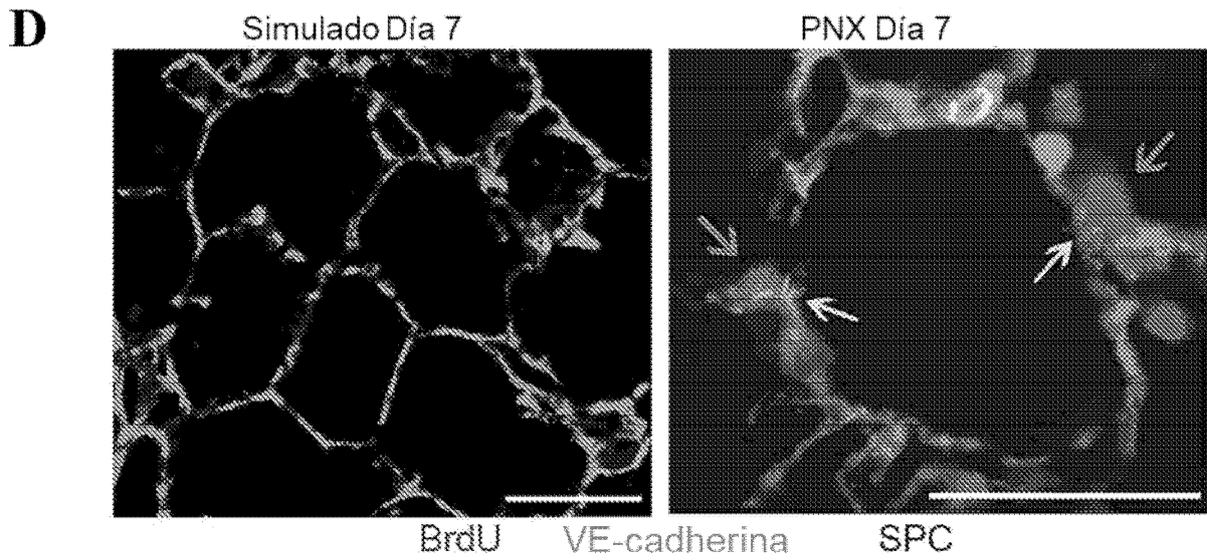
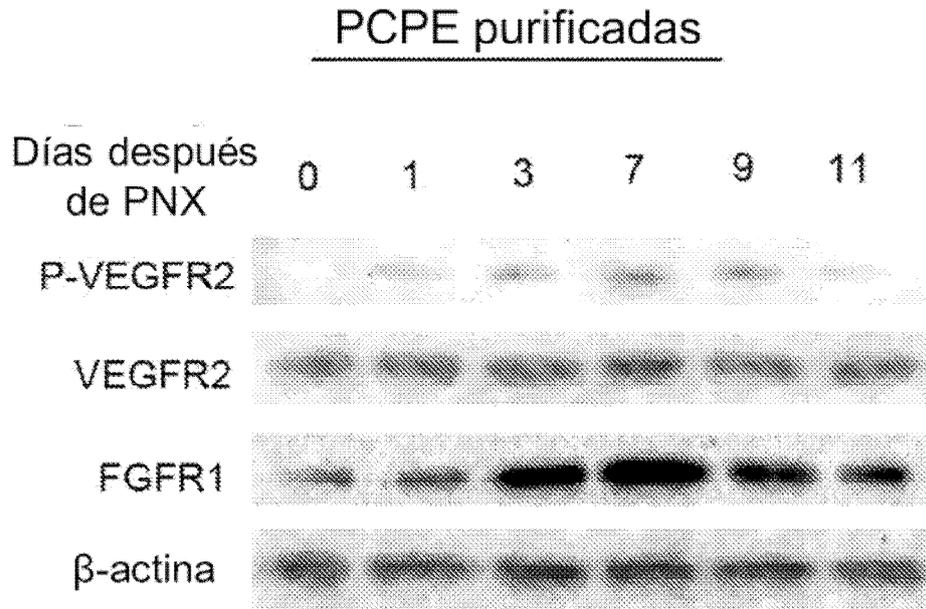


