



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 772**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02742240 .1**

(86) Fecha de presentación : **21.06.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1406998**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

(54) Título: **Células de injerto de hígado, análisis, y sus usos.**

(30) Prioridad: **22.06.2001 US 300535 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

(73) Titular/es: **StemCells, Inc.**
3155 Porter Drive
Palo Alto, California 94304, US

(72) Inventor/es: **Lagasse, Eric y**
Austin, Timothy

(74) Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células de injerto de hígado, análisis, y sus usos.

5 **Introducción**

El cuerpo depende del hígado para realizar una serie de funciones vitales, incluyendo la regulación, síntesis y secreción de muchas sustancias importantes para mantener el estado normal del cuerpo, el almacenamiento de nutrientes importantes tales como el glucógeno (glucosa), vitaminas y minerales y la purificación, transformación y eliminación de productos de desecho, fármacos y toxinas. No obstante, sus características y actividades distintivas lo hacen susceptible a ser dañado por una variedad de fuentes, y un daño de este tipo puede tener un impacto enorme sobre la salud de una persona.

Las células más abundantes y metabólicamente activas en el hígado son los hepatocitos. Los lóbulos hepáticos son de forma hexagonal, con seis tríadas portales en la periferia, conteniendo cada una de ellas una rama de la vena porta, una rama de arteria hepática y un conducto biliar, todos ellos mantenidos juntos por una capa de hepatocitos. Los hepatocitos rara vez se dividen, pero tienen una capacidad única de reproducirse en respuesta a un estímulo apropiado, tal como la extracción de una porción de hígado. Este procedimiento implica la hiperplasia controlada, que normalmente restaura el hígado en un 5 a 10% de su peso original.

El hígado tiene una capacidad única de regenerarse después de una lesión. El proceso comienza con la proliferación de hepatocitos “maduros”, otros linajes celulares tales como las células epiteliales biliares (CEB (BEC)) y células sinusoidales proliferan algo más tarde. La regeneración del hígado desempeña un papel importante después de una hepatectomía parcial y después de lesiones que destruyen partes del hígado, tales como un daño viral, tóxico o isquémico. No obstante, un daño excesivo puede alcanzar un “punto de no retorno” y el tejido normal es reemplazado por tejido de cicatrización. La capacidad del hígado para regenerarse también se ve comprometida por un daño o enfermedad hepática preexistente o repetido.

Se ha descubierto que se comparte una serie de determinantes superficiales entre células madre derivadas de médula ósea y células que pueden dar origen a hepatocitos, incluyendo c-kit, CD34 y Thy-1 en roedores, y c-kit y CD34 en humanos (véase Omori y col., (1997) *Hepatology* 26: 720-727; Lemmer y col., (1998) *J. Hepatol.* 29: 450-454; Peterson y col., (1998) *Hepatology* 30: 112-117; Lagasse y col., (2000) *Nature Med* 11: 1229-1234). Estos descubrimientos pueden tener implicaciones clínicas importantes para terapia génica y trasplante de hepatocitos, dos enfoques innovadores al tratamiento del fallo hepático fulminante y trastornos metabólicos genéticos del hígado.

Algunas pruebas han indicado que algunas líneas celulares hepáticas inmaduras se pueden diferenciar tanto en CEB como en hepatocitos. Por ejemplo, Fiorino y col., (1998) *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34(3):247-58 notifican el aislamiento de una línea celular progenitora condicionalmente transformada. Coleman y Presnell (1996) *Hepatology* 24(6):1542-6 discuten transiciones fenotípicas en cultivos de hepatocitos en proliferación que sugieren capacidad de diferenciación bipotencial de hepatocitos maduros. Se cree que se localizan precursores de células ovales en los canales de Herring o cerca de los conductos biliares. Para la proliferación de células ovales se requieren células de los conductos biliares, lo que indica que esta es la fuente de los precursores o que actúa en un papel de apoyo o inductor. Kubota y col., solicitud de patente internacional WO02/28997 describen una población de células progenitoras que expresa ICAM-1.

Las proteínas filamentosas intermediarias, particularmente la citoqueratina 19 (CK 19) específica de conducto biliar y el antígeno específico de hepatocito HepPar1 pueden ayudar a definir los estadios de desarrollo de las células progenitoras hepáticas durante la morfogénesis del hígado. Los hepatocitos ductales proliferan y comparten características fenotípicas con los hepatocitos y CEB. Según avanza la diferenciación de los hepatocitos, la expresión de antígeno HepPar1 aumenta y se pierden la expresión de CK14 y CK19. Por el contrario, según se transforman las células progenitoras en células de la placa ductal, la expresión de CK19 aumenta en conductos biliares diferenciados, mientras que se pierden CK14 y antígeno HepPar1. Las células progenitoras hepáticas por lo tanto se pueden diferenciar en etapas marcadas por la adquisición o pérdida de características fenotípicas específicas. El compromiso de las células progenitoras bien a hepatocitos o bien a linajes de células epiteliales de los conductos biliares da como resultado un aumento en la expresión de un marcador y la pérdida del otro marcador. Informes anteriores que sugirieron la presencia *in vivo* de tales células progenitoras bipotenciales se pueden encontrar en Douarin (1975) *Med. Biol.* 53:427-455; Shiojiri y col., (1991) *Cancer Res* 51: 2611-2620; Harina y col. (1996) *Hepatology* 23(3):476-81; Tateno y Yoshizato (1996) *Am J Pathol* 149 (5):1593-605; y Haque y col. (1996) *Lab Invest* 75(5):699-705. La expresión de albúmina y fetoproteína alfa son también marcadores útiles para hepatocitos.

En Susick y col., (2001) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 944:398-419; patente de EE.UU. No. 5.576.207 y solicitud de patente de EE.UU. No. 20020016000 se puede encontrar una discusión de células progenitoras hepáticas.

Para lograr una caracterización adicional de células progenitoras hepáticas, y de las células derivadas de las mismas, resulta crítico tener sistemas de modelización bien definidos, que puedan descifrar la compleja interrelación entre factores “ambientales” y factores celulares intrínsecos que regulan la renovación celular, así como la definición fenotípica de las células específicas capaces de dar lugar a células hepáticas maduras. La identificación y la caracterización de factores que regulan la especificación y diferenciación de linajes celulares en el hígado en desarrollo y adulto y

en el árbol biliar son de gran interés. La caracterización adicional de células hepáticas de injerto es de gran interés científico y clínico.

Resumen de la invención

Se proporcionan procedimientos para la clasificación y caracterización de células hepáticas de injerto (LEC, *liver engrafting cells*), que son células progenitoras que tienen la capacidad de injertarse en el hígado y dar lugar a células hepáticas diferenciadas. Las células se pueden clasificar basándose en dispersión frontal y autofluorescencia y/o mediante la expresión de marcadores de la superficie celular específicos. Las células son útiles en trasplantes, para evaluación experimental y como una fuente de productos específicos de linaje y de célula, incluyendo especies de ARNm útiles para identificar genes expresados de forma específica en estas células y como dianas para el descubrimiento de factores o moléculas que puedan afectarles.

Se proporcionan sistemas *in vitro* e *in vivo* para el cultivo y análisis, incluyendo análisis clónico de células hepáticas de injerto. Se pueden llevar a cabo ensayos clonogénicos *in vitro* en presencia de una capa de alimentación de células del estroma. Las células también se pueden multiplicar *in vitro* en ausencia de capas de alimentación. Estos sistemas de cultivo son adecuados para el cultivo y la caracterización de células de hepáticas de injerto. *In vivo*, las células se injertan en el hígado, y el injerto se puede ensayar experimentalmente por repoblación de células hepáticas en animales deficientes en FAH.

Las células hepáticas de injerto se pueden usar en la evaluación de terapias relacionadas con virus específicos del hígado, por ejemplo, virus de la hepatitis A, B, C, D, E, etc, particularmente, virus de la hepatitis humana. Las células se pueden usar también en ensayos toxicológicos, para la producción de hepatocitos en cultivo, y como medio para proporcionar los productos secundarios del metabolismo hepático, por ejemplo, los productos de transformación de fármacos por parte de células hepáticas.

