



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 327**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06756297 .5**

96 Fecha de presentación : **24.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1888742**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Células progenitoras hepáticas.**

30 Prioridad: **26.05.2005 PCT/IT2005/000303**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.03.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.03.2011**

73 Titular/es: **FRESENIUS MEDICAL CARE  
DEUTSCHLAND GmbH  
Else-Kröner-Strasse 1  
61352 Bad Homburg V.D.H., DE**

72 Inventor/es: **Herrera Sánchez, María Beatriz;  
Bussolati, Benedetta;  
Camussi, Giovanni y  
Buttiglieri, Stefano**

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 355 327 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

La presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de células progenitoras a partir de tejido hepático adulto, células progenitoras hepáticas aisladas por el procedimiento de la invención, así como procedimientos de inducción de diferenciación de células progenitoras hepáticas aisladas y procedimientos de immortalización condicional y selección metabólica de las células progenitoras hepáticas. Más específicamente, la invención se refiere a células progenitoras hepáticas que, aunque se derivan del hígado, son diferentes morfológicamente de las células madre ovas hepáticas y no expresan marcadores que son típicos de células madre ovas hepáticas. Adicionalmente, las células progenitoras hepáticas de la invención muestran capacidad autorenovable y potencial de diferenciación multilínea, características que permiten categorizar estas células como células progenitoras pluripotentes.

En la técnica anterior se describen las células madre hepáticas, por ejemplo en los documentos WO 03/078588, WO 00/43498, WO 00/03001, EP 1394263, US 2003/0138951. Las células madre hepáticas más conocidas se designan como células madre ovas hepáticas, debido a su forma ovalada característica. Las células madre ovas son un tipo bien definido de células madre hepáticas. Características típicas de las mismas son, aparte de su morfología ovalada característica, la expresión de uno o más marcadores de superficie que son típicos de células madre hematopoyéticas, tales como c-kit (CD117) , CD34 y Sca-1, lo que sugiere que las células madre ovas se originan a partir de células madre hematopoyéticas. Además, las células madre ovas son progenitoras bipotentes capaces de generar tanto hepatocitos como colangiocitos *in vivo* (Petersen B. E., Goff J. P., Greenberger J. S., Michalopoulos G. K. (1998) Las células ovas de rata expresan el marcador de células madre hematopoyéticas Thy-1 en la rata. *Hepatology* 27, 433-445; Petersen B. E., Grossbard B., Hatch H., Pi L., Deng J., Scott E.W. (2003) Las células ovas hepáticas positivas para A6 de ratón también expresan diversos marcadores de células madre hematopoyéticas. *Hepatology* 37, 632-640).

Suzuki A. y col. (2000) *Hepatology*, vol. 32, páginas 1230-1239 describe células progenitoras identificadas en el hígado de ratón fetal capaces de formar colonias que contienen distintos hepatocitos y colangiocitos.

El documento US 2005/0074876 describe una línea de células hepáticas bipotenciales derivadas de tejido de hígado de mamífero que es capaz de diferenciarse en hepatocitos y células de vías biliares.

Schwartz RE, y col. (2002) *J. Clin. Invest.*, vol. 109, páginas 1291-1302 describe células progenitoras adultas multipotentes derivadas de médula espinal capaces de originar linajes embrionarios celulares *in vivo* y capaces de formar células similares a hepatocitos *in vivo*, así como la mayoría de las células neuroectodérmicas y mesodérmicas.

Young L., y col. (2002), *PNAS*, vol. 99, páginas 8078-8083, describe células madre ovas hepáticas de rata adulta capaces de diferenciarse en hepatocitos y en epitelio de vías biliares y de transdiferenciarse en células productoras de hormonas endocrinas pancreáticas.

Mahli M., y col. (200), *J. Cell. Sci.*, vol. 115, páginas 2679-2688, describe células madre bipotentes ovas aisladas a partir de hígado humano fetal, que son capaces de originar por subpasaje células ovas, planas y fusiformes que tienen expresión génica de dos linajes, en particular hepatocítico y biliar.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado ahora un procedimiento de aislamiento de células progenitoras a partir de tejido hepático adulto que da como resultado el aislamiento de una población de células progenitoras novedosa que se caracteriza tanto por la expresión de algunos marcadores de células que son típicos de células hepáticas, tales como albúmina y  $\alpha$ -fetoproteína, como por la ausencia de características morfológicas y moleculares típicas de células madre ovas. Las células progenitoras hepáticas novedosas de la invención son, de hecho, más de forma epitelioide que de forma ovalada. Además, tales células no parecen expresar algunos de los marcadores de células hemopoyéticas que son típicos de las células madre ovas hepáticas.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de aislamiento de una línea de células progenitoras hepáticas humanas no ovas que es tal como se define en la reivindicación 1, procedimiento que comprende las etapas de:

(i) cultivar hepatocitos maduros humanos derivados de hígado adulto en un medio de cultivo celular hasta la muerte de los hepatocitos maduros y selección de una población de células supervivientes que tienen morfología epitelioide;

(ii) expandir la población de células supervivientes cultivando en un medio de cultivo que contenga glucosa, que contenga suero, suplementado con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano) y bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) y que comprenda sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas habituales necesarias para el crecimiento de células de mamíferos.