Figura 8

A



B

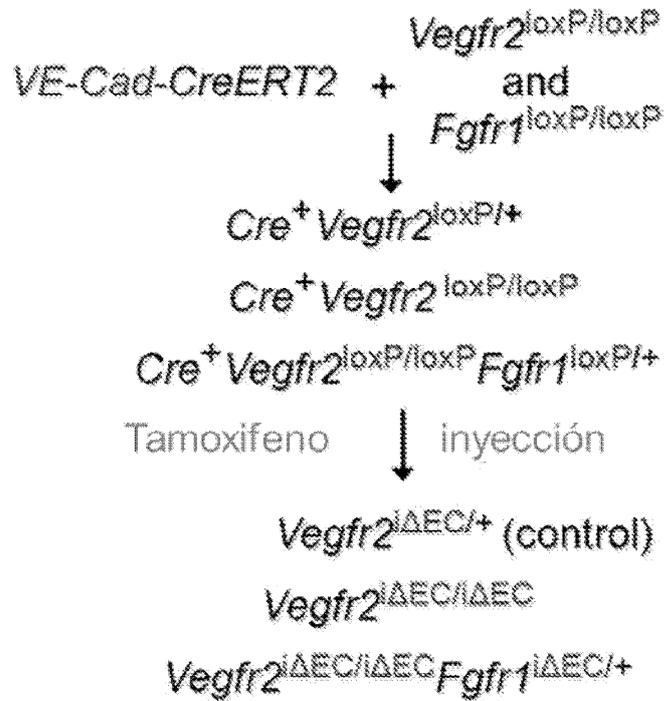


Figura 8

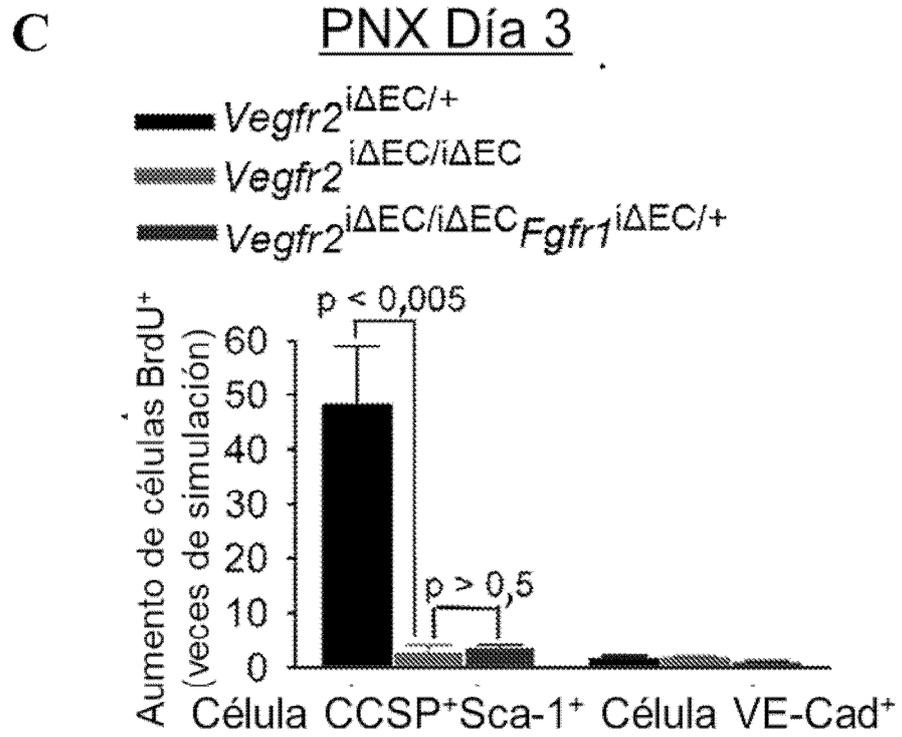


Figura 8

D

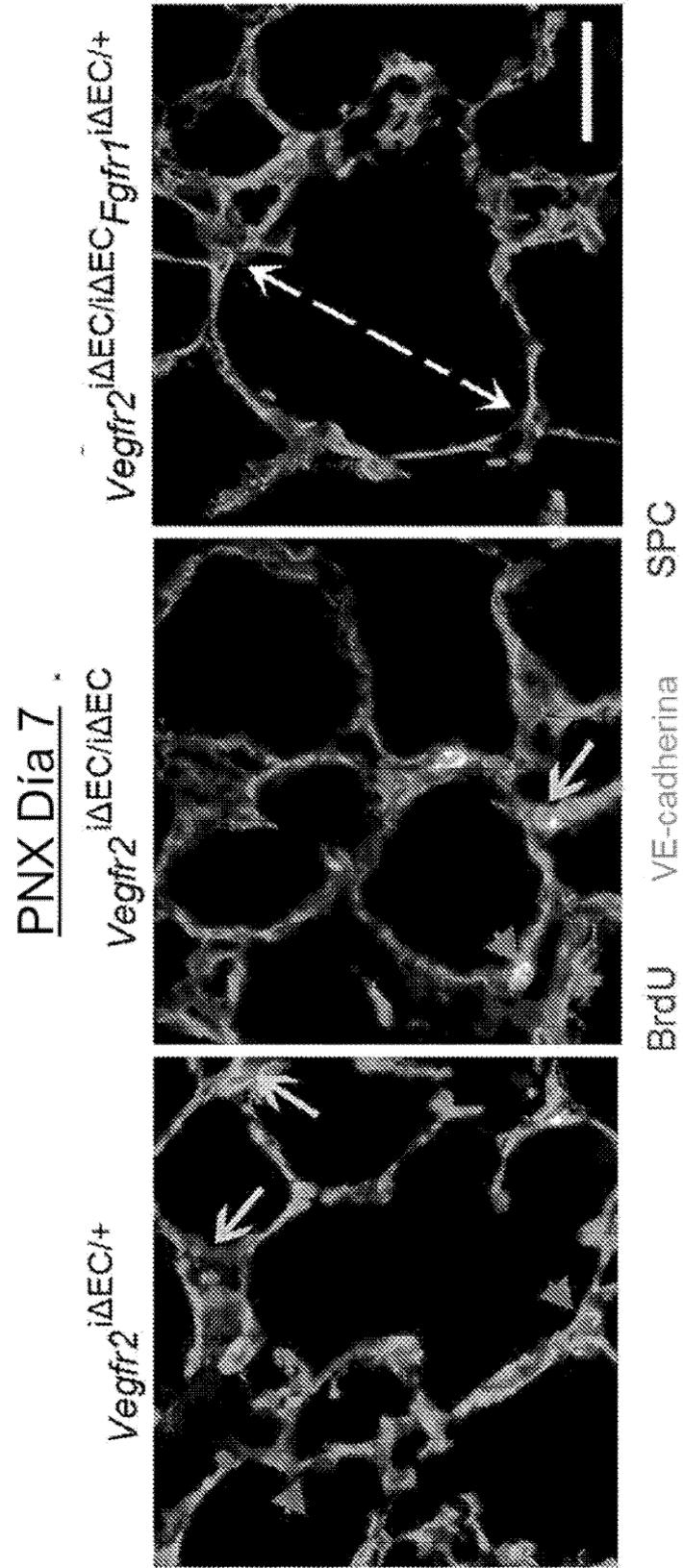


Figura 8

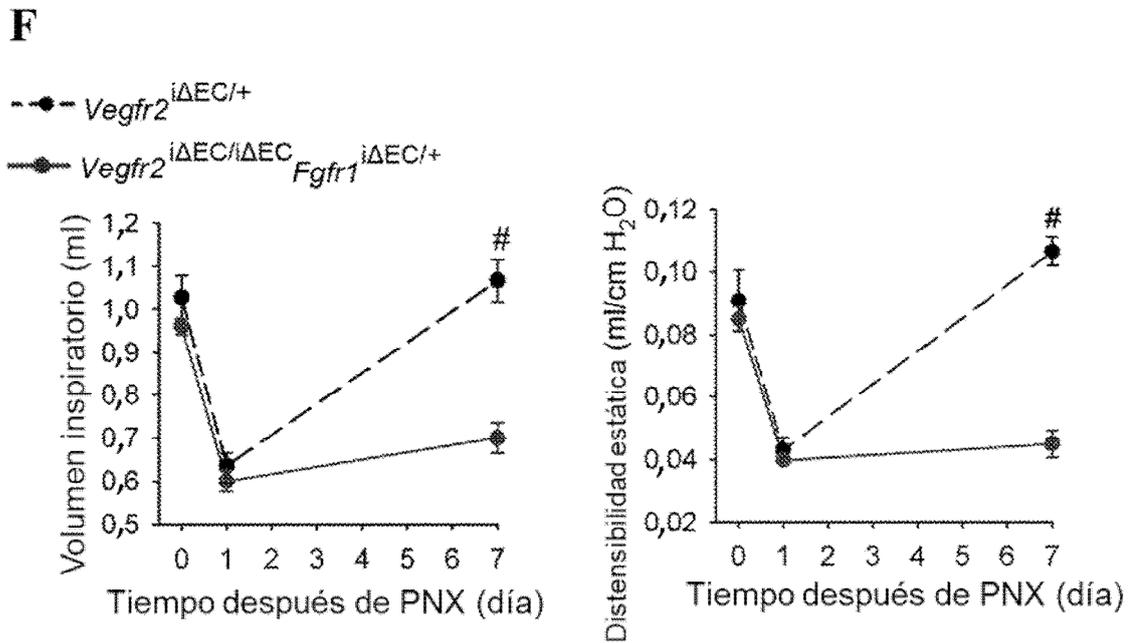
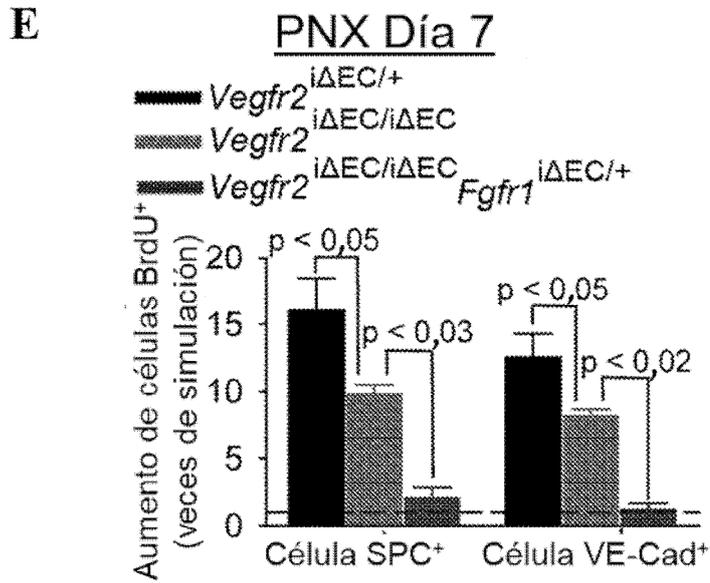


Figura 8

G

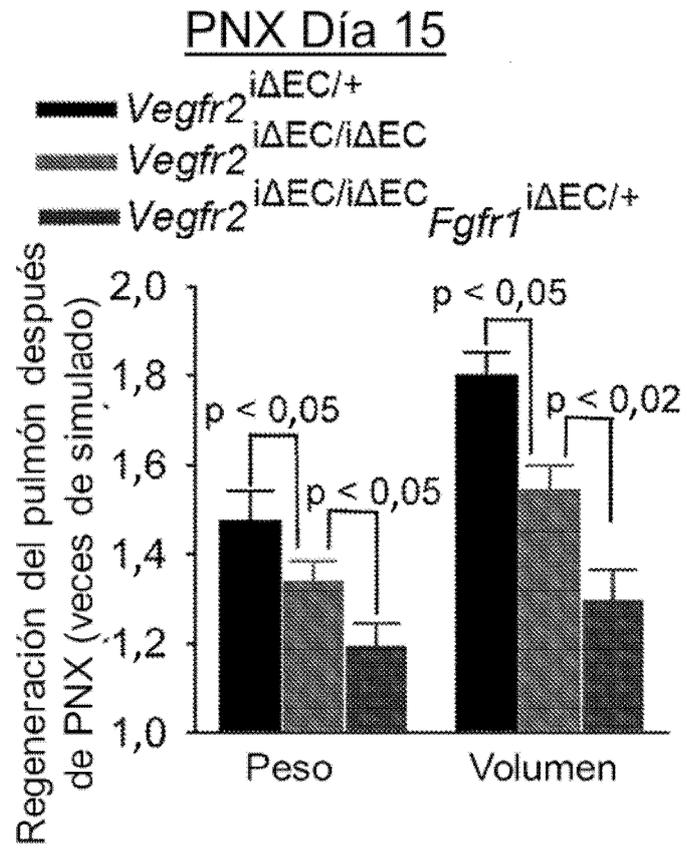


Figura 9

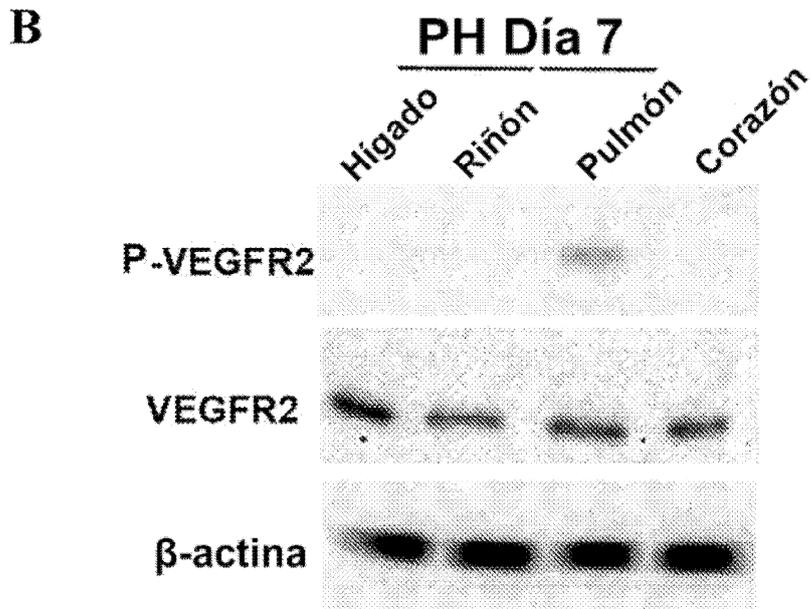
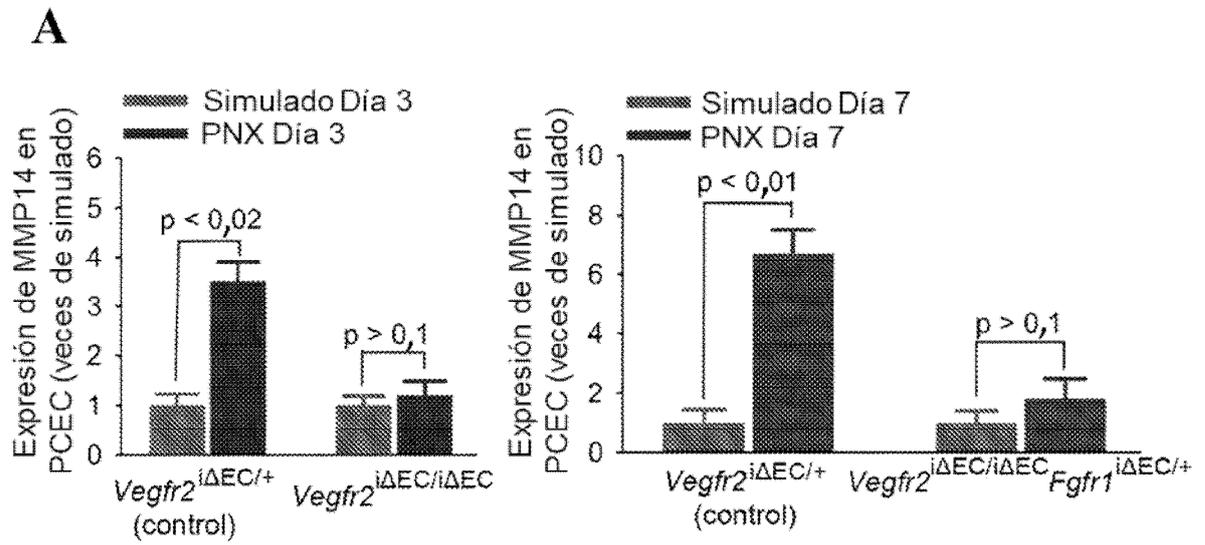