Breve descripción de los dibujos

la fig. 1A muestra la tinción de células hepáticas fetales humanas para dispersión frontal, autofluorescencia y viabilidad (yoduro de propidio), y clasificación en una población R1 y R2 sobre la base de estas características. La figura 1B muestra la expresión de los epítomos 5E12 y HLA de clase I en subpoblaciones de células en la población R2.

las figs 2A y 2B muestran que la población R2 es heterogénea respecto a la expresión de albúmina y CK19, antes de la clasificación respecto a la expresión de 5E12.

las figs. 3A a 3D muestran análisis fenotípicos de células hepáticas fetales humanas,

la fig. 4 muestra la tinción de células de la población R2 con 5E12, EpCAM, CD49f, cadherina E y HLA. Las figs. 4A, 4D y 4G muestran una tinción de 5E12 frente a HLA de clase I. Las regiones poligonales ilustran las celdas seleccionadas para seleccionar LEC respecto a 5E12⁺, HLA^{bajo}. Las figs. 4B, 4E y 4H muestran gráficos correspondientes utilizando cadherina E, EpCam y CD49f, respectivamente, como el eje x. Las figs. 4C, 4F y 4I muestran los análisis de las poblaciones repartidas en celdas en las figs. 4B, 4E y 4H, respecto a la expresión de 5E12. Los datos demuestran la equivalencia de la tinción entre 5E12, EpCam, cadherina E y Cd49f.

las figs. 5A-5F muestran tinción respecto a albúmina (alb), fetoproteína alfa (afp) y CK19 sobre colonias derivadas de LEC hepáticas fetales humanas después de dos semanas de cultivo *in vitro*.

las figs. 6A y 6B muestran los niveles de proteína antitripsina alfa 1 (AAT) (9A) circulante humana y albúmina (ALB) (9B) de suero de ratones NOD-SCID 6 semanas después del trasplante de células hepáticas totales, células hepáticas totales clasificadas o células R2 5E12⁺, HLA^{bajo}. Los datos demuestran el injerto y la generación de hepatocitos funcionales a partir de LEC.

las figs. 7A-7F muestran la detección de ALB humana o proteína CK19 en células hepáticas fetales humanas injertadas en el interior del hígado de un ratón NOD-SCID 6 semanas después del trasplante. Las figs. 10A-10F son cortes seriados de un único hígado. Estos datos demuestran la capacidad de LEC de generar hepatocitos. Las áreas en las que se expresa albúmina humana también son positivas para CK19.

la fig. 8A muestra la tinción de células hepáticas adultas humanas de las poblaciones R1 y R2, y la tinción de la población R2 respecto a 5E12, HLA. La fig. 8B muestra la expresión de albúmina y antitripsina alfa 1 después del cultivo *in vitro*.

las figs. 9A-9H muestran análisis de tejido hepático humano adulto, tal como se describe para células fetales en la figura 3.

las figs. 10A a 10H muestran la tinción de LEC en hígado fetal y adulto.

la fig. 11 muestra la morfología de las células hepáticas de injerto después de dos semanas de cultivo, en las que crecen como una monocapa epitelial celular típica.

la tabla 2 muestra dilución limitante de células hepáticas de injerto humanas.

la tabla 3 muestra la detección selectiva de LEC mediante inmunotinción.

Descripción de las formas de realización específicas

Se aíslan y caracterizan las células hepáticas de injerto (LEC, por sus siglas en inglés) y se demuestra que son células progenitoras capaces de desarrollarse hasta hepatocitos cuando se trasplantan *in vivo*. Las poblaciones celulares enriquecidas en células hepáticas de injerto son útiles en trasplantes para proporcionar la restauración de la función hepática en un receptor, para la detección selectiva de fármacos, modelos de desarrollo hepático *in vitro* e *in vivo*, ensayos de detección selectiva *in vitro* e *in vivo* para definir factores de crecimiento y diferenciación y para caracterizar genes implicados en el desarrollo y regulación del hígado y similares. Para estos propósitos se pueden usar las células nativas o se pueden modificar genéticamente para proporcionar capacidades alteradas.

La capacidad para desarrollarse hasta hepatocitos regeneradores se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en animales inmunodeficientes, por ejemplo, RAG, SCID, desnudos, etc., en los animales FAH^{+/-} o animales con FAH inactivado inmunodeficientes con células donantes alogénicas, singénicas o xenogénicas, por la capacidad de estas células donantes de proporcionar funcionalidad en este sistema. La expresión de FAH es un defecto del trastorno genético humano tirosinemia de tipo 1. Los hepatocitos injertados proporcionan la función FAH. Como alternativa se pueden usar procedimientos *in vitro* para la valoración de la función biológica, cultivando con factores de crecimiento adecuados y/o citocinas en condiciones de generación de hepatocitos. Cuando se dejan crecer en cultivo, las células objeto crecen como una monocapa con una morfología de células epiteliales típica.

Las células hepáticas de injerto de la presente invención pueden enriquecerse basándose en la viabilidad, dispersión frontal, autofluorescencia y expresión de marcadores de la superficie celular. Por ejemplo, después de la tinción con yoduro de propidio (PI), las células muertas se tiñen de forma brillante, dado que no son capaces de expulsar el colorante. Mientras que las células viables son negativas a bajas cuando se tiñen con yoduro de propidio. Las células de interés se encuentran en la subpoblación PI^{bajo}, entre las muy brillantes y las negativas, como se muestra en la figura 1. También se puede usar dispersión frontal para repartir en celdas en busca de las células de interés, que tienen una alta dispersión frontal, como se muestra en la figura 1.

Dentro de la población de alta dispersión frontal, las células PI^{bajo}, las células hepáticas de injerto se seleccionan positiva y/o negativamente respecto a la expresión de marcadores específicos. Se pueden clasificar células viables mediante análisis de citometría de flujo y clasificación por marcadores celulares, tales como los que se describen más adelante. Uno de tales marcadores de interés para la selección positiva es el epítipo 5E12. Otros marcadores que se pueden usar de forma intercambiable con 5E12 para la selección positiva incluyen ep-cam, cadherina e y CD94f. Preferiblemente, las células también se seleccionan respecto a baja expresión de antígenos de HLA de clase I, es decir, HLA-A, HLA-B y HLA-C. Otros marcadores que se pueden usar de forma intercambiable con antígenos de HLA de clase I incluyen CD38 y CD54. Además, las células se pueden seleccionar negativamente, o caracterizarse como negativas, para la expresión de CD117 y/o CD14. Aunque no se usan usualmente para la selección, la expresión tanto de proteínas citoplasmáticas albúmina y CK19 es característica de LEC.

Definiciones

En las definiciones de marcadores y células proporcionadas más adelante, los términos se definirán normalmente en términos de proteínas, células y similares humanas, siendo las células humanas una forma de realización preferida de la invención. Los expertos en la materia entenderán que también se pueden usar otros mamíferos como fuente de células, y que la selección de células de tales especies no humanas utilizará los marcadores homólogos y funcionalmente relacionados correspondientes para esa especie.

Injerto hepático: como se usa en el presente documento, el término “células hepáticas de injerto” se refiere a una población de células progenitoras que, cuando se trasplanta en un animal da lugar a hepatocitos maduros. El potencial de desarrollo de células progenitoras hepáticas se puede evaluar mediante criterios funcionales y fenotípicos. Funcionalmente, los hepatocitos se caracterizan por su capacidad de complementar la deficiencia de FAH, y por la expresión de proteínas específicas del hígado, incluyendo albúmina, antitripsina alfa 1, fetoproteína alfa, etc. Los hepatocitos también se caracterizan funcionalmente por su capacidad para ser infectados por virus de la hepatitis, por ejemplo hepatitis A (VHA), hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC), hepatitis D (VHD), hepatitis E (VHE), etc. Las células hepáticas de injerto de la invención también son capaces de dar lugar a BEC, que se pueden caracterizar funcionalmente por la expresión de citoqueratina 19, por la formación ductal multicelular y la formación de canalículos biliares entre células monocapa individuales.

Tinción positiva y negativa: las células hepáticas de injerto objeto se caracterizan por su expresión de marcadores de la superficie celular. Aunque es habitual en la técnica referirse a células como “positivas” o “negativas” para un marcador particular, los niveles reales de expresión son un rasgo cuantitativo. El número de moléculas sobre la superficie celular puede variar en varios logs, aunque se puede seguir caracterizando como “positivo”. Los expertos en

la materia también entienden que una célula que es negativa para la tinción, es decir, el nivel de unión de un reactivo específico de marcador no es diferente de forma detectable de un control, por ejemplo un control del mismo isotipo, puede expresar cantidades menores del marcador. La caracterización del nivel de tinción permite sutiles distinciones entre poblaciones celulares.

5

La intensidad de tinción de células se puede monitorizar mediante citometría de flujo, en la que láseres detectan los niveles cuantitativos de fluorocromo (que es proporcional a la cantidad de marcador de la superficie celular unido por reactivos específicos, por ejemplo, anticuerpos). La citometría de flujo o FACS se puede usar también para clasificar poblaciones de células basándose en la intensidad de unión a un reactivo específico, así como otros parámetros tales como el tamaño celular y la dispersión de la luz. Aunque el nivel absoluto de tinción puede variar con una preparación particular de fluorocromo y reactivo, los datos se pueden normalizar respecto a un control.