Los hepatocitos maduros empleados en el procedimiento de la invención se obtienen a partir de tejido hepático adulto según cualquier procedimiento en sí mismo conocido para el aislamiento de hepatocitos a partir de hígado de mamíferos, preferentemente hígado humano. El significado de la expresión “tejido hepático adulto” tal como se utiliza en el presente documento está bien establecido en la técnica anterior y significa tejido hepático obtenido a partir de un organismo postnatal. El significado de la expresión “hepatocitos maduros” también está bien establecido en la técnica anterior. Esta expresión abarca hepatocitos completamente diferenciados que no tienen la capacidad de proliferar *in vitro*. Los marcadores de diferenciación utilizados comúnmente para hepatocitos maduros son marcadores bioquímicos, tales como albúmina, tirosina aminotransferasa (TAT), citocromo P450, TO, serina deshidratasa (SDH), Cxs 32 y 26, así como marcadores morfológicos, tales como formación de canalículos biliares, uniones en hendidura, peroxisomas con nucleoides cristalinos, un número elevado de mitocondrias (véase por ejemplo Mitaka T (2002). Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. J Hepatobiliary Pancreat Surg.; 9 (6): 697–703).

Los hepatocitos maduros pueden congelarse opcionalmente en un medio de cultivo que contiene suero en presencia de un agente crioprotector antes de cultivar. Los hepatocitos se congelan preferentemente en un medio líquido que comprende suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor al 20% o suero humano (HS) inactivado por calor al 20% y que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector. De manera alternativa, cualquier otro compuesto conocido por poseer propiedades crioprotectoras puede utilizarse como agente crioprotector, tal como por ejemplo glicerol, etilenglicol, polietilenglicol o polivinilpirrolidona. Es preferible llevar a cabo la congelación a temperaturas muy bajas, por ejemplo situando la muestra de células a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente en nitrógeno líquido.

El procedimiento de aislamiento de la invención comprende una primera etapa en la que el cultivo primario de hepatocitos maduros se somete a selección negativa y una segunda etapa en la que la población de células supervivientes se expande.

En la primera etapa, los hepatocitos se cultivan en condiciones restrictivas hasta que se induce la muerte del cultivo primario de hepatocitos maduros. Para este propósito, los hepatocitos se pueden sembrar a una densidad de aproximadamente  $1,0\text{--}1,5 \times 10^5$  células viables por  $\text{cm}^2$  sobre placas de cultivo recubiertas con colágeno y se pueden cultivar en un medio de cultivo celular de hepatocitos durante aproximadamente al menos 2 semanas. Después de aproximadamente 2 semanas, la gran mayoría de los hepatocitos mueren pero sobrevive una población de células que forman agrupaciones. Tales células que forman agrupaciones se distinguen fácilmente a partir de hepatocitos maduros por su morfología epiteloide.

En la segunda etapa, se eliminan las agrupaciones de células supervivientes, se colocan en una placa en dilución limitante y se cultivan en un medio de cultivo rico que contenga glucosa, que contenga suero, suplementado con hEGF y bFGF, medio que es capaz de mantener el crecimiento de las agrupaciones de células. La concentración de hEGF en el medio rico está comprendida preferentemente entre 2 y 10 ng/ml; la concentración de bFGF está comprendida preferentemente entre 10 y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Más preferentemente, el medio de cultivo rico usado en la etapa de expansión es una mezcla de Medio Mínimo Esencial alfa ( $\alpha\text{MEM}$ ) y Medio Basal Endotelial (EBM) (3:1 vol/vol), suplementado con FCS y/o HS, glutamina y antibióticos. El medio basal endotelial (EBM) comprende concentraciones adecuadas de los factores de crecimiento hEGF y bFGF. Se puede añadir un agente de tamponación al medio rico para mantener el pH a valores aproximadamente neutros (preferentemente, pH 7,4). Se observa la aparición de colonias individuales unidas después de aproximadamente 3 semanas en cultivo. Se subcultivan clones únicos, se expanden y se analizan cuando se aproximan a la confluencia.

Las células progenitoras hepáticas humanas obtenidas por el procedimiento descrito anteriormente son incapaces de crecer en  $\alpha\text{MEM}$  suplementado con FCS al 10% y HS al 10% HS, que es el medio de cultivo utilizado comúnmente para las células madre mesenquimatosas.