Figura 9

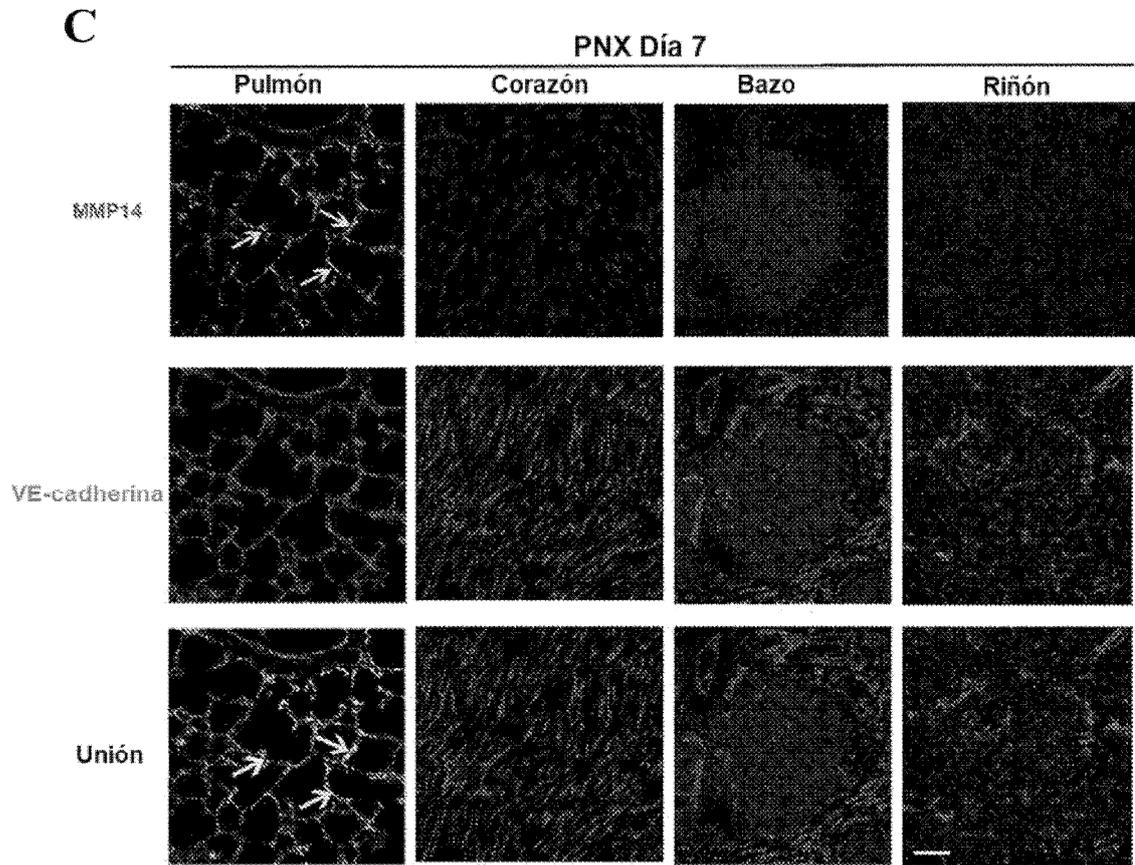
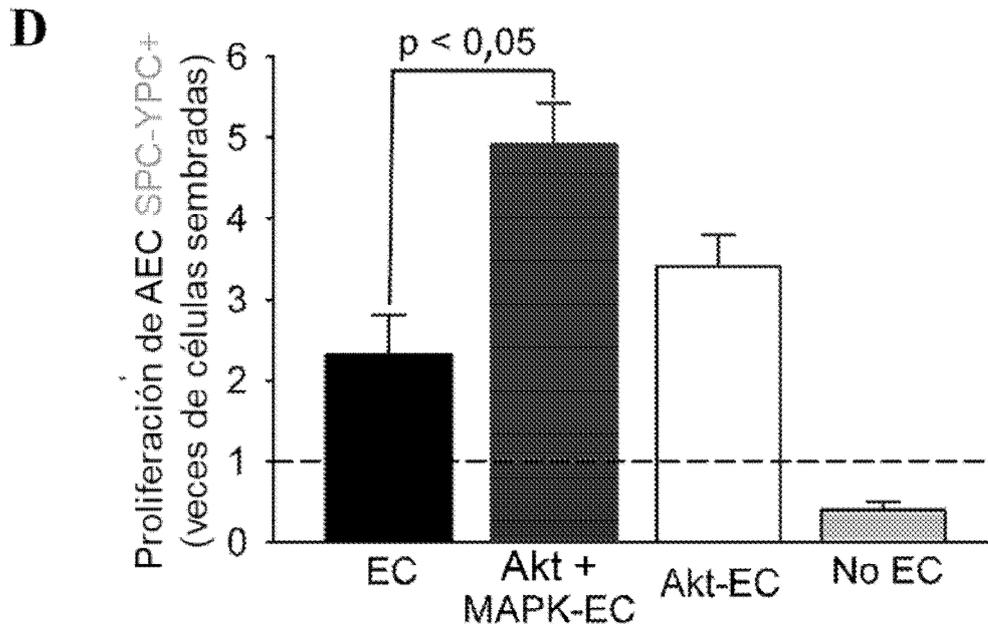


Figura 9



E

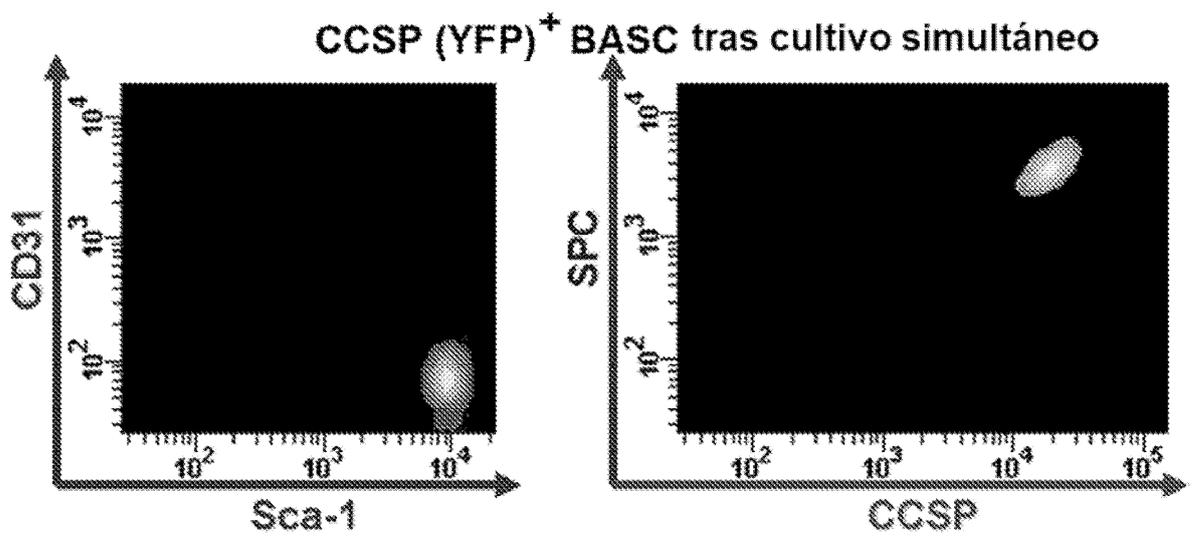
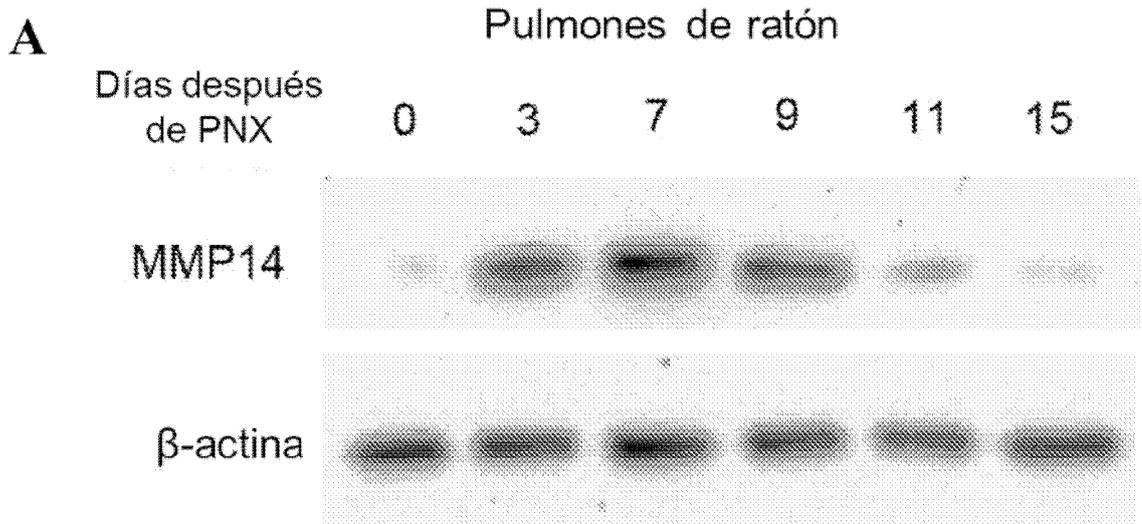