10

Con el fin de normalizar la distribución respecto a un control, se registra cada célula como un punto de datos que tiene una intensidad de tinción particular. Estos puntos de datos se pueden representar según una escala log, en la que la unidad de medida es la intensidad de tinción arbitraria. En un ejemplo, las células teñidas con mayor brillo en una muestra pueden ser incluso hasta 4 logs más intensas que las células no teñidas. Cuando se representa de esta manera, está claro que las células que se encuentran en el log máximo de intensidad de tinción son brillantes, mientras que las de la menor intensidad son negativas. Las células teñidas positivamente “bajas” tienen un nivel de tinción superior al brillo de un control del mismo isotipo, pero no es tan intenso como las células más brillantemente teñidas que se encuentran normalmente en la población. Las células positivas bajas pueden tener propiedades únicas que se diferencian de las células negativas y las positivas brillantemente teñidas de la muestra. Un control alternativo puede utilizar un sustrato que tenga una densidad de marcador definida sobre su superficie, por ejemplo, una perla fabricada o línea celular, que proporciona el control positivo para la intensidad.

20

Fuentes de células progenitoras. Poblaciones celulares *ex vivo e in vivo* útiles fuente de células pueden incluir poblaciones de células hepáticas frescas o congeladas, poblaciones de células de los conductos biliares o poblaciones de células pancreáticas, etc., obtenidas de tejido embrionario, fetal, pediátrico o adulto. Los procedimientos pueden incluir un enriquecimiento adicional o procedimientos de purificación o etapas para el aislamiento celular mediante selección positiva para otros marcadores celulares específicos. Las células progenitoras pueden obtenerse de cualquier especie de mamífero, por ejemplo, humana, equina, bovina, porcina, canina, felina, de roedor, por ejemplo, ratones, ratas, hámsters, primates, etc.

25

30

Población R2. Se pueden clasificar poblaciones de células que comprenden células progenitoras hepáticas de injerto como se ha descrito anteriormente basándose en dispersión frontal, autofluorescencia y viabilidad en presencia de un colorante vital (tal como yoduro de propidio, 7-ADD, etc.). La población R2, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de células vivas, de alta dispersión frontal, autofluorescentes, como se muestra en la figura 1. Después de la tinción con el colorante vital yoduro de propidio (IP), las células de interés no se tiñen de forma brillante, es decir, son (PI^{bajo}). Esta población de células está enriquecida en células progenitoras hepáticas de injerto y también contiene algunas células contaminantes, que pueden ser fibroblastos, células endoteliales y similares.

40

5E12. Las células hepáticas de injerto de la invención son positivas en cuanto a la expresión de antígeno 5E12. El anticuerpo monoclonal para 5E12 se creó originalmente frente a células nerviosas humanas. El anticuerpo reconoce una proteína de aproximadamente 125 kDa. La línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal para 5E12 se ha depositado en la colección americana de cultivos tipo, número de acceso _____ (véase la solicitud de patente pendiente de tramitación con la presente No. 60/119725).

45

Ep-cam. Las células hepáticas de injerto de la invención son positivas en cuanto a la expresión de ep-cam. Este antígeno también se conoce como antígeno epitelial de superficie (ESA) y glucoproteína epitelial 2 (EPG-2). Ep-cam media las adhesiones célula-célula homotípicas independientes de Ca²⁺. La expresión *in vivo* de Ep-CAM se relaciona con proliferación epitelial aumentada y se correlaciona negativamente con la diferenciación celular. Se ha demostrado una función reguladora de Ep-CAM en la morfogénesis de tejido epitelial para una serie de tejidos. La secuencia ha sido descrita por Szala y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:3542-3546. Los anticuerpos están disponibles comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Bioscience, Pharmigen, San Diego, CA, número de catálogo 347197.

50

Cadherina E: las células hepáticas de injerto de la invención son positivas en cuanto a la expresión de cadherina e. La cadherina E es una glucoproteína transmembrana de 120 kDa que se localiza en las uniones adherentes de las células epiteliales. Confiere adhesión célula-célula dependiente de calcio a través de cinco repeticiones extracelulares de unión a calcio. La expresión sobre la superficie celular conduce a la clasificación celular, siendo conferida la interacción hemofílica de forma específica por las regiones extracelulares específicas. Las regiones intracelulares se unen con los asociados citoplasmáticos catenina β o placoglobina (PG) y, en consecuencia, a catenina α y a la red de filamentos de actina. Los anticuerpos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, Ca, número de catálogo 610181.

60

CD49f. Las células hepáticas de injerto de la invención son positivas en cuanto a la expresión de CD49f. La integrina alfa 6 (CD49f) es una proteína transmembrana de 150 kDa que es parte de un heterodímero de integrina expresado predominantemente por células epiteliales. Alfa 6 se asocia con la cadena $\beta 1$ de la integrina para formar VLA-6 u con la cadena $\beta 4$ de la integrina para formar los receptores de laminina y calinina. La CD49f se expresa sobre todo en células T, monocitos, plaquetas, células epiteliales y endoteliales, células perineurales y trofoblastos de

65

la placenta. Su secuencia se puede encontrar en Tamura y col. (1990) J. Cell. Biol. 111:1593-1604. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, CA, número de catálogo 557511.

5 *HLA de clase I.* Las células hepáticas de injerto de la invención son negativas o bajas en cuanto a la expresión de HLA de clase I. Son ejemplos de loci de clase I HLA-A, -B y -C. Los antígenos para el MHC de clase I son glucoproteínas polimórficas de 2 cadenas de la superficie celular. La cadena ligera de los antígenos de clase I es la microglobulina beta 2. La cadena pesada tiene un peso molecular de 44.000 y consiste en 3 dominios N-terminales extracelulares de 90 aminoácidos cada una, un pequeño segmento que se extiende en la membrana y un pequeño dominio C-terminal intracelular hidrófobo, véase Malissen y col. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. 79:893-897. Los anticuerpos
10 están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, CA, número de catálogo 557349, que reaccionan con la forma humana de un epítipo monomérico de antígenos de mayor histocompatibilidad de clase I.

15 *CD54.* Las células hepáticas de injerto de la invención aisladas de tejido hepático adulto son negativas en cuanto a la expresión de CD54. Las células aisladas de tejido fetal pueden ser negativas o positivas en cuanto a la expresión de CD54, pero generalmente son menos brillantes que las células positivas para CD54, por ejemplo, células que se encuentran en la población 5E12. La CD54 es también conocida como una molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), de 90 kDa. El antígeno de CD54 es un ligando para el antígeno 1 asociado a la función leucocitaria (CD11a/CD18)
20 e influye tanto la adhesión dependiente de LFA-1 de leucocitos a células endoteliales como funciones inmunes que implican el contacto célula a célula. El antígeno de CD54 puede ser inducible en fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales. En el tejido normal, la densidad de antígeno de CD54 es máxima en el endotelio y aumenta por factores tales como exposición a citocinas, inflamación y transformación neoplásica. Simmos y col. (1988) Nature 331:624-627, 1988 describen la secuencia de nucleótidos de ICAM-1. Los anticuerpos están comercialmente disponibles de,
25 por ejemplo, BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, CA, número de catálogo 347977.

CD117. Las células hepáticas de injerto de la invención son negativas en cuanto a la expresión de CD117. La CD117 reorganiza el receptor de tirosina cinasa c-Kit. Este receptor se ha implicado particularmente con células madre, incluyendo células madre hematopoyéticas. También existen múltiples isoformas de c-Kit como resultado
30 del corte y empalme alterno de ARNm, escisión proteolítica y el uso de promotores crípticos internos en ciertos tipos celulares. Estructuralmente, c-Kit contiene cinco dominios similares a inmunoglobulina extracelularmente y un dominio catalítico dividido en dos regiones por un inserto de 77 aminoácidos intracelularmente, la secuencia se puede encontrar en Yarden y col. (1987) EMBO J. 6 (11):3341-3351. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, CA, número de catálogo 340529.

35 *CD14.* Las células hepáticas de injerto de la invención son negativas en cuanto a la expresión de CD14. CD14 es un gen de copia única que codifica 2 formas de proteína: una proteína de membrana de 50 a 55 kDa anclada a glucosfosfatidilinositol (CD14m) y una proteína sérica soluble derivada de monocitos o hepática (CD14s) que carece del anclaje. Ambas moléculas son críticas para la transducción de señal dependiente de lipopolisacárido (LPS) y
40 CD14s confiere sensibilidad a LPS a células que carecen de CD14m. La secuencia se puede encontrar en Govert y col. (1988) Science 239:497-500. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, CA.