Se obtuvieron veinticuatro clones de células diferentes por el procedimiento descrito anteriormente. Se mantuvieron los clones en cultivo en medio indiferenciado durante 2–3 meses. Se generaron alrededor de 200 millones de células a partir de un único clon, lo que indica un periodo de tiempo de vida de 200–250 duplicaciones obtenidas. Estos datos indican que las células progenitoras derivadas de hígado de la invención son capaces de autoregenerarse.

Según una realización preferida del procedimiento de la invención, las células que tienen morfología epiteloide obtenidas en la etapa (ii) pueden someterse óptimamente a inmortalización condicional y selección metabólica.

La inmortalización condicional proporciona líneas celulares inmortalizadas con funciones metabólicas estables. La inmortalización condicional puede lograrse por ejemplo por subclonado del antígeno T grande a partir de SV40 o de cualquier otro gen que tenga la actividad de inducir o mantener la entrada en el ciclo celular, tal como p.e. Bmi-1, h-TERT o c-Myc, dentro de un vector no vírico tal como pcDNA4/TO (Invitrogen) que incluye los elementos reguladores a partir del operón de resistencia a tetraciclina codificado por Tn 10 de *E. coli* (Hillen y Berens,

1994; Hillen y col., 1983). La adición de un segundo vector regulador tal como pcDNA6/TR (Invitrogen) que expresa niveles altos del gen TetR, induce la expresión del gen inmortalizador y el crecimiento celular controlado.

Las células inmortalizadas se someten después a selección metabólica reemplazando glucosa en el medio de cultivo celular por galactosa que sólo se metaboliza por células hepáticas.

5 Otro aspecto de la presente invención son las células derivadas de hígado según la reivindicación 1 obtenidas tal como se describe anteriormente. Se ha demostrado que tales células se diferencian bajo condiciones de cultivo adecuadas en hepatocitos maduros o células productoras de insulina, marcando estas células como células progenitoras hepáticas. Adicionalmente, se ha demostrado que las líneas celulares de la invención experimentan diferenciación osteogénica y endotelial cuando se cultivan en medios de diferenciación apropiados. 10 Además, las líneas celulares de la invención se caracterizan por un perfil de expresión de marcador de células único que, para el conocimiento de los solicitantes, nunca se ha descrito por el momento y que es diferente del perfil de expresión de las células madre ovas hepáticas, lo que sugiere que se ha identificado un tipo celular novedoso.

15 La caracterización por FACS (separador celular activado por fluorescencia), inmunofluorescencia y RT-PCR del perfil de expresión de un número de marcadores de células de las líneas celulares progenitoras humanas derivadas de hígado de la invención muestra la presencia de diversos marcadores de células madre y marcadores específicos de tejido hepático. Se sometieron a prueba los siguientes antígenos celulares: CD34, C-kit, SCA-1, CD29, CD73, CD45, CD133, CD146, CD105, CD44, CD90, CD117, CD14, HLA-A, B, C,  $\alpha$ -fetoproteína, Citoqueratina 19, Albúmina y Citoqueratina 18. Los resultados se resumen en la tabla I a continuación.

Tabla I

Marcador	Análisis FACS de clones HuHEP (% de células positivas: promedio $\pm$ DE)
CD34	-
CD45	-
CD14	-
CD73	+
CD29	+
CD44	+
CD117 (C-Kit)	-
CD90 (Thy-1)	+
CD146	-
CD133	-
CD105 (endoglina)	+
Marcador	Análisis de inmunofluorescencia de clones HuHEP (% de células positivas: promedio $\pm$ DE)
$\alpha$ -fetoproteína (AFP)	+
CK18	+
CK19	-
Albúmina (ALB)	+
HLA-A, B, C	+

20 Los resultados indican que las células progenitoras humanas derivadas de hígado de la invención expresan marcadores tanto de células madre como de células hepáticas, confirmando de ese modo que tales células son precursoras hepáticas. En particular, la figura 1 muestra que las células progenitoras humanas hepáticas no ovas

obtenidas (referidas en la Tabla 1 y en lo siguiente como "HuHEP") expresan albúmina (A),  $\alpha$ -fetoproteína (C) y Citoqueratina 18 (E) tal como se detecta por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos. B, D, F son los respectivos controles negativos isotípicos. (x 400).

5 La expresión de albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína y citoqueratina 18 es típica de células hepáticas y caracteriza las líneas celulares de la invención como células progenitoras hepáticas, en ausencia de marcadores de células hepáticas maduras típicos tales como el citocromo P450 y la capacidad de sintetizar urea.