Figura 10



B

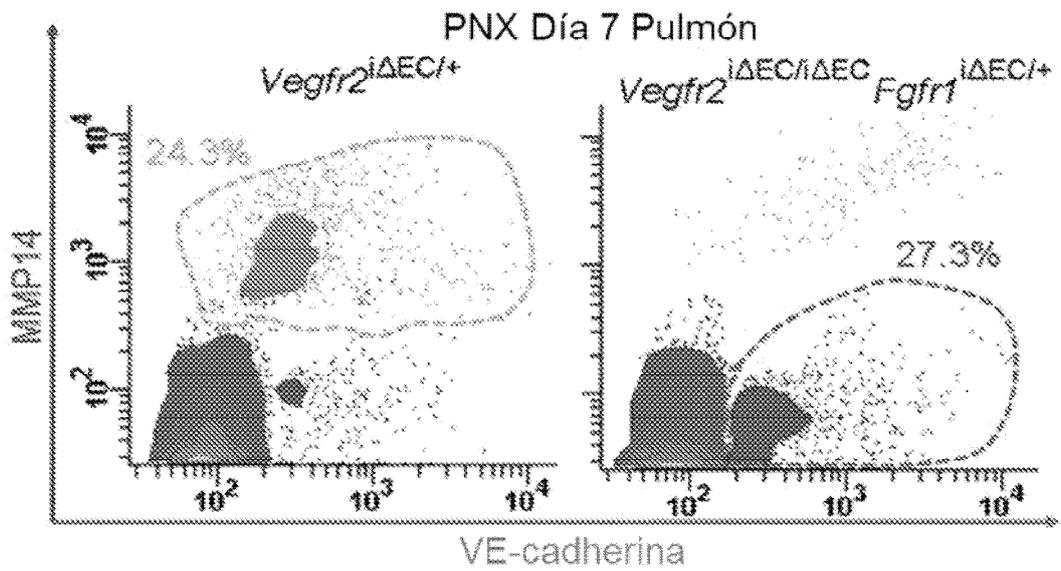


Figura 10

C

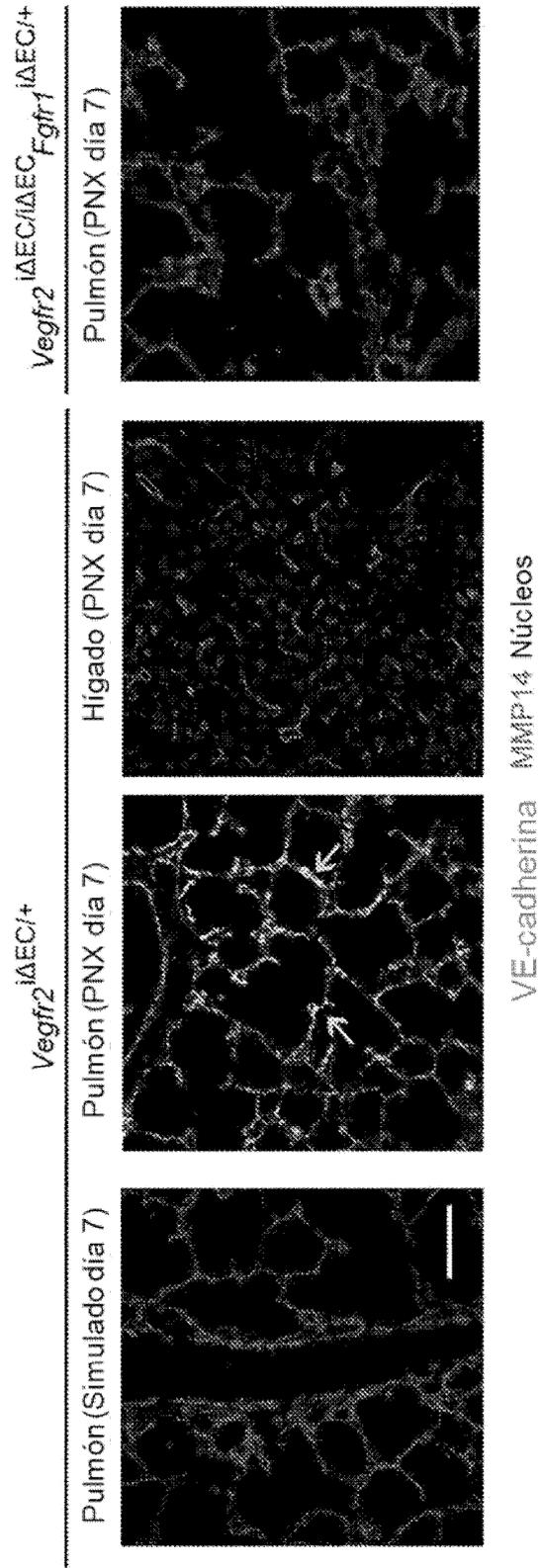


Figura 10

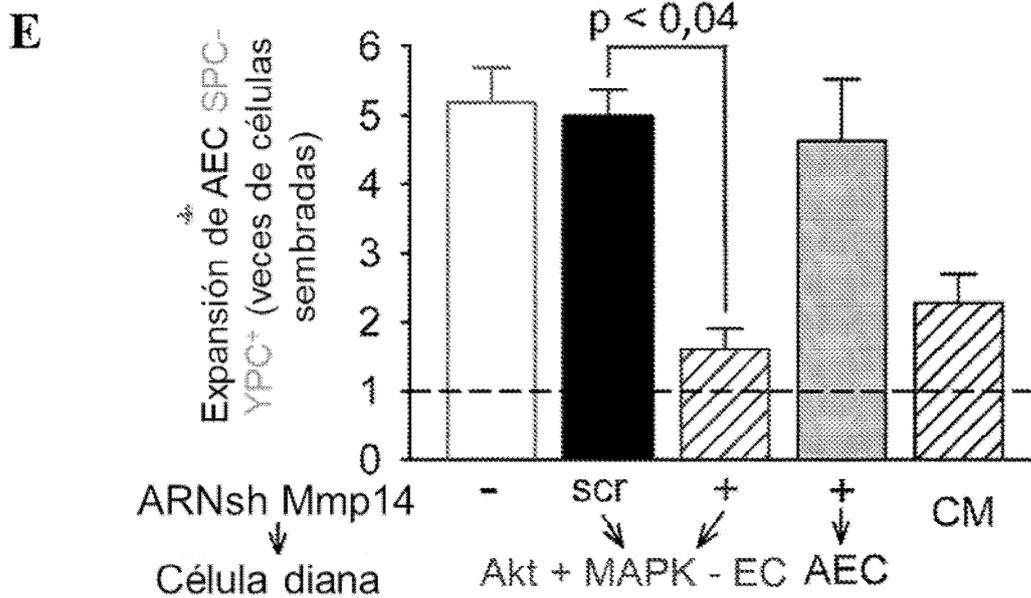
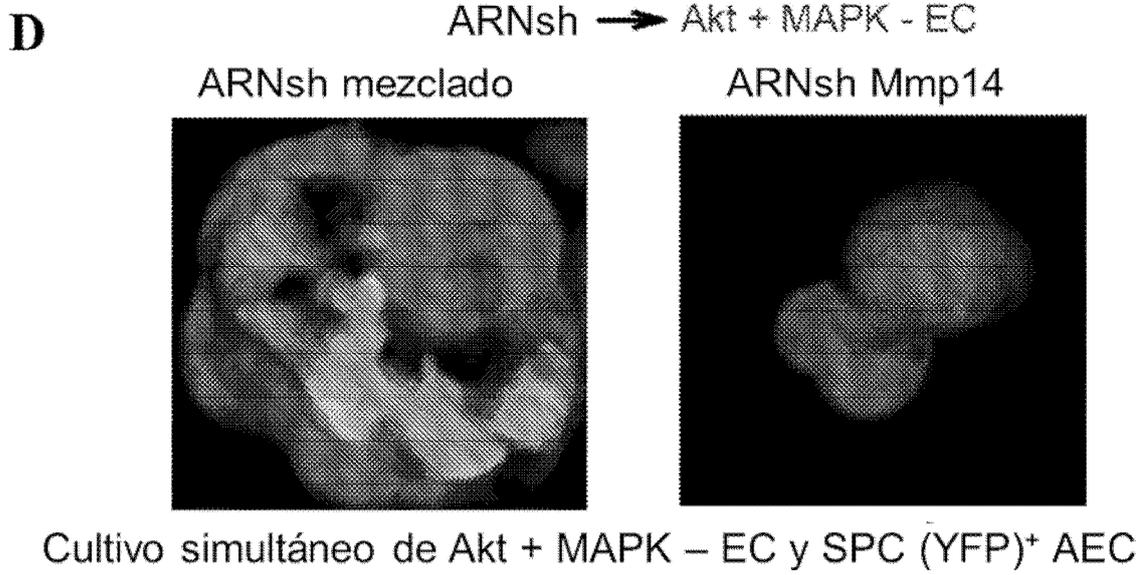


Figura 10

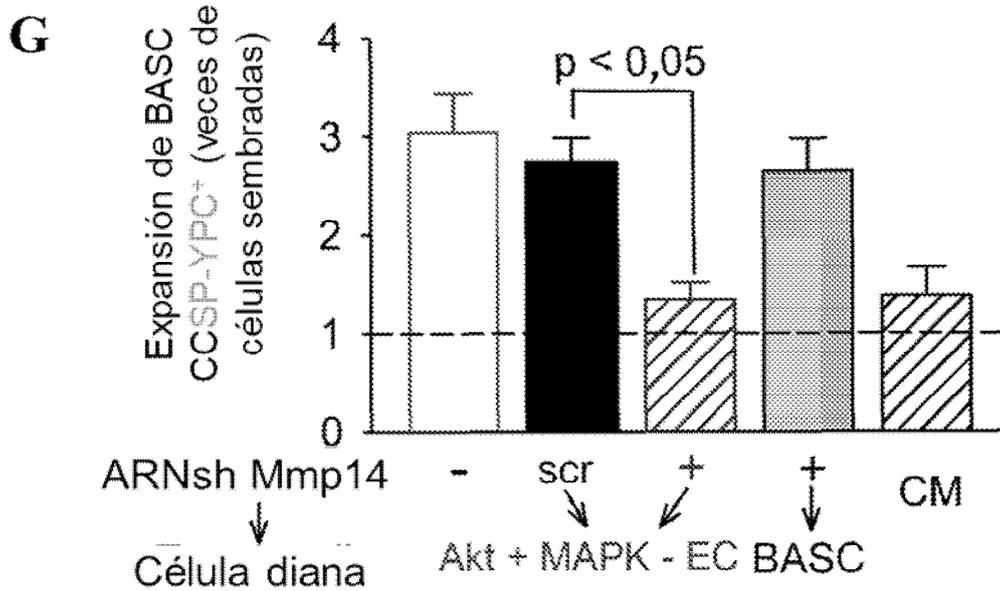
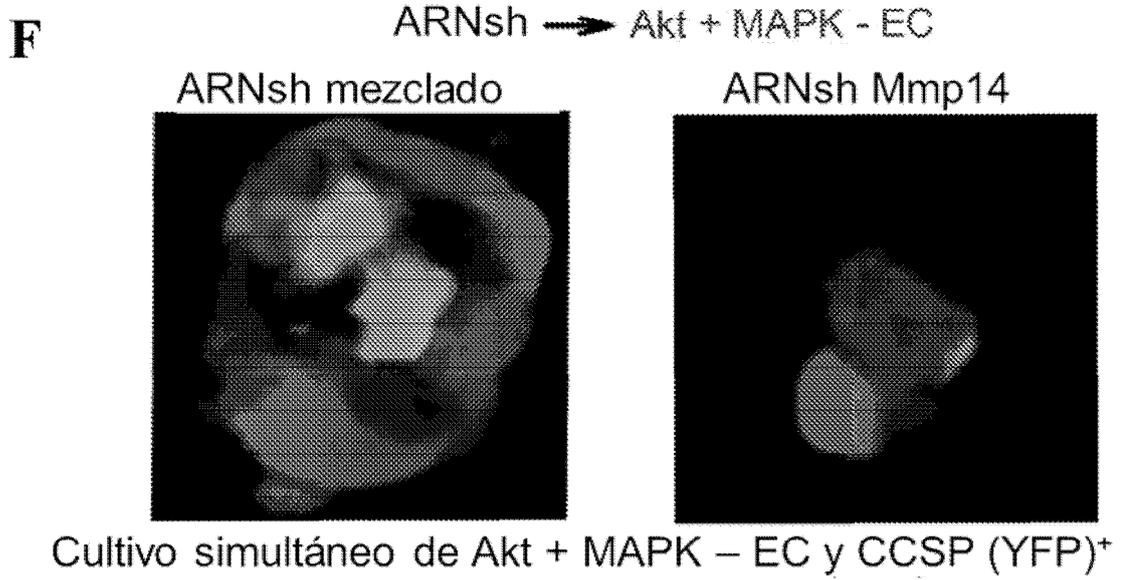