CD34. Las células hepáticas de injerto e la invención pueden ser negativas o positivas en cuanto a la expresión de CD34. CD34 es un antígeno de la superficie celular monomérico con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa que se expresa selectivamente en células progenitoras hematopoyéticas humanas. El gen es expresado por células endoteliales de vasos pequeños además de células progenitoras hematopoyéticas y es una glucoproteína transmembrana de cadena única O-glucosilada de 105-120 kDa de peso. Simmons y col. (1992) J. Immun. 148:267-271 describen la secuencia. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmigen, San
50 Diego, CA, número de catálogo 550760.

CD38. Las células hepáticas de injerto de la invención pueden ser negativas o positivas en cuanto a la expresión de CD38, pero por lo general son menos brillantes que las células positivas para CD38, por ejemplo, células que se encuentran en la población 5E12. CD38 es una proteína transmembrana de tipo II de 300 aminoácidos con una cola citoplasmática corta N-terminal y 4 sitios de N-glucosilación extracelulares C-terminales. Jacson y col. (1990) J. Immun. 144:2811-2815 describen la secuencia. El marcador se asocia generalmente con linfocitos, mieloblastos y eritroblastos. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmigen, San
55 Diego, CA, número de catálogo 347680.

60 *Aislamiento de células hepáticas de injerto*

Las células hepáticas de injerto se separan de una mezcla compleja de células mediante técnicas que enriquecen en células que tienen las características como se ha descrito. Por ejemplo, se puede seleccionar una población de células de la población R2 respecto a la expresión de uno o más de 5E12, cadherina e, ep-cam y CD49f. Las células
65 se seleccionan opcionalmente en cuanto a expresión baja o negativa de antígenos de HLA de clase I (denominadas en el presente documento HLA^{bajo}). Se pueden usar CD54 y CD38 de forma intercambiable con HLA.

Para el aislamiento de células a partir de tejido, se puede usar una solución apropiada para dispersión o suspensión. Tal solución será generalmente una solución salina equilibrada, por ejemplo, solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hanks, etc, suplementada de forma conveniente con suero bovino fetal u otros factores de origen natural, junto con un tampón adecuado a una concentración baja, generalmente de 5-25 mM. Los tampones convenientes incluyen HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc.

Las células objeto son células grandes, de tipo blasto, por lo tanto, en una clasificación inicial se pueden seleccionar células grandes mediante varios procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo valoración de elución, meglumina diatrizoato de Ficoll o citometría de flujo usando los parámetros de dispersión frontal y7 obtusa para blastocitos.

La separación de la población de células objeto usará a continuación separación por afinidad para proporcionar una población sustancialmente pura. Las técnicas para la clasificación por afinidad pueden incluir clasificación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o usados junto con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, complemento y citotoxinas y el "plaqueado" (panning) con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, placa, u otra técnica convencional. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen clasificadores celulares activados por fluorescencia, que pueden tener grados variables de sofisticación, tales como múltiples canales de colores, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtusa, canales de impedancia, etc. Las células se pueden seleccionar frente a células muertas empleando colorantes asociados con células muertas (yoduro de propidio, 7-AAD). Se puede emplear cualquier técnica que no sea excesivamente perjudicial para la viabilidad de las células seleccionadas.

Los reactivos de afinidad pueden ser receptores específicos o ligandos para las moléculas de superficie celular indicadas anteriormente. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión específicos son bien conocidos para aquellos expertos en la materia.

Es de particular interés el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. De forma conveniente, estos anticuerpos se conjugan con una marca para su uso en la clasificación. Las marcas incluyen perlas magnéticas, que permiten la clasificación directa, biotina, que se puede eliminar con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, que se pueden usar con un clasificador celular activado por fluorescencia, o similar, que permite una fácil clasificación del tipo celular particular. Los fluorocromos que se usan incluyen ficobiliproteínas, por ejemplo, ficoeritrin y aloficocianinas, fluoresceína y rojo de Texas. A menudo, cada anticuerpo está marcado con un fluorocromo diferente para permitir la clasificación independiente para cada marcador.

Los anticuerpos se añaden a una suspensión de células y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para unirse a los antígenos de la superficie celular disponibles. La incubación será normalmente de al menos aproximadamente 5 minutos y normalmente de menos de aproximadamente 30 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de forma que la eficacia de la clasificación no esté limitada por falta de anticuerpo. La concentración apropiada se determina mediante valoración. El medio en el que se separan las células será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene de 0,1 a 0,5% de BSA. Hay varios medios comercialmente disponibles y se pueden usar según la naturaleza de las células, incluyendo medio de Eagle modificado de Dulbecco (dMEM), solución salina básica de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, medio de Iscoves, PBS con EDTA 5 mM, etc., con frecuencia suplementado con suero de ternera fetal, BSA, HSA, etc.

A continuación se separan las células marcadas según el fenotipo descrito anteriormente. Las células clasificadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, que normalmente tiene una almohadilla de suero en el fondo del tubo de recogida. Hay varios medios comercialmente disponibles y se pueden usar según la naturaleza de las células, incluyendo dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscoves, etc, con frecuencia suplementados con suero de ternera fetal.

De esta forma se consiguen composiciones altamente enriquecidas respecto a actividad hepática de injerto. La población objeto será de o aproximadamente del 50% o más de la composición celular, y normalmente de o aproximadamente del 90% o más de la composición celular y puede ser tan alta como de aproximadamente 95% o más de la población de células hepáticas. La población celular enriquecida se puede usar inmediatamente o se puede congelar a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenarse durante largos periodos de tiempo, descongelándose y siendo capaz de reutilizarse. Las células se almacenarán normalmente en DMSO al 10%, FCS al 50%, medio RPMI 1640 al 40%. Una vez descongeladas, las células se pueden multiplicar usando factores de crecimiento y/o células estromales para la proliferación y diferenciación.

Los presentes procedimientos son útiles en el desarrollo de un modelo *in vitro* o *in vivo* para las funciones de los hepatocitos y también son útiles en la experimentación en terapia génica y para la construcción de órganos artificiales. Los hepatocitos en desarrollo sirven como una valiosa fuente de nuevos factores de crecimiento y productos farmacéuticos y para la producción de virus o vacunas (por ejemplo, virus de la hepatitis), así como para el estudio de parásitos hepáticos o de parásitos que tienen un estadio de desarrollo en el hígado, por ejemplo, organismos de la malaria, para ensayos de toxicidad *in vitro* y de metabolismo de fármacos y compuestos industriales, para la experimentación en terapia génica (dado que el hígado es el mayor órgano vascular del cuerpo), para la construcción de hígados trasplantables artificiales y para estudios de mutagénesis y carcinogénesis hepática.

Ensayos funcionales

Un ensayo de interés para determinar la capacidad *in vivo* de células progenitoras hepáticas es un modelo animal de tirosinemia hereditaria de tipo 1, una enfermedad metabólica autosómica recesiva grave que afecta al hígado y a los riñones y que está provocada por la deficiencia de la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH). El tratamiento de ratones homocigotos para la disrupción del gen de FAH (FAH^{-/-}) con 2-(2-nitro-4-trifluoro-metilbencil)-1,3-ciclohexanodiona (NTBC) elimina la letalidad neonatal y corrige las funciones hepática y renal. El modelo animal se describe, por ejemplo, por Grompe y col., (1995) Nature Genetics 10:453-460; Overturf y col., (1996) Nat. Genet. 12 (3):266-73, etc.

En una forma de realización de la invención, se reconstituye un ratón FAH con células hepáticas de injerto, que pueden ser células progenitoras humanas o células de ratón que comprendan un marcador detectable. Por ejemplo, se pueden introducir las células en el ratón, que puede ser un ratón irradiado, y dejar que reconstituyan el hígado en primer lugar, después se retira la NTBC con el fin de seleccionar respecto a la reconstitución hepática. Como alternativa, se puede retirar la NTBC inmediatamente después de la introducción de las células hepáticas de injerto. Los animales reconstituidos son útiles para la detección selectiva de vacunas y agentes antivirales contra virus de la hepatitis, por ejemplo, hepatitis A, B, C, D, E, ensayos metabólicos y de toxicidad de agentes biológicamente activos y similares.

Cultivo celular in vitro

La población celular enriquecida se puede cultivar *in vitro* en varias condiciones de cultivo. Cuando se hacen crecer en cultivo, las células objeto crecen como una monocapa, con una morfología celular epitelial típica. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido, por ejemplo, que contenga agar, metilcelulosa, etc. La población celular se puede suspender de forma conveniente en un medio nutritivo apropiado, tal como DMEM modificado de Iscove o RPMI-1640, normalmente suplementado con suero de ternera fetal (aproximadamente al 5-10%), L-glutamina, un tiol, particularmente mercaptoetanol, y antibióticos, por ejemplo penicilina y estreptomina.