10 La morfología y los marcadores de superficie detectados y enumerados en la Tabla I anterior, caracterizan una población que es diferente de las células madre ovales hepáticas. En particular, las líneas celulares de la invención no expresan CD-117 (C-kit) ni CK19 (Citoqueratina 19), que son marcadores típicos de células madre ovales. Otro marcador típico de células madre ovales, es decir CD34, también está ausente de las líneas celulares de la invención.

15 Además, las líneas celulares de la invención no expresan marcadores celulares de superficie que son típicos de células madre hematopoyéticas (tales como CD117, CD34, CD45 y CD133) al contrario que otras células madre hepáticas tales como las células madre hepáticas primitivas humanas descritas en el documento WO 03/078588 y las células madre ovales. Por otro lado, las líneas celulares de la invención expresan diversos marcadores celulares de superficie que son típicos de otras células madre, por ejemplo CD29, CD73, CD146, CD105 (endogлина), CD44, CD90 (Thy-1) y HLA-A, B, C.

20 Una característica extremadamente ventajosa de las líneas celulares progenitoras de la invención es que son capaces de diferenciarse en una pluralidad de linajes celulares diferentes. En particular, las líneas celulares progenitoras de la invención son capaces de diferenciarse en células hepáticas maduras, células productoras de insulina, células osteogénicas y células endoteliales cuando se cultivan bajo condiciones de diferenciación adecuadas.

25 Para la diferenciación en células hepáticas maduras, las células de la invención se cultivan en un medio de cultivo que contiene suero, preferentemente MEM-EBM (3:1) + HS y/o FCS al 10%, suplementado con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF-4).

30 Para la diferenciación en células productoras de insulina, las células de la invención se cultivan en medio de cultivo que contenga suero, preferentemente DMEM suplementado con FCS y/o HS al 2%, en presencia de al menos 2 g/l de glucosa, preferentemente de 4,5 g/l de glucosa. Más preferentemente, se añade nicotinamida al medio de cultivo que contiene suero después de aproximadamente 1 mes del cultivo en presencia de glucosa. Una concentración adecuada de nicotinamida en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 mM.

35 Para la diferenciación osteogénica, las células de la invención se cultivan en un medio de cultivo que contenga suero, preferentemente  $\alpha$ MEM, suplementado con ascorbato-2-fosfato y dexametasona con fosfato inorgánico.

40 Para la diferenciación endotelial, las células de la invención se cultivan en un medio basal celular endotelial, preferentemente EBM-2, suplementado con VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular).

45 Las células progenitoras hepáticas no ovales de la invención se inocularon subcutáneamente en ratones SCID para evaluar la aparición de tumores. No se observó ningún tumor después de 6 meses. Dado que, tal como se mencionó anteriormente, las líneas celulares progenitoras hepáticas no ovales pueden expandirse, mantenerse en cultivo durante diversos pasos, criopreservarse y diferenciarse, y también a la luz de sus propiedades de diferenciación, tales células son útiles en un número de aplicaciones, entre otras, la utilización como un sustrato para cultivos de virus de hepatitis, la utilización como un modelo *in vitro* para pruebas con fármacos, la aplicación en tratamiento regenerativo y la aplicación en el desarrollo de un hígado bioartificial.

50 Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención tal como se determina por las reivindicaciones adjuntas.

## 45 EJEMPLOS

### Criopreservación

50 Se criopreservaron hepatocitos maduros humanos normales obtenidos a partir de tejido hepático humano adulto en suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor suplementado con el 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) esterilizado con filtro y se almacenaron los viales en nitrógeno líquido. Se descongelaron los hepatocitos controlando la viabilidad celular después de la congelación, determinando el número de células viables por ensayo de exclusión de tinción utilizando el tinte azul tripán. Los experimentos mostraron que la viabilidad era > 90% y que las células descongeladas mantuvieron su fenotipo y sus capacidades de diferenciación.

Aislamiento y cultivo de células progenitoras hepáticas humanas no ovas (HuHEP)

5 Se obtuvieron hepatocitos a partir de 8 preparaciones diferentes de hígado humano normal, que incluyen 2 preparaciones a partir de hígado fresco y 6 preparaciones de hepatocitos criopreservados (obtenidos a partir de Cambrex (Bio Science, Verviers, Bélgica, <http://www.cambrex.com>).

Preparación a partir de tejido hepático fresco

10 Se aislaron hepatocitos a partir de especímenes quirúrgicos recién preparados de pacientes que se someten a hepatectomía. Se utilizó tejido hepático sano (5–20 g) aislando hepatocitos por digestión con colagenasa. Brevemente, se aislaron los tejidos hepáticos y se perfundieron con 350 ml de tampón exento de Ca en caliente (37°C) (Medio de Perfusión Hepática, Gibco, Grand Island, NY; <http://www.invitrogen.com/>). Entonces se sometieron a digestión los tejidos hepáticos en Medio de Digestión Hepática (Gibco) a 37°C. Esto dio como resultado blanqueo, reblandecimiento y disociación del tejido hepático y proporcionó digestión completa del hígado en 10–12 min. Se liberaron los hepatocitos picando y pipeteando con una pipeta de diámetro grande. Se filtró la suspensión celular a través de un tamiz de nailon de 100 µm estéril en un vaso de precipitados colocado en hielo, se sedimentó por centrifugación a 50 g durante 5 min., se resuspendió y se lavó 2–3 veces en medio de lavado frío (Medio de Lavado de Hepatocitos, Gibco).