Figura 11

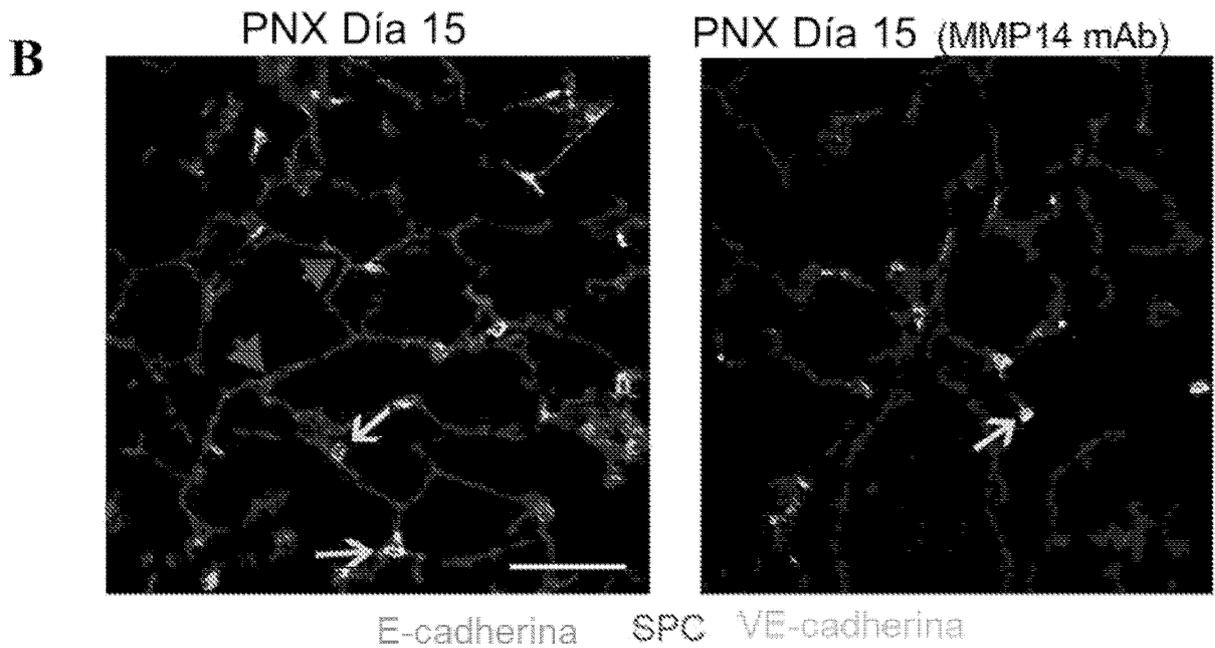
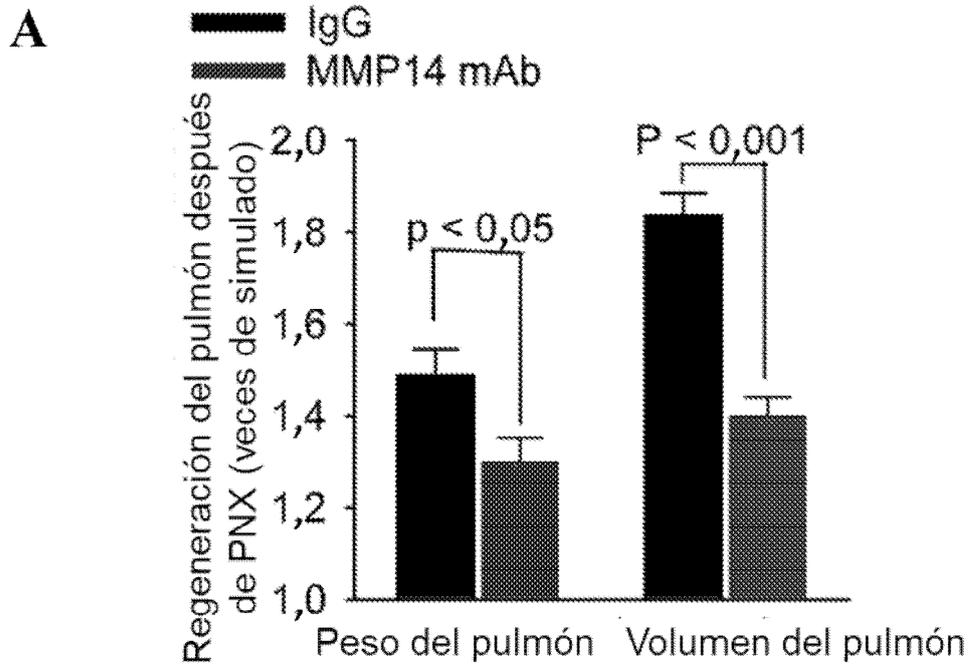


Figura 11

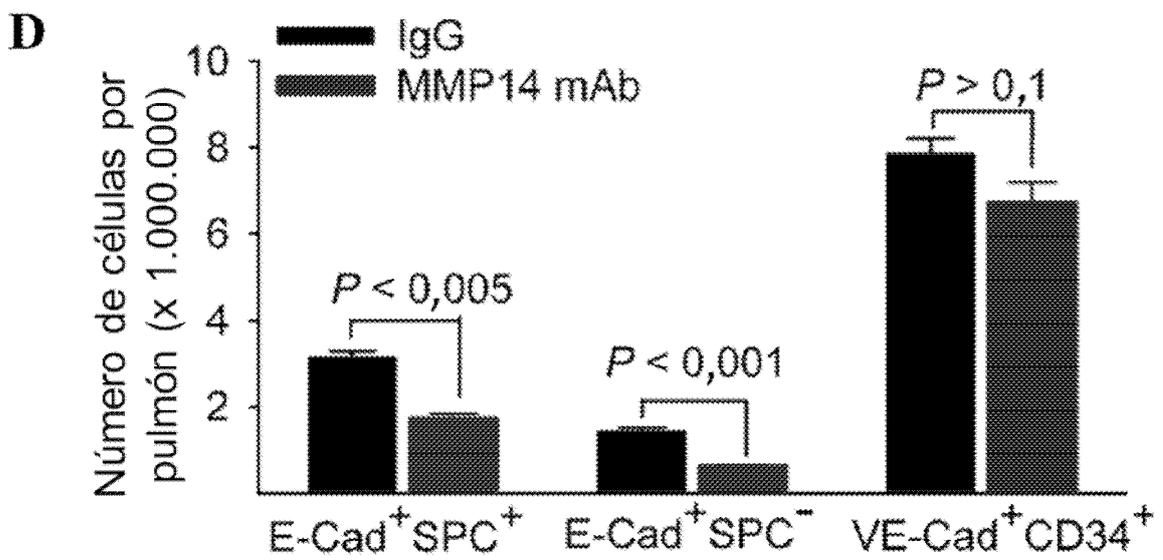
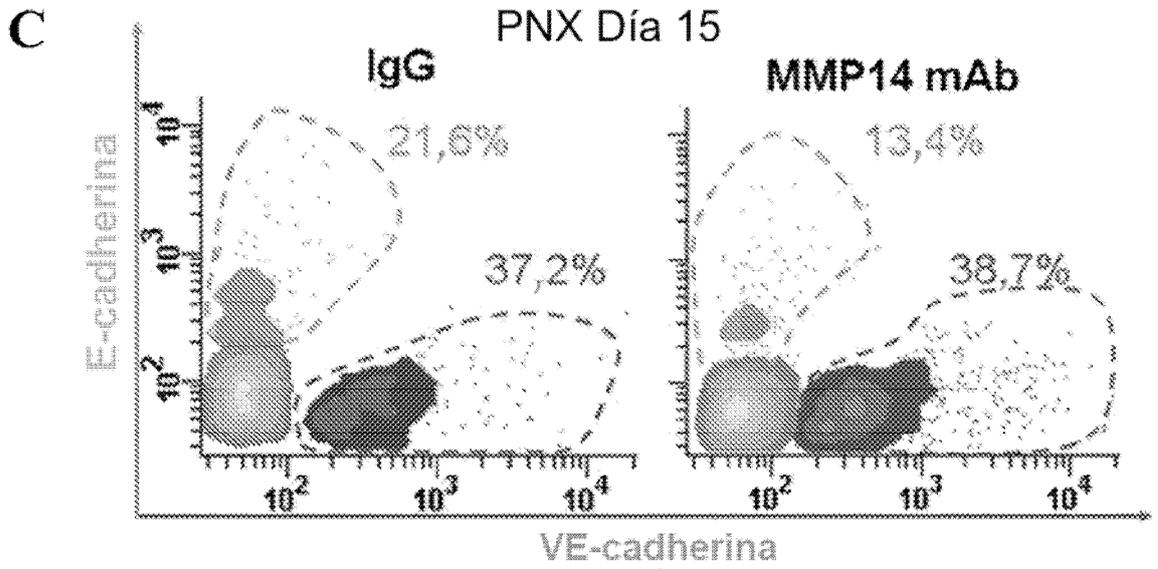