Las células objeto se pueden cultivar en un cocultivo con células de capa de alimentación. Las células estromales adecuadas para su uso como capas de alimentación incluyen células estromales de médula ósea, por ejemplo, la línea celular SYS-1, la línea celular de fibroblastos FFS-1, etc. Otras células que se pueden usar como una capa de alimentación incluyen fibroblastos derivados de seres humanos u otras fuentes animales, fibroblastos fetales derivados por cultivo primario de la misma especie que el hígado, la línea celular de fibroblastos STO, etc. Estas capas celulares proporcionan componentes no definidos al medio y pueden restringir la diferenciación de las células pluripotenciales. El cultivo en presencia de capas de alimentación es particularmente útil para el cultivo clónico, es decir, en el que una única célula progenitora se multiplica hasta dar una población.

Se pueden llevar a cabo ensayos funcionales usando célula cultivadas *in vitro*, particularmente cultivos celulares clonogénicos. Por ejemplo, se pueden evaluar las células cultivadas respecto a su capacidad para expresar proteínas específicas hepáticas, incluyendo albúmina y antitripsina alfa 1. La expresión puede utilizar cualquier formato conveniente, incluyendo PCR con TI, ELISA respecto a la presencia de la proteína en sobrenadantes de cultivo, etc. También se pueden evaluar las células cultivadas respecto a su capacidad para expresar proteínas de los conductos biliares, por ejemplo CK19.

El cultivo puede contener factores de crecimiento a los que las células respondan. Los factores de crecimiento, como se definen en el presente documento, son moléculas capaces de promover la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de células, en cultivo o en el tejido intacto, a través de efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen factores polipeptídicos y no polipeptídicos. Los factores de crecimiento específicos que se pueden usar al cultivar las células objeto incluyen, pero no se limitan a factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF), EGF, TGF α , FGF ácido (véase Block y col., J. Biol. Chem., 1996 132:1133-1149). Las condiciones de cultivo específicas se eligen para conseguir un propósito particular, es decir, mantener la actividad de células progenitoras, etc. Además de o en lugar de factores de crecimiento, las células objeto se pueden cultivar en un cocultivo con células estromales o de capa de alimentación. Las células de capa de alimentación adecuadas para su uso en el cultivo de células progenitoras son conocidas en la técnica.

Las células objeto cocultivadas se pueden usar de una variedad de formas. Por ejemplo, se puede aislar el medio nutritivo, que es un medio acondicionado, en varios estadios y analizarse los componentes. Se puede lograr la clasificación con HPLC; HPLC de fase inversa, electroforesis en gel, enfocado isoeléctrico, diálisis u otras técnicas no degradantes, que permitan la clasificación por peso molecular, volumen molecular, carga, combinaciones de los mismos o similares. Se pueden combinar una o más de estas técnicas para enriquecer adicionalmente respecto a fracciones específicas que promuevan la actividad de células progenitoras.

Las células objeto se pueden multiplicar en cultivo en un medio estromal exento de células, por ejemplo, como describen Suzuki y col., (2000) Hepatology 32:1230-1239. Tales cultivos se cultivan preferiblemente sobre un sustrato que da una recubrimiento de componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, laminina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo I, fibronectina, etc. El medio generalmente comprende factores de crecimiento, por ejemplo HGF, EGF, etc.

Las células hepáticas de injerto se pueden usar conjuntamente con un sistema de cultivo en el aislamiento y evaluación de factores asociados con la diferenciación y maduración de hepatocitos y BEC. De este modo, las células se pueden usar en ensayos para determinar la actividad de medios, tales como medios acondicionados, evaluar fluidos respecto a la actividad de factores de crecimiento, implicación con formación de estructuras específicas o similares. También se pueden usar los cultivos como un medio para procesar fármacos y otros compuestos para determinar el efecto del metabolismo hepático sobre un agente de interés. Por ejemplo, se puede aislar el producto del metabolismo hepático y ensayar respecto a su toxicidad y eficacia.

Trasplante

El fallo hepático implica las complicaciones sistémicas asociadas con lesión y disfunción hepáticas severas. Puede darse en un paciente sin una enfermedad hepática preexistente o se puede sobreponer a una lesión hepática crónica. El diagnóstico del fallo hepático agudo requiere la presencia de síntomas, incluyendo ictericia y encefalopatía. El fallo hepático fulminante altera todas las funciones hepáticas, provocando un metabolismo de la bilirrubina disminuido, un aclaramiento de amonio y de proteínas derivadas del intestino, y una producción disminuida de factor de coagulación. También puede provocar fallo renal, shock y sepsis. Sin un trasplante de hígado, más del 50% de los pacientes fallecerán, normalmente a causa de una combinación de las dolencias anteriores. La mortalidad supera el 50% incluso en las mejores circunstancias. El tratamiento implica medidas de apoyo generales hasta que el hígado pueda regenerarse y recuperar su función. En el fallo hepático agudo sin enfermedad preexistente, el trasplante de hígado puede salvar la vida.

Las células objeto se pueden usar para reconstituir la función hepática en un receptor. Se pueden usar células alogénicas para el aislamiento de células progenitoras y el consiguiente trasplante. La mayoría de las manifestaciones clínicas de la disfunción hepática surgen del daño celular y de la afectación de las capacidades hepáticas normales. Por ejemplo, la hepatitis vírica provoca el daño y la muerte de hepatocitos. En este caso, las manifestaciones pueden incluir hemorragia aumentada, ictericia y niveles aumentados de enzimas hepáticas circulantes. Cuando la disfunción hepática surge de dolencias tales como tumores, se pueden aislar las células objeto a partir del tejido hepático antológico y usarse para regenerar la función hepática después del tratamiento.

La enfermedad hepática tiene numerosas causas, que van desde infecciones microbianas y neoplasmas (tumores) hasta problemas metabólicos y circulatorios. La hepatitis implica la inflamación y el daño a los hepatocitos. Este tipo de afección puede resultar de agentes infecciosos, toxinas o ataque inmunológico. No obstante, la causa más común de hepatitis es una infección viral. En los Estados Unidos, tres virus importantes causan hepatitis: virus de la hepatitis A, B y C. En conjunto, infectan a cerca de 500.000 personas al año en los Estados Unidos. Además, bacterias, hongos y protozoos pueden infectar el hígado y el hígado está implicado de forma casi inevitable en alguna medida en todas las infecciones de origen sanguíneo.

Numerosas medicaciones pueden dañar el hígado, variando desde una alteración leve asintomática en los parámetros químicos hepáticos hasta el fallo hepático y la muerte. La toxicidad hepática puede o no estar relacionada con la dosis. El tilenol (acetaminofeno) es un fármaco hepatotóxico, dilantina (un anticonvulsivo) e isocianida (un agente antituberculoso) son ejemplos de fármacos que pueden causar una hepatitis similar a vírica. Toxinas tanto ambientales como industriales pueden causar una amplia variedad de cambios en el hígado. El daño hepático no es necesariamente dependiente de la dosis y puede variar desde una inflamación leve asintomática hasta un fallo fulminante o fibrosis progresiva y cirrosis.

Los problemas con procesos metabólicos en el hígado pueden ser bien congénitos o bien adquiridos. Algunos de estos trastornos, tal como la enfermedad de Wilson y la hemocromatosis pueden presentarse como hepatitis o cirrosis. La enfermedad de Wilson es una dolencia heredada rara que se caracteriza por una incapacidad para excretar el cobre en la bilis, dando como resultado la acumulación tóxica de cobre en el hígado y sistema nervioso. La hemocromatosis es un síndrome de sobrecarga de hierro que provoca depósitos de hierro y daño consiguiente a varios órganos, incluyendo el hígado, corazón, páncreas y glándula pituitaria. La enfermedad puede deberse a un aumento heredado en la absorción intestinal de hierro o a múltiples transfusiones de sangre, dado que el hierro se encuentra normalmente en los glóbulos rojos circulantes.

El hígado puede verse afectado por numerosas dolencias, particularmente trastornos autoinmunes, en los que el sistema inmune ataca a los tejidos normales del propio cuerpo. Algunos ejemplos incluyen enfermedades reumáticas, tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, y enfermedades inflamatorias del intestino, tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Se pueden introducir genes en las células antes del cultivo o trasplante para una variedad de fines, por ejemplo, prevenir o reducir la susceptibilidad a la infección, sustituir genes que tengan una mutación de pérdida de función, etc. Como alternativa, se introducen vectores que expresan ARNm antisentido o ribozimas, bloqueando con ello la expresión de un gen no deseado. Otros procedimientos de terapia génica son la introducción de genes de resistencia a fármacos para permitir que las células progenitoras normales tengan una ventaja y sean objeto de presión selectiva, por ejemplo, el gen de resistencia múltiple a fármacos (MDR), o genes antiapoptóticos tales como bcl-2. Se pueden usar varias técnicas conocidas en la técnica para transfectar las células diana, por ejemplo, electroporación, ADN precipitado con calcio, fusión, transfección, lipofección y similares. La forma particular en la que se introduce ADN no es fundamental para la práctica de la invención.