Selección negativa

20 Inicialmente se cultivaron los hepatocitos obtenidos tal como se describe anteriormente en medio Medio E de Williams (Gibco) suplementado adicionalmente con glutamina y con suero fetal bovino al 5% (FCS, Euroclone, Wetherby, Reino Unido, <http://www.euroclone.net>). Se vertieron aparte las células no unidas 2 a 3 horas más tarde y después se reemplazaron con medio libre de suero de hepatocitos (Hepatozyme–SFM, Gibco), un medio de Chees altamente modificado suplementado con 1,25 µg/cm<sup>2</sup> de colágeno proporcionando una matriz intercalada. Se volvieron a alimentar los cultivos con Hepatozyme SFM (sin colágeno) a las 24 h y cada 48 h a partir de entonces. Se sembraron los hepatocitos a una densidad de 1,0–1,5 x 10<sup>5</sup> de células viables [células viables al 80% determinadas por azul tripán (Gibco)] por cm<sup>2</sup> sobre placas de cultivo recubiertas de colágeno en Hepatozyme–SFM mantenido a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 semanas. Después de aproximadamente 2 semanas en cultivo, se observó muerte extensa de hepatocitos.

Expansión

30 Se sustituyó el medio de cultivo con Medio Mínimo Esencial–alfa/Medio–1 Basal de Células Endoteliales (α–MEM/EBM) (3:1) (Gibco/Cambrex) suplementado con L–glutamina (5 mM), Hepes (12 mM, pH 7,4), penicilina (50 UI/ml), estreptomina (50 µg/ml) (todos de Sigma–Aldrich, San Luis, MO; <http://www.sigmaaldrich.com/>), FCS (al 10%) y suero de caballo (al 10%, HS, Gibco). Se identificaron células individuales unidas en la placa de cultivo después de otras 3 semanas. Cuando las colonias fueron evidentes, se colocaron anillos de clonación alrededor de ellas y se subcultivaron en un pocillo individual de una placa de cultivo de 24 pocillos. Se transfirieron las células expandidas a un matraz de 75–cm<sup>2</sup> y se analizaron cuando se aproximaron a confluencia.

Hepatocitos criopreservados

Se cultivaron hepatocitos normales criopreservados humanos bajo las mismas condiciones de cultivo (selección negativa y expansión) tal como se describen anteriormente, proporcionando resultados similares.

Inmortalización condicional

40 Se separaron células cultivadas durante aproximadamente 10 pasos y se sometieron a electroporación a 180 V durante 20 ms con 5 µg de vector pcDNA4/TO (Invitrogen) portando el subclonado del antígeno T grande de SV40. Se seleccionaron las células con zeocina (5 µg/ml) durante 3 semanas.

45 Las células se sometieron después a una segunda electroporación a 180 V durante 20 ms con 5 µg de vector pcDNA6/TR (Invitrogen) y se seleccionaron durante 3 semanas con blasticidina (5 µg/ml) en presencia de doxiciclina (1 µg/ml). Se alimentaron las células cada 3 días en medio DMEM (DMEM: MEM de Dulbecco) suplementado con FCS al 10% en presencia de doxiciclina (1 µg/ml).

Selección metabólica

5 Se cultivaron las células inmortalizadas obtenidas tal como se describe anteriormente inducidas al crecimiento con doxiciclina (1 µg/ml) en medio RPMI libre de glucosa que comprende 1 µg/ml de galactosa y FCS al 3% durante 30 días, con el fin de seleccionar las células que son capaces de utilizar específicamente galactosa en lugar de glucosa, lo que es una característica típica de las células hepáticas. Las células se sometieron a prueba y se criopreservaron.

Diferenciación de HuHEP en hepatocitos y células productoras de insulina

10 Para verificar si las células HuHep son capaces de diferenciarse en hepatocitos maduros, se evaluó la expresión de citocromo P450, es decir, la enzima de oxidación metabólica, bajo condiciones de cultivo diferentes. Se cultivaron las células durante 15 días en las siguientes condiciones de cultivo:

15 Se cultivaron HuHEP en un biorreactor con medio MEM/EBM suplementado con FCS/HS al 10% + HGF/FGF-4. Después de 15 días de cultivo se evaluaron HuHEP positivos en citocromo P450. Un 20–25% de la población total de HuHEP cultivada en MEM/EBM + FCS al 10% + HGF/FGF-4 era positivo en citocromo P450. La concentración de urea estaba en el intervalo de 3–4 mg/dl, la glucosa era la mitad de la glucosa total presente inicialmente en el medio recién preparado y no había ninguna modificación de la proteína total, indicando que los hepatocitos diferenciados eran metabólicamente activos.