Figura 11

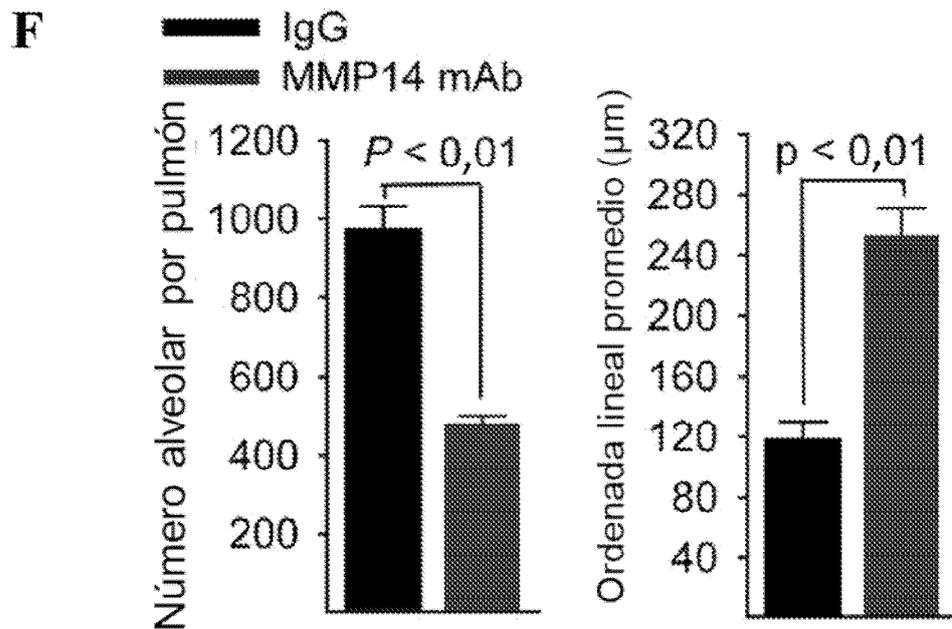
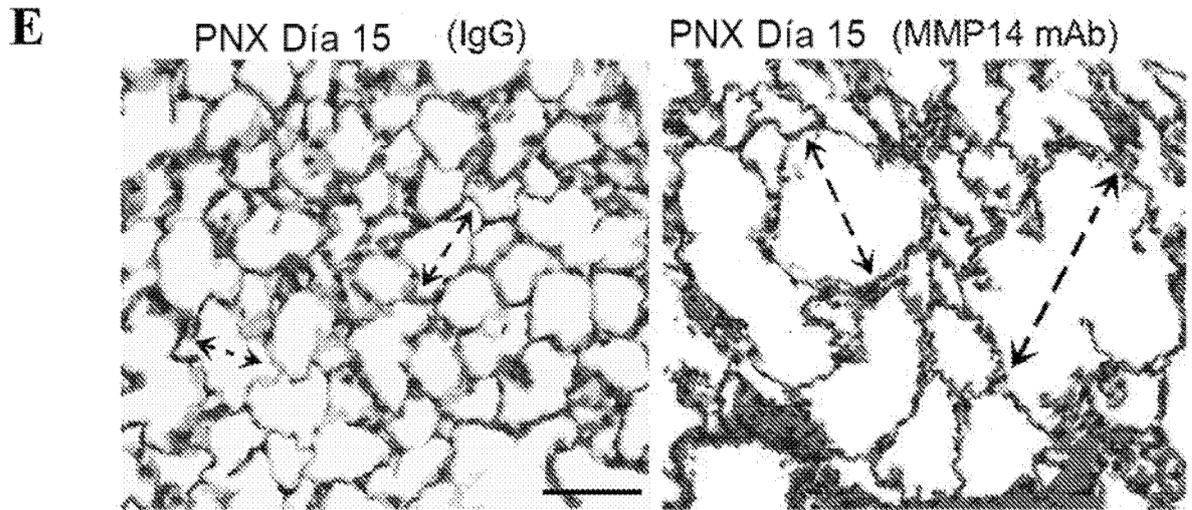


Figura 12

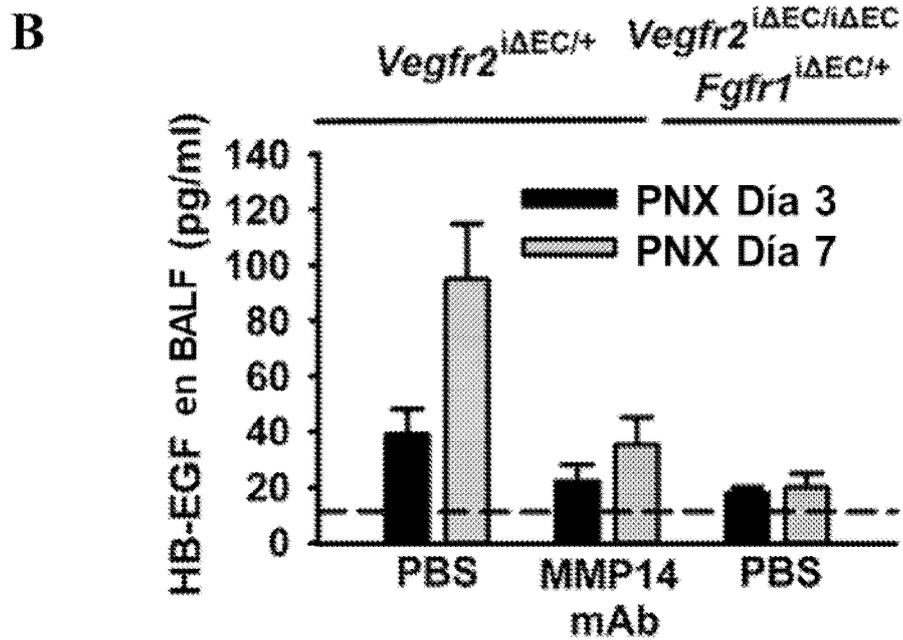
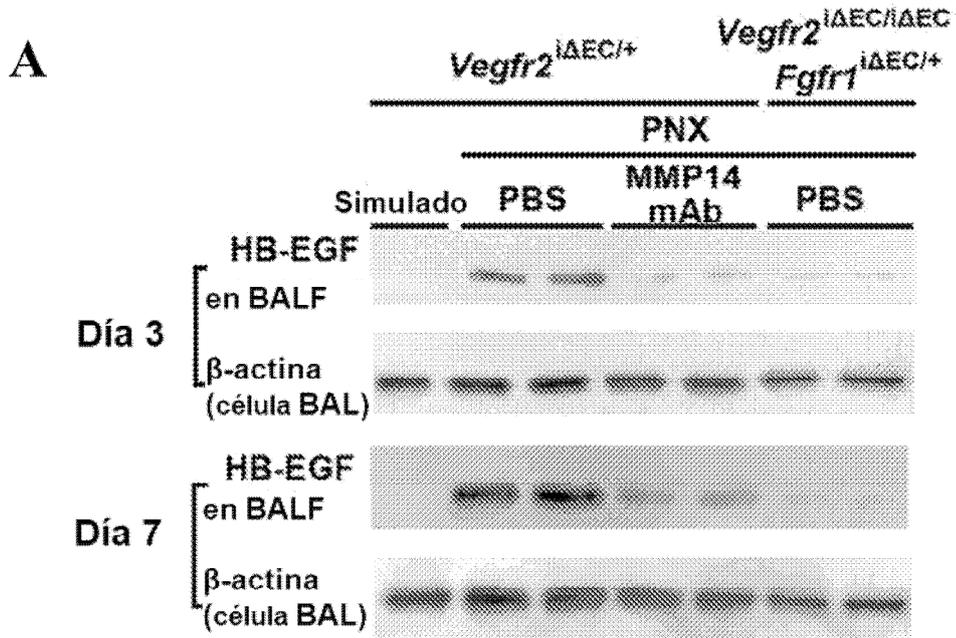


Figura 12

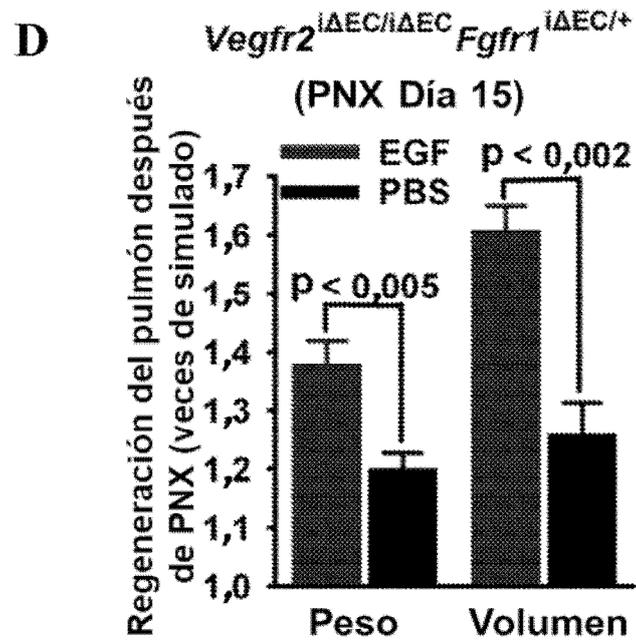
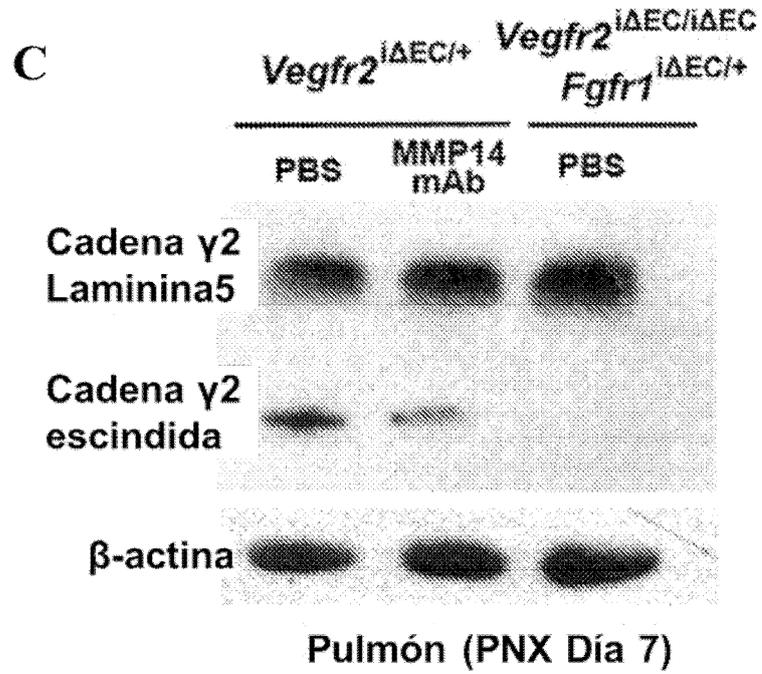