Están disponibles muchos vectores útiles para transferir genes exógenos en células de mamífero. Los vectores pueden ser episomales, por ejemplo, plásmidos, vectores derivados de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, etc. o pueden estar integrados en el genoma de la célula diana, mediante recombinación homóloga o integración aleatoria, por ejemplo, vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, VIH-1, ALV, etc. Para ejemplos de alteración genética de células progenitoras y madre, véase Svendsen y col., (1999), Trends Neurosci. 22(8):357-64; Krawetz y col., (1999) Gene 234(1):1-9; Pellegrini y col., Med Biol Eng Comput. 36(6):778-90 y Alison (1998) Curr Opin Cell Biol. 10(6):710-5.

Como alternativa, se pueden immortalizar-desinmortalizar los progenitores hepáticos (por ejemplo, véase Kobayashi y col. (2000) Science 287:1258-1262. En un procedimiento de este tipo, se introduce una secuencia genética immortalizante por ejemplo un oncogen en la célula de tal forma que se pueda eliminar fácilmente por ejemplo con una recombinasa específica de sitio tal como el sistema cre-lox.

Para probar que se han modificado genéticamente células progenitoras se pueden emplear varias técnicas. Se puede digerir el genoma de las células con enzimas de restricción y usarse con o sin amplificación del ADN. Se pueden emplear la reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis en gel, análisis de restricción, inmunotransferencias de Southern, Northern y Western, secuenciación o similares. Las células se pueden cultivar en varias condiciones para asegurarse de que las células son capaces de diferenciarse a la vez que conservan la capacidad de expresar el ADN introducido. Se pueden emplear varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para asegurarse de que se ha conservado la capacidad pluripotencial de las células.

Las células se pueden administrar en cualquier medio fisiológicamente aceptable, normalmente por vía intravascular, incluyendo intravenosa, por ejemplo a través de la vena porta hepática, intraesplénica, etc, aunque también se pueden introducir en otros sitios convenientes, en los que las células puedan encontrar un sitio apropiado para su regeneración y diferenciación. Normalmente se administrarán al menos 1×10^3 /kg células, más normalmente al menos aproximadamente 1×10^4 /kg, preferiblemente 1×10^6 /kg o más. Las células se pueden introducir mediante inyección, catéter o similares.

Las células objeto se usan como células cultivadas y para la generación de hepatocitos para biorreactores hepáticos artificiales, en los que se clasifican los hepatocitos mediante una membrana u otra barrera física de la corriente de perfusato. Actualmente hay cuatro dispositivos (Circe Biomedical HepatAssist®, Vitagen ELADTM, Gerlach BELS y Excorp Medical BLSS) que utilizan hepatocitos en membrana de fibra hueca en evaluación clínica. A pesar de que el desarrollo de dispositivos hepáticos bioartificiales de asistencia (BLAD) para el tratamiento de fallo hepático agudo, bien fulminante o descompensación aguda en fallo hepático crónico, es de gran interés, ha sido difícil de conseguir, en parte porque los hepatocitos son extremadamente difíciles de mantener en cultivo. Cultivando las células hepáticas de cultivo objeto, se proporciona un suministro constante de hepatocitos para tales dispositivos.

Los biorreactores hepáticos bioartificiales proporcionan una o más de las funciones: detoxificación oxidativa (sobre todo a través del sistema enzimático del citocromo P450), biotransformación (por ejemplo, síntesis de urea, gluconuridación y sulfatación), excreción (a través del sistema biliar), síntesis de proteínas y macromoléculas, metabolismo intermedio (gluconeogénesis, ácidos grasos y aminoácidos) y modulación del sistema inmune y hormonal.

Los BLAD en evaluación clínica actualmente se basan en el uso de cartuchos de fibra hueca que albergan hepatocitos cultivados en el espacio extraluminal de las fibras huecas. A través del espacio luminal del cartucho de fibra hueca se perfunden sangre completa o una corriente de plasma. Se puede colocar un oxigenador antes de los biorreactores para aumentar los niveles de oxígeno disponibles en la corriente de perfusión y columnas o filtros usados para reducir toxinas antes de alcanzar los hepatocitos.

Otros dispositivos pueden perfundir plasma en un recorrido de flujo axial sobre y/o a través de un textil de poliéster no tejido, a través de canales incluidos en una estructura de espuma de poliuretano altamente porosa sembrada con hepatocitos, a través de membranas de fibra hueca microporosas de polisulfona, material de resina de polivinilformal microporoso y similares. Las células progenitoras y o los hepatocitos descendientes pueden estar encapsulados.

Ensayos de expresión

Es de particular interés el examen de la expresión génica en células hepáticas de injerto. El conjunto de genes expresado se puede comparar con una variedad de células de interés. Por ejemplo, células progenitoras hepáticas adultas, células madre, células hematopoyéticas, etc., como se sabe en la técnica. Por ejemplo, se podrían llevar a cabo experimentos para determinar los genes que se regulan durante el desarrollo.

Se puede usar cualquier procedimiento cualitativo o cuantitativo adecuado conocido en la técnica para detectar ARNm específicos. Se puede detectar ARNm mediante, por ejemplo, hibridación a un microensayo, hibridación *in situ* en secciones de tejido, mediante PCR con transcriptasa inversa, o en inmunotransferencias de Northern que contienen ARNm poli-A⁺. Un experto en la materia puede usar fácilmente estos procedimientos para determinar diferencias en el tamaño o cantidad de transcritos de ARNm entre dos muestras. Por ejemplo, se compara el nivel de ARNm particulares en células progenitoras con la expresión de los ARNm en una muestra de referencia, por ejemplo, hepatocitos u otras células diferenciadas.

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para comparar niveles de expresión de ARNm en una muestra junto con los procedimientos de la invención. Por ejemplo, se pueden determinar los niveles de expresión de ARNm en una muestra mediante la generación de una biblioteca de etiquetas de secuencia expresadas (EST) de una muestra. La enumeración de la representación relativa de EST en la biblioteca se puede usar para aproximar la representación

relativa de un transcrito génico en la muestra de partida. Los resultados de los análisis de EST de una muestra de ensayo se pueden comparar entonces con los análisis de EST de una muestra de referencia para determinar los niveles de expresión relativos de un polinucleótido seleccionado, particularmente un polinucleótido correspondiente a uno o más de los genes expresados diferencialmente descritos en el presente documento.

Como alternativa, se puede llevar a cabo la expresión génica en una muestra de ensayo usando metodología de análisis seriado de la expresión génica (SAGE) (Velculescu y col., Science (1995) 270:484). SAGE implica el aislamiento de etiquetas cortas de secuencia únicas de una localización específica en cada transcrito. Las etiquetas de secuencia se concatan, se clonan y se secuencian. El número de veces que se encuentra la etiqueta de secuencia asociada con la población de secuencias refleja la frecuencia de transcritos particulares en la muestra de partida.

La expresión génica en una muestra de ensayo también se puede analizar usando metodología de representación diferencial (DD). En DD, se usan fragmentos definidos por secuencias de polinucleótidos específicas (o sitios de enzimas de restricción) como identificadores únicos de genes, acoplados con información acerca de la longitud del fragmento o la localización del fragmento en el gen expresado. La representación relativa de un gen expresado en una muestra se puede estimar entonces basándose en la representación relativa del fragmento asociado con ese gen en el conjunto de todos los fragmentos posibles. En la técnica se conocen bien procedimientos y composiciones para llevar a cabo DD, véase, por ejemplo, el documento US 5.776.683 y el documento US 5.807.680.

Como alternativa, expresión génica en una muestra usando análisis de hibridación, que se basa en la especificidad de las interacciones nucleotídicas. Se pueden usar oligonucleótidos o ADNc para identificar de forma selectiva o capturar ADN o ARN de composición de secuencia específica, y determinar la cantidad de ARN o ADNc hibridado a una secuencia de captura conocida cuantitativa o cualitativamente para proporcionar información acerca de la representación relativa de un mensaje particular en el conjunto de mensajes celulares en una muestra. Los análisis de hibridación se pueden diseñar para permitir la detección selectiva concurrente de la expresión relativa de cientos a miles de genes usando, por ejemplo, tecnologías basadas en ensayos que tienen formatos de alta densidad, incluyendo filtros, portaobjetos de microscopio o microchips, o tecnologías basadas en solución que usan análisis espectrofotométricos (por ejemplo, espectrometría de masas). Un uso ejemplar de ensayos en los procedimientos de diagnóstico de la invención se describe con mayor detalle a continuación.