20 Además, se diferenciaron HuHEP en células productoras de insulina con incubación en medio DMEM (DMEM: MEM de Dulbecco) suplementado con FCS al 2%/HS y un alto contenido en glucosa (al menos 2 g/l de glucosa, preferentemente 4,5 g/l de glucosa) durante 1 mes, y opcionalmente durante 5–7 días en presencia de nicotinamida 10 mM. Las células comenzaron a formar agrupaciones celulares esferoides pequeñas en la parte superior de la monocapa de células confluentes que se parecían morfológicamente isletas pancreáticas. Se tiñeron positivamente estas agrupaciones celulares tridimensionales con el anticuerpo policlonal contra insulina humana y con el anticuerpo monoclonal contra Transportador de Glucosa de Tipo 2 humano (Glut2) que es un transportador de glucosa (Fig. 2). Además, se tiñeron las agrupaciones celulares tridimensionales con el agente quelante de Zn ditizona, que es específico para los gránulos que contienen insulina. Estos resultados se muestran en la Fig. 2, que muestra la aparición morfológica de HuHEP no estimulado (panel A), HuHEP estimulado con medio de diferenciación que induce la formación de estructuras similares a isletas pancreáticas (panel B). Fig. 2, paneles C y D: tinción por inmunofluorescencia para insulina humana; paneles E y F: tinción por inmunofluorescencia para Glut2 humana; paneles G y H: tinción con controles isotípicos negativos; panel I: tinción con el agente quelante de Zn ditizona. (A, B, D, F, G, H, I x 250; C y E x 150).

Diferenciación osteogénica *in vitro*

35 Para inducir la diferenciación osteogénica, se cultivaron las células en  $\alpha$ MEM suplementado con FCS al 10%, HS al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 12 mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 20 mM, 50 ng/ml de tiroxina, dexametasona 1 nM y ascorbato-2-fosfato 0,5 µM (todos de Sigma-Aldrich). Se reemplazó el medio con medio recién preparado dos veces por semana durante 3 semanas. Para evaluar la diferenciación, se fijaron las células con paraformaldeído al 4% durante 20 minutos a TA y se tiñeron con rojo de alizarina, pH 4,1 (Sigma) durante 20 minutos a TA.

40 Las células cultivadas durante 3 semanas en medio de diferenciación osteogénica mostraron depósitos de calcio y expresión de osteocalcina y osteopontina, indicando diferenciación osteogénica. Además, las células llegaron a ser negativas para albúmina, AFP y CK18.

Después de 6 semanas en el mismo medio pero sin fosfato inorgánico, no se detectó acumulación de lípidos.

Diferenciación endotelial *in vitro*

45 Se obtuvo diferenciación celular endotelial cultivando las células en medio EBM-2 (Cambrex) durante 10 días con Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, 10 ng/ml, Sigma). Cuando se cultivó en EBM suplementado con VEGF, las células expresaron los marcadores endoteliales CD31, CD34, KDR (VEGFR-2), CD144 (VE-cadherina) y el factor von Willebrand que eran negativos en condiciones indiferenciadas, indicando una diferenciación endotelial. Durante la diferenciación endotelial se perdieron albúmina, AFP y CK18.

Efectos de inyección de HuHEP en daño hepático inducido por paracetamol en SCID

50 La hepatotoxicidad por paracetamol es un modelo bien reconocido de necrosis hepática. Los niveles aumentados de *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI), el metabolito tóxico de paracetamol, son los responsables de la necrosis hepática.

Modelo animal y trasplante de HuHEP

5 Los ratones SCID eran de Charles River (Laboratorios Jackson, Bar Harbor, ME). Se albergaron en un entorno libre de patógenos específico. Se utilizaron ratones SCID machos de 8 semanas de edad para los experimentos. Se realizaron los experimentos según las directrices del Instituto Nacional de Salud. Después de un ayuno de 16 horas, los ratones se sometieron a inyección intraperitoneal con 250 mg/kg de paracetamol (Sigma, San Luis, MO) disuelto en solución salina estéril o de solución salina estéril sola como vehículo de control. Después de la inyección con paracetamol, se alimentaron los ratones a voluntad con pienso estándar.