Figura 12

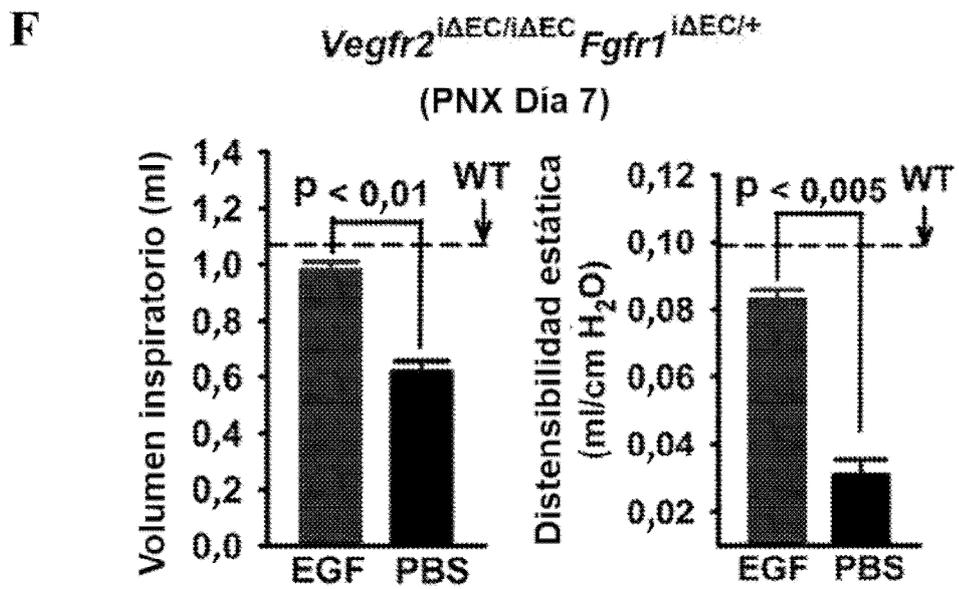
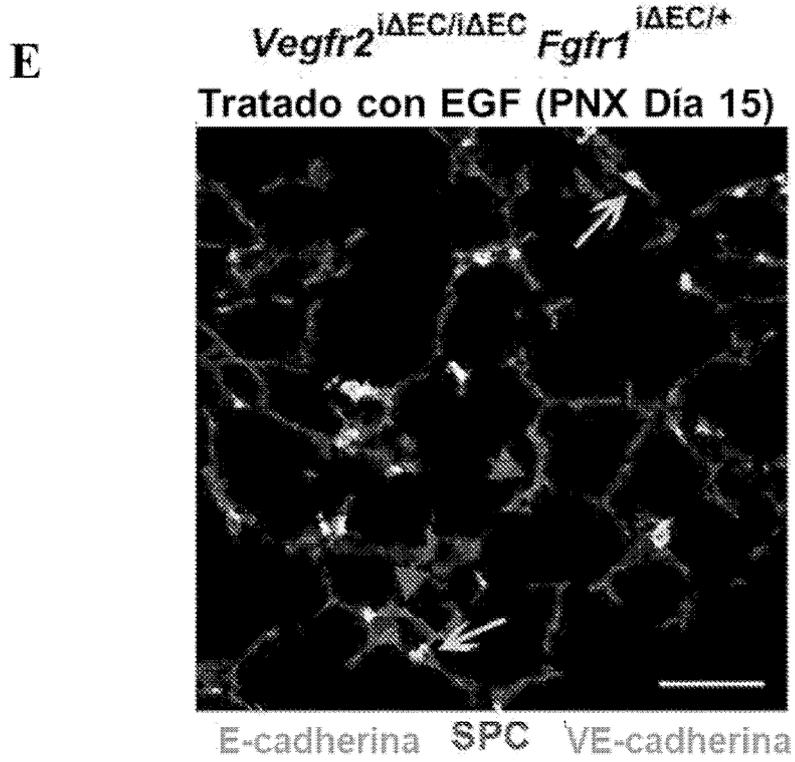


Figura 12

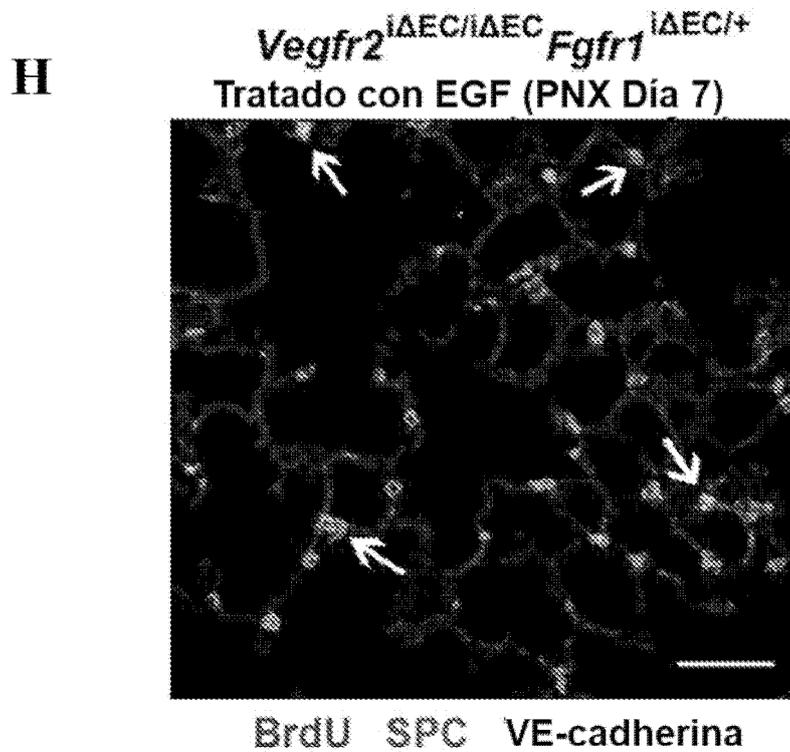
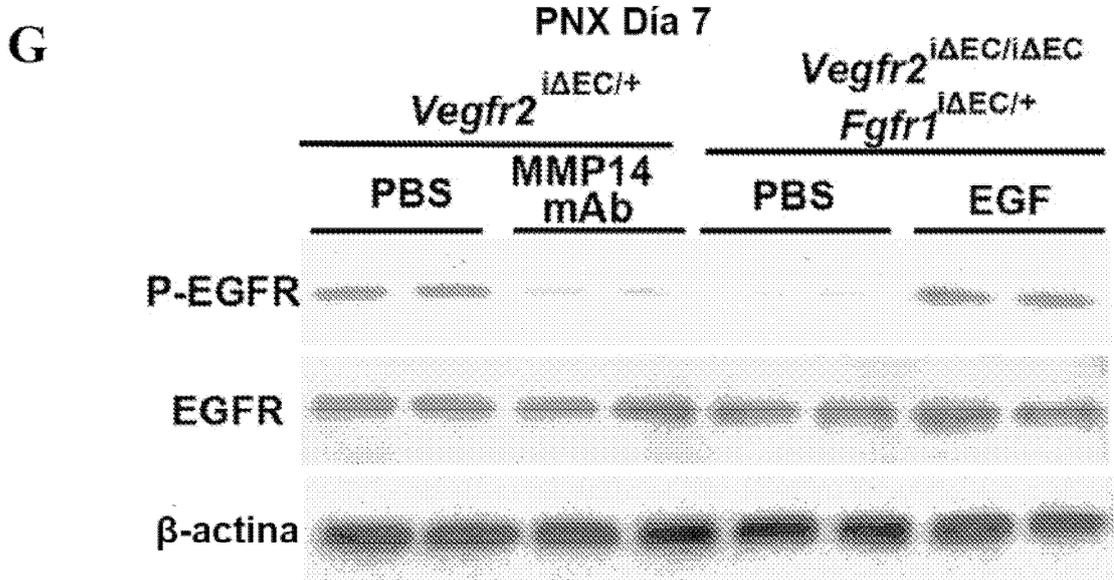


Figura 12

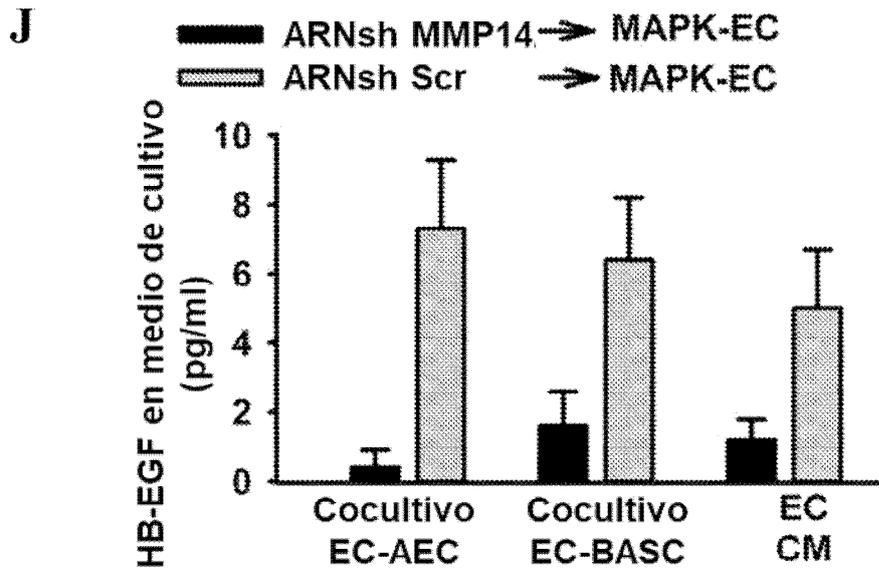
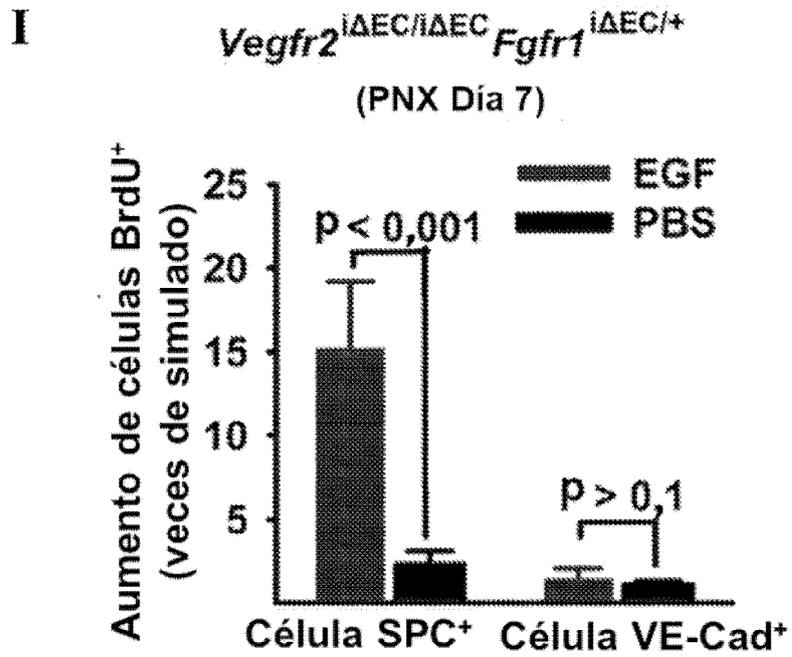