Se puede llevar a cabo hibridación a ensayos, pudiendo producirse los ensayos según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, en los documentos US 5.134.854 y US 5.445.934 se describen procedimientos para producir grandes ensayos de oligonucleótidos que usan técnicas de síntesis fotodirigidas. Usando un sistema controlado por ordenador se convierte un ensayo heterogéneo de monómeros, mediante acoplamiento simultáneo en una serie de sitios de reacción, en un ensayo heterogéneo de polímeros. Como alternativa, se generan microensayos por deposición de oligonucleótidos previamente sintetizados sobre un sustrato sólido, por ejemplo, como se describe en la solicitud PCT publicada No. WO 95/35505.

En la técnica también se conocen bien procedimientos para la recogida de datos de la hibridación de muestras con ensayos. Por ejemplo, los polinucleótidos de las muestras celulares se pueden generar usando una marca fluorescente detectable, y detectarse la hibridación de los polinucleótidos en las muestras barriendo las microensayos en cuanto a la presencia de la marca detectable. En la técnica se conocen procedimientos y dispositivos para detectar dianas marcadas de forma fluorescente sobre dispositivos. Por lo general, tales dispositivos de detección incluyen un microscopio y una fuente de luz para dirigir luz hacia un sustrato. Un contador de fotones detecta la fluorescencia del sustrato, mientras que una plataforma de traslación x-y varía la localización del sustrato. En la patente de EE.UU. No. 5.631.734 se describe un dispositivo de detección confocal que se puede usar en los procedimientos objeto. En Salón y col., Genome Res. (1996) 6:639 se describe un microscopio láser de barrido. Se lleva a cabo un barrido usando la línea de excitación apropiada para cada fluoróforo usado. Las imágenes digitales generadas a partir del barrido se combinan a continuación para el análisis consiguiente. Para cualquier elemento particular de la invención, se compara la proporción de la señal fluorescente de una muestra con la señal fluorescente de otra muestra y se determina la intensidad de señal relativa.

En la técnica se conocen bien procedimientos para analizar los datos recogidos a partir de la hibridación a ensayos. Por ejemplo, cuando la detección implica una marca fluorescente, los análisis de datos pueden incluir las etapas de determinar la intensidad de fluorescencia como una función de la posición en el sustrato a partir de los datos recogidos, eliminar valores atípicos, es decir, los datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada, y calcular la afinidad de unión relativa de las dianas a partir de los datos restantes. Los datos resultantes se pueden representar como una imagen con la intensidad en cada región variando de acuerdo con la afinidad de unión entre dianas y muestras.

Se puede llevar a cabo la adaptación a un patrón de forma manual o usando un programa informático. Se describen procedimientos para la preparación de matrices sustrato (por ejemplo, ensayos), diseño de oligonucleótidos para su uso con tales matrices, marcaje de sondas, condiciones de hibridación, barrido de matrices hibridadas y análisis de patrones generados, incluyendo análisis comparativos, por ejemplo, en el documento US 5.800.992.

En otro procedimiento de detección selectiva, la muestra de ensayo se ensaya a nivel de proteína. Se puede acometer el diagnóstico usando cualquiera de una serie de procedimientos para determinar la ausencia o presencia o cantidades alteradas de un polipéptido expresado diferencialmente en la muestra de ensayo. Por ejemplo, la detección puede utilizar la tinción de células o cortes histológicos (por ejemplo, de una muestra de biopsia) con anticuerpos marcados, realizada de acuerdo con procedimientos convencionales. Las células pueden permeabilizarse para teñir moléculas citoplasmáticas. En general se añaden anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido expresado diferencialmente de la invención a una muestra y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión al epítipo, normalmente al menos aproximadamente 10 minutos. El anticuerpo puede estar marcado de forma detectable para la detección directa (por ejemplo, usando radioisótopos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes y similares) o se puede usar en conjunción con un anticuerpo o reactivo de segunda etapa para detectar la unión (por ejemplo, biotina con avidina conjugada a peroxidasa de rábano picante, un anticuerpo secundario conjugado con un compuesto fluorescente, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo de Texas, etc.). La presencia o ausencia de unión al anticuerpo se puede determinar por varios procedimientos, incluyendo citometría de flujo de células disociadas, microscopía, radiografía, recuento de centelleo, etc. Se puede usar cualquier procedimiento alternativo de detección cualitativa o cuantitativa de niveles o cantidades de polipéptido expresado diferencialmente, por ejemplo ELISA, inmunotransferencia de Western, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, etc.

Ensayos de detección selectiva

Las células objeto son útiles para ensayos y detecciones selectivas *in vitro* para detectar agentes que afectan a las células hepáticas de injerto y hepatocitos generados a partir de las células hepáticas de injerto. Para este fin se pueden usar una amplia variedad de ensayos, incluyendo ensayos de toxicología, inmunoensayos para la unión de proteínas, determinación del crecimiento celular, diferenciación y actividad funcional, producción de hormonas y similares.

En los ensayos de detección selectiva para agentes biológicamente activos, virus, etc., las células objeto, normalmente un cultivo que comprende las células objeto, se pone en contacto con el agente de interés y se evalúa el efecto del agente monitorizando parámetros de salida, tales como expresión de marcadores, viabilidad celular y similares. Las células pueden estar recién aisladas, cultivadas, genéticamente alteradas como se ha descrito anteriormente y similares. Las células pueden ser variantes ambientalmente inducidas de cultivos clónicos, por ejemplo, divididas en cultivos independientes en condiciones distintas, por ejemplo con o sin virus, en presencia o ausencia de otras citoquinas o combinaciones de los mismos. La manera en la que las células responden a un agente, particularmente a un agente farmacológico, incluyendo el tiempo de respuesta es un reflejo importante del estado fisiológico de la célula.

Los parámetros son componentes cuantificables de las células, particularmente componentes que se pueden medir de forma precisa, de forma deseable en un sistema de alto flujo de procesamiento. Un parámetro puede ser cualquier componente celular o producto celular incluyendo determinante de la superficie celular, receptor, proteína o modificación conformacional o postraduccional del mismo, lípido, carbohidrato, molécula orgánica o inorgánica, ácido nucleico, por ejemplo ARNm, ADN, etc. o una porción derivada de un componente celular de este tipo o combinaciones de los mismos. Aunque la mayoría de los parámetros proporcionarán una lectura cuantitativa, en algunos casos un resultado semicuantitativo o cualitativo será aceptable. Las lecturas pueden incluir un único valor determinado, o pueden incluir un valor medio, valor de la mediana o la varianza, etc. De forma característica se obtendrá un intervalo valores de lectura de parámetros para cada parámetro a partir de una multiplicidad de los mismos ensayos. La variabilidad es esperada y se obtendrá un intervalo de valores para cada uno del conjunto de parámetros de ensayo usando procedimientos estadísticos convencionales usados para proporcionar valores únicos.

Los agentes de interés para la detección selectiva incluyen compuestos conocidos y desconocidos que engloban numerosas clases químicas, principalmente moléculas orgánicas, que pueden incluir moléculas organometálicas, moléculas inorgánicas, secuencias genéticas, etc. Un aspecto importante de la invención es evaluar fármacos candidatos, incluyendo ensayos de toxicidad para ensayar el efecto de virus hepáticos, por ejemplo, virus de la hepatitis A, B, C, D, E, agentes antivirales y similares.

Además de agentes biológicos complejos, tales como virus, los agentes candidatos incluyen moléculas orgánicas que comprenden grupos funcionales necesarios para interacciones estructurales, particularmente uniones de hidrógeno, e incluyen normalmente al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, con frecuencia al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras carbonadas cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas, incluyendo péptidos, polinucleótidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Se incluyen fármacos farmacológicamente activos, moléculas generalmente activas, etc. Los compuestos de interés incluyen agentes quimioterapéuticos, hormonas o antagonistas de hormonas, etc. Son ejemplos de agentes farmacéuticos adecuados para esta invención aquellos descritos en "The Pharmacological Basis of Therapeutics" Goodman y Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, Nueva York (1996), novena edición, en las secciones: agua, sales e iones, fármacos que afectan a la función renal y el metabolismo electrolítico, fármacos que afectan a la función gastrointestinal, quimioterapia de enfermedades microbianas, quimioterapia de enfermedades neoplásicas, fármacos que actúan sobre órganos hematopoyéticos, hormonas y antagonistas de hormonas, vitaminas, dermatología y toxicología, todos ellos incorporados en el presente documento mediante referencia. También se incluyen toxinas y agentes de armas biológicas y químicas, por ejemplo, véase Somani, S. M. (Ed.), "Chemical Warfare Agents", Academia Press, Nueva York, 1992).