10 Se observó el pico de daño hepático 1 día después de la inyección con paracetamol. En ese momento, se recogieron HuHEP (paso III–IV) utilizando tripsina–EDTA, se lavaron con PBS, se marcaron con el kit de engarce celular fluorescente rojo PKH26 (Sigma) se contaron en una cámara microcitométrica y se volvieron a suspender en PBS ( $1 \times 10^6$  en 250  $\mu$ l de PBS).

Medidas de aminotransferasa en plasma

Se midieron niveles de plasma o suero de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) a 37°C con un kit disponible comercialmente (Sigma Diagnostic).

15 Histología

Se fijó con formalina tejido hepático y se incluyó con parafina antes de seccionar. Se tiñeron secciones de hígado con hematoxilina–eosina.

20 Para la preservación criostática, se mantuvieron tejidos hepáticos en solución de formaldehído al 4% durante toda una noche. Al día siguiente se eliminó el formaldehído y se substituyó por EtOH al 70%. Entonces se fijaron los tejidos en OCT.

Se realizó un análisis cuantitativo de la extensión de la necrosis tisular después de formación de imagen digitalmente de tres campos de gran aumento por portaobjetos en un modo aleatorio y ciego. Se identificaron áreas de necrosis tisular o de necrosis inminente según la presencia de eosinofilia disminuida, la pérdida de arquitectura celular, la vacuolización, la ruptura celular o la cariólisis.

25 Inmunofluorescencia

Se incubaron secciones del hígado criostáticas con anticuerpo monoclonal HLA–A,B,C antihumano de ratón conjugado con FITC (BioLegend, San Diego, CA) (1:200), o con la IgG<sub>1</sub> monoclonal de ratón control, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se examinaron tres secciones no secuenciales para cada espécimen.

Resultados de los experimentos *in vivo*

30 El paracetamol indujo daño necrótico extenso en el hígado. La inyección de HuHEP marcadas 24 horas después de la inducción del daño hepático dio como resultado la recuperación local de HuHEP en el sitio del daño hepático. Se encontró que las células contribuían a la regeneración hepática ya que son detectables en el hígado de ratones SCID 5 días después del daño hepático.

35 Los resultados experimentales *in vitro* e *in vivo* anteriores indican que las líneas celulares progenitoras hepáticas humanas no ovales de la presente invención son adecuadas para utilización para preparar un medicamento que tenga actividad de diferenciación osteogénica así como un medicamento que tenga actividad de regeneración de daño hepático.



**REIVINDICACIONES**

1. Una línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovales aislada a partir de tejido adulto que expresa marcadores de células hepáticas y que es capaz de diferenciarse en células hepáticas maduras, células productoras de insulina, células osteogénicas y células epiteliales.
- 5 2. La línea celular según la reivindicación 1, que expresa los marcadores de células hepáticas albúmina y  $\alpha$ -fetoproteína.
3. La línea celular según las reivindicaciones 1 ó 2, que expresa el marcador de células hepáticas CK18.
4. La línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que expresa los marcadores de células madre CD44, CD29, CD73, CD146, CD105 y CD90.
- 10 5. La línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que no expresa marcadores de células hematopoyéticas.
6. La línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que no expresa el marcador de células madre hematopoyéticas CD133.
7. La línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que no expresa los marcadores de células ovales CD117 (C-kit), CK 19 y CD34.
- 15 8. La línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que no expresa el marcador de células de hepatocitos maduros citocromo P450 y que no sintetiza urea.
9. La línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que está inmortalizada.
10. Un procedimiento de aislar una línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de:
- 20 (i) cultivar hepatocitos maduros humanos derivados de hígado adulto en un medio de cultivo celular hasta la muerte de los hepatocitos maduros y selección de una población de células supervivientes que tienen morfología epitelioide;
- 25 (ii) expandir la población de células supervivientes que tienen morfología epitelioide cultivando en un medio de cultivo que contenga suero, que contenga glucosa, suplementado con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano) y bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) y que comprenda sales inorgánicas habituales, aminoácidos y vitaminas necesarios para el crecimiento de células de mamíferos.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que los hepatocitos maduros se congelan en un medio de cultivo que contiene suero en presencia de un agente crioprotector y después se descongelan antes de cultivar según la etapa (i).
- 30 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el agente crioprotector es dimetilsulfóxido.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el medio de cultivo celular de la etapa (i) es un medio de cultivo celular de hepatocitos.
- 35 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el medio de cultivo que contiene suero de la etapa (ii) es una mezcla de  $\alpha$ MEM-EBM (3:1 vol/vol) suplementado con suero fetal bovino (FCS) o suero humano (HS), antibióticos y glutamina.
15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que los hepatocitos maduros se cultivan según la etapa (i) durante al menos dos semanas.
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que la línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovales aislada se somete además a inmortalización condicional.
- 40 17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en el que la línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovales aislada se somete adicionalmente a selección metabólica reemplazando glucosa por galactosa en el medio de cultivo.
- 45 18. Un procedimiento de diferenciación de la línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en células hepáticas maduras capaces de expresar el marcador de células de hepatocitos maduros citocromo P450 y capaces de sintetizar urea, que comprende cultivar dicha línea celular en un medio de cultivo que contiene suero suplementado con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF-4).