Figura 12

K

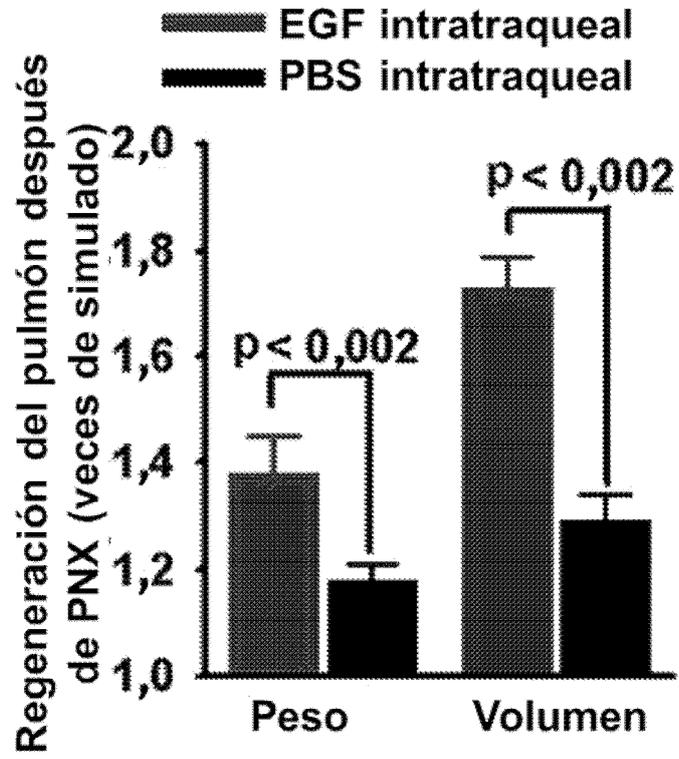


Figura 13

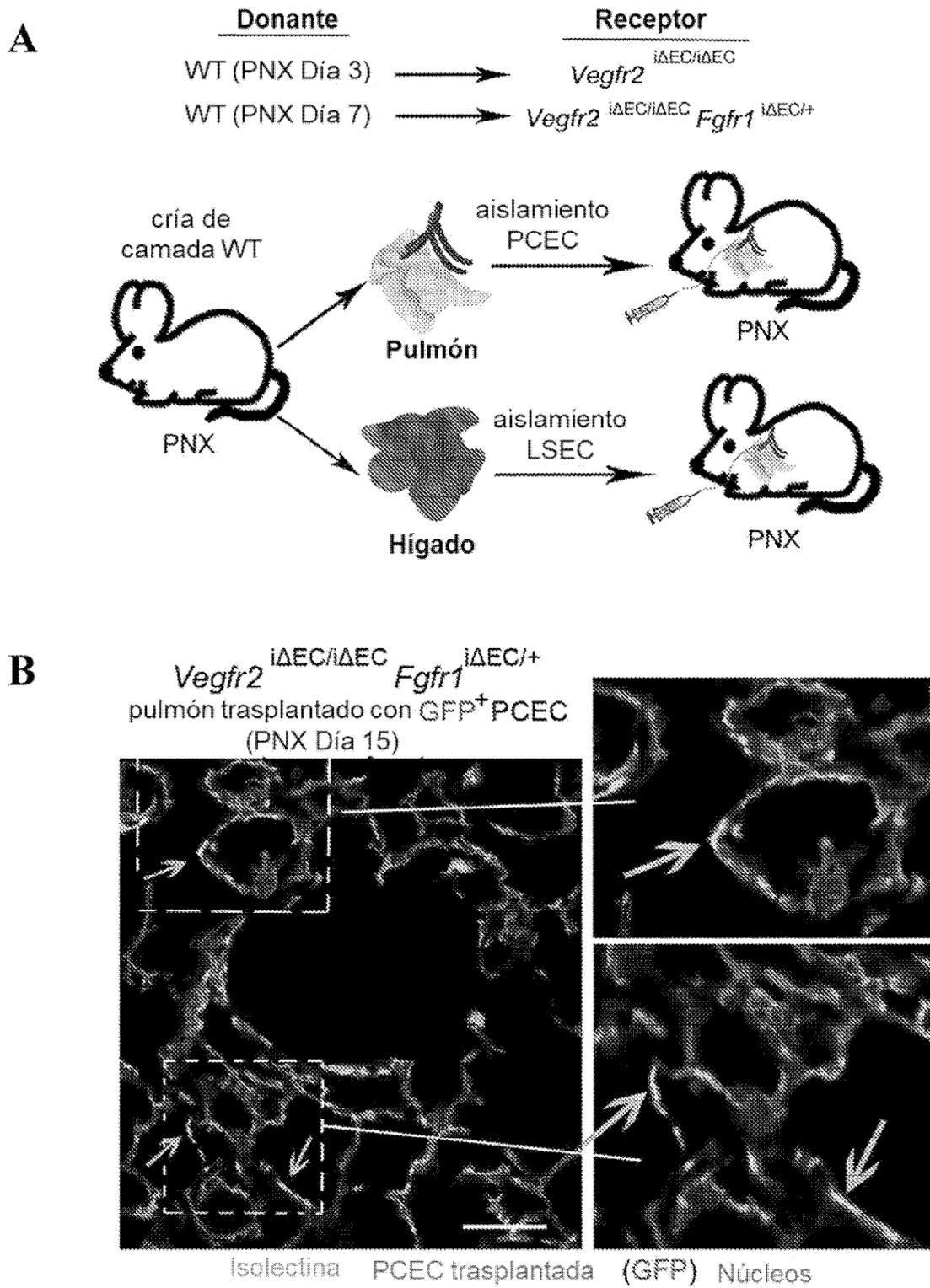
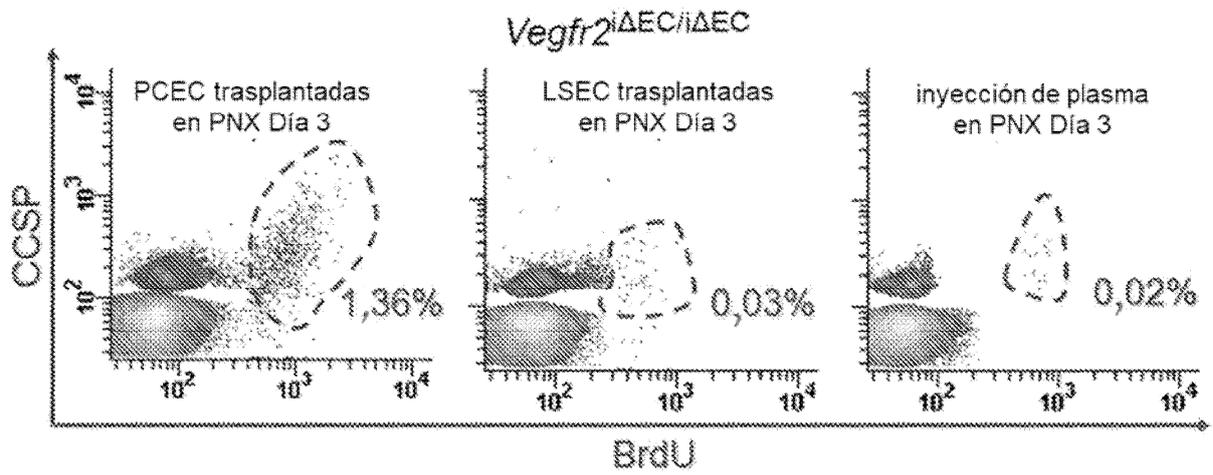


Figura 13

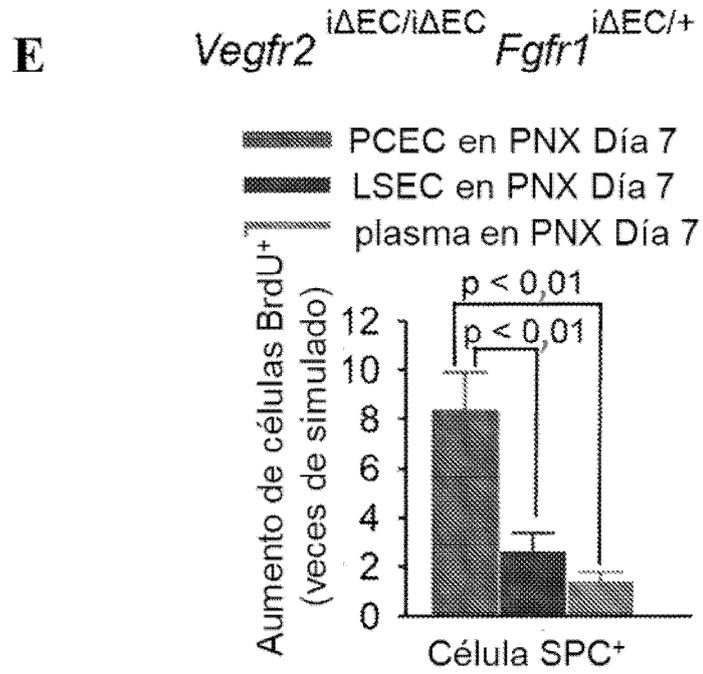
C



D

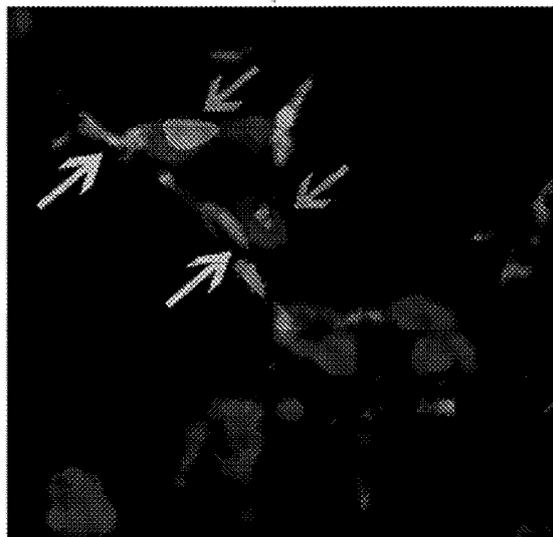


Figura 13



F *Vegfr2*^{iΔEC/ΔEC} *Fgfr1*^{iΔEC/+}

PCEC trasplantadas
en PNX Día 7



BrdU PCEC (GFP) SPC

Figura 13

G