19. El procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho medio de cultivo que contiene suero es MEM-EBM suplementado con HS, HGF o FCS al 10% y FGF-4.
- 5 20. Un procedimiento de diferenciar la línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovals según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en células productoras de insulina, que comprende cultivar dicha línea celular en un medio de cultivo que contiene suero en presencia de al menos 2g/l de glucosa.
21. El procedimiento según la reivindicación 20, en el que el medio de cultivo que contiene suero comprende además nicotinamida.
22. El procedimiento según la reivindicación 20 ó 21, en el que el medio de cultivo que contiene suero es DMEM suplementado con HS o FCS al 2%, 4,5 g/l de glucosa y nicotinamida 10 mM.
- 10 23. Un procedimiento de diferenciar la línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovals según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en células osteogénicas, que comprende cultivar dicha línea celular en un medio de cultivo que contiene suero suplementado con ascorbato-2-fosfato y dexametasona con fosfato inorgánico.
- 15 24. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que el medio de cultivo que contiene suero es  $\alpha$ MEM suplementado con FCS al 10%, HS al 10%, dexametasona 1 nM y ascorbato-2-fosfato 0,5  $\mu$ M.
25. Un procedimiento de diferenciar la línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovals según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en células endoteliales, que comprende cultivar dicha línea celular en un medio basal celular endotelial suplementado con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
- 20 26. El procedimiento según la reivindicación 25, en el que el medio basal celular endotelial es EBM-2 suplementado con 10 ng/ml de VEGF.
27. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, en el que dicha línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovals se cultiva en un biorreactor.
28. Una línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovals según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar como un medicamento.
- 25 29. La utilización de una línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovals según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para preparar un medicamento para el tratamiento terapéutico de daño hepático.1/2

FIGURA 1

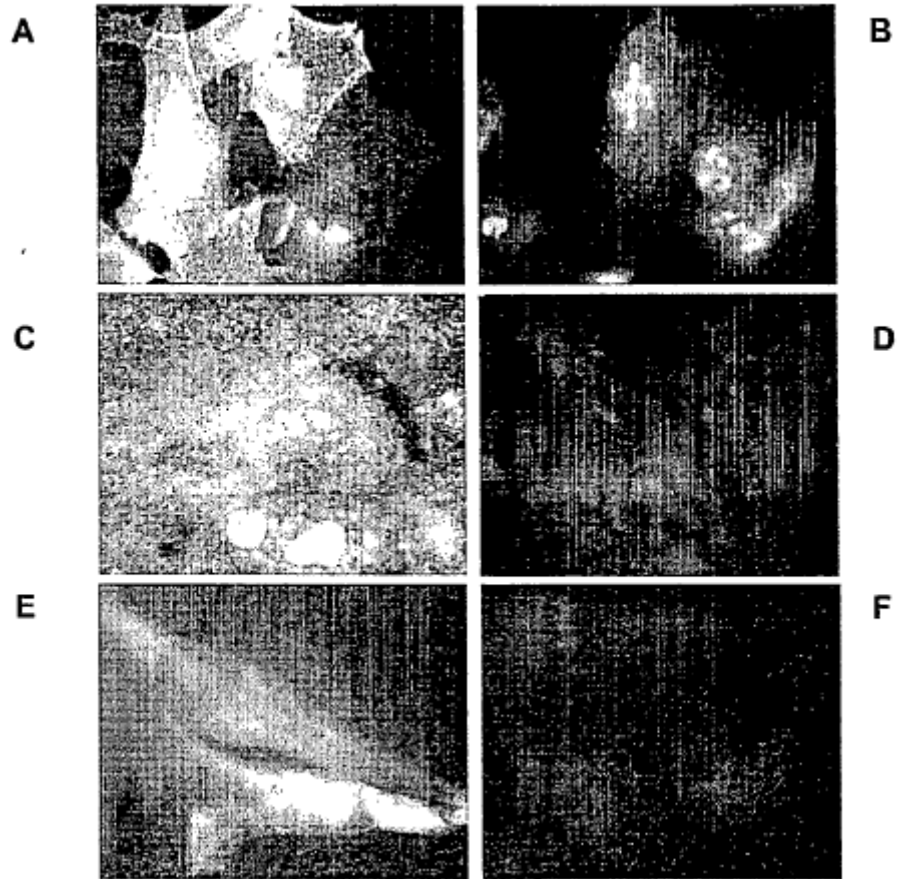


FIGURA 2