Los compuestos de ensayo incluyen todas las clases de moléculas descritas anteriormente, y pueden comprender adicionalmente muestras de contenido desconocido. Son de interés mezclas complejas de compuestos naturales derivados de fuentes naturales tales como plantas. Aunque muchas muestras comprenderán compuestos en solución, también se pueden ensayar muestras sólidas que se pueden disolver en un disolvente adecuado. Las muestras de interés incluyen muestras medioambientales, por ejemplo, agua subterránea, agua marina, residuos mineros, etc., muestras biológicas, por ejemplo, lisados preparados a partir de cosechas, muestras de tejido, etc., muestras de fabricación, por ejemplo, transcurso de tiempo durante la preparación de compuestos farmacéuticos, así como bibliotecas de compuestos preparados para su análisis y similares. Las muestras de interés incluyen compuestos que se evalúan en cuanto a un potencial valor terapéutico, es decir, candidatos a fármacos.

El término muestras también incluye los fluidos descritos anteriormente a los que se han añadido componentes adicionales, por ejemplo componentes que afectan a la fuerza iónica, pH, concentración de proteína total, etc. Además, las muestras se pueden tratar para alcanzar al menos un fraccionamiento o concentración parcial. Las muestras biológicas se pueden almacenar si se tiene cuidado para reducir la degradación del compuesto, por ejemplo, bajo nitrógeno, congeladas, o una combinación de los mismos. El volumen de muestra usado es suficiente para permitir la detección mensurable, normalmente de aproximadamente 0,1 μ l a 1 ml de una muestra biológica es suficiente.

Los compuestos, incluyendo los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, hay disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria o dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluyendo biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa hay disponibles o fácilmente producidas bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, las bibliotecas y compuestos naturales o sintéticamente producidos se modifican fácilmente gracias a medios convencionales químicos, físicos y bioquímicos y se pueden usar para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. par producir análogos estructurales.

La actividad biológica de los agentes se detecta selectivamente añadiendo el agente a al menos uno y normalmente a una pluralidad de muestras celulares, normalmente junto con células exentas del agente. Se mide el cambio en los parámetros en respuesta al agente, y los resultados se evalúan por comparación con cultivos de referencia, por ejemplo, en presencia y ausencia del agente, obtenidos con otros agentes, etc.

Los agentes se añaden normalmente en solución o forma fácilmente soluble al medio de células en cultivo. Los agentes se pueden añadir en un sistema de flujo continuo, como una corriente, intermitente o continua o de forma alternativa, añadiendo un bolo del compuesto, de una vez o de forma gradual, a una solución por lo demás estática. En un sistema de flujo continuo, se usan dos fluidos, en el que uno es una solución fisiológicamente neutra y el otro es la misma solución con el compuesto de ensayo añadido. El primer fluido se hace pasar sobre las células, seguido del segundo. En un procedimiento de solución única, se añade un bolo del compuesto al volumen de medio que rodea las células. Las concentraciones totales de los componentes del medio de cultivo no deberían cambiar de forma significativa con la adición del bolo, o entre las dos soluciones en un procedimiento de flujo continuo.

Las formulaciones de agente preferidas no incluyen componentes adicionales tales como conservantes que pueden tener un efecto significativo sobre la formulación global. Por lo tanto, las formulaciones preferidas consisten esencialmente en un compuesto biológicamente activo y un vehículo fisiológicamente aceptable, por ejemplo, agua, etanol, DMSO, etc. No obstante, si un compuesto es líquido sin un disolvente, la formulación puede consistir esencialmente en el propio compuesto.

Se pueden realizar una pluralidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones del agente para obtener una respuesta diferencial a las varias concentraciones. Como se sabe en la técnica, la determinación de la concentración efectiva de un agente normalmente usa un intervalo de concentraciones resultantes de diluciones 1:10 u otra escala log. Las concentraciones pueden refinarse adicionalmente con una segunda serie de diluciones, si fuese necesario. Normalmente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, una concentración cero o por debajo del nivel de detección del agente o en o por debajo de la concentración del agente que no provoca un cambio detectable en el fenotipo.

Se pueden utilizar varios procedimientos para cuantificar la presencia de los marcadores seleccionados. Para medir la cantidad de una molécula que está presente, un procedimiento convencional es marcar una molécula con un resto detectable, que puede ser fluorescente, luminiscente, radioactivo, enzimáticamente activo, etc., particularmente una molécula específica para unirse al parámetro con alta afinidad. Hay restos fluorescentes fácilmente disponibles para marcar prácticamente cualquier biomolécula, estructura o tipo celular. Los restos inmunofluorescentes pueden estar dirigidos para unirse no sólo a proteínas específicas, sino también a conformaciones específicas, productos de escisión o modificaciones de sitio tales como fosforilación. Se pueden modificar por ingeniería de proteínas péptidos y proteínas individuales para hacerlos autofluorescentes, por ejemplo, expresándolos como quimeras con proteína verde fluorescente en el interior de células (para una revisión, véase Jones y col. (1999) Trends Biotechnol. 17(12):477-81). De esta forma se pueden modificar genéticamente anticuerpos para proporcionar un colorante fluorescente como parte de su estructura. En función de la marca elegida, se pueden medir parámetros usando marcadores distintos a los fluorescentes, usando técnicas de inmunoensayo tales como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorbancia unido a enzimas (ELISA), inmunoensayos enzimáticos homogéneos y técnicas no enzimáticas relacionadas. La

cuantificación de ácidos nucleicos, especialmente de ARN mensajeros también es de interés como parámetro. Estos se pueden medir mediante técnicas de hibridación que dependen de la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos. Las técnicas incluyen procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa así como técnicas de ensayos génicos. Véase *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col., eds. John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 2000; Freeman y col., (1999) *Biotechniques* 26(1):112-225; Kawamoto y col., (1999) *Genome Res.* 9(12):1305-12; y Chen y col. (1998) *Genomics* 51(3):313-24, para ejemplos.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos se detallan para proporcionar a aquellos expertos en la materia una completa representación y descripción de cómo realizar y usar la invención objeto, y no se pretende que limiten el alcance de lo que se considera como la invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, concentraciones, etc.), pero se pueden permitir algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la o próxima a la atmosférica.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan mediante referencia en el presente documento, como si se indicase que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora mediante referencia específica e individualmente. La cita de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de presentación y no debería considerarse como una admisión de que la presente invención no está dirigida a anteponerse a dicha publicación en virtud de invención previa.

Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies animales o géneros y reactivos particulares descritos, dado que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir formas de realización particulares únicamente, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que estará sólo limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “y”, y “el” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta forma, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de tales células y la referencia a “la proteína” incluye una referencia a una o más proteínas y equivalentes de las mismas conocidas para aquellos expertos en la materia, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención a menos que se indique claramente lo contrario.

Ejemplo 1

Clasificación por citometría de flujo de células hepáticas humanas

Se llevaron a cabo análisis duales de citometría de flujo láser y clasificación de células hepáticas humanas de tejido fetal y adulto en un Becton Dickinson FACS Vantage SE. Se utilizaron un láser de argón iónico y un láser de helio neón como las fuentes de excitación primaria y secundaria, emitiendo 150 mW a 488 nm de longitud de onda y 30 mW a 633 nm de longitud de onda, respectivamente. Se amplificó linealmente la luz difractada en los ángulos frontal y ortogonal y se midió a través de filtros de 48 nm de paso de banda, empleando un filtro de densidad neutra de 0,6 DO delante del detector de dispersión frontal con el fin de atenuar señales de dispersión de ángulo frontal de nivel alto resultantes de poblaciones de células de mayor tamaño. En esta configuración hay intervalo dinámico suficiente para que el eje de dispersión frontal capture y escale señales de dispersión de ángulo frontal que resultan del diverso intervalo de tamaños celulares que se encuentran en el tejido hepático, con una única década lineal. Los ajustes típicos de la ganancia del amplificador de dispersión frontal oscilan entre 8 y 16. Se excitaron los fluorocromos FITC, PE y PI a 488 nm y se midieron las emisiones de fluorescencia usando filtros de 530/30, 585/42, 610/20 nm de paso de banda, respectivamente. Se excitaron los fluorocromos APC y APC-Cy7 a 633 nm y se midieron las emisiones de fluorescencia usando filtros de 660/20 de paso de banda y 750 de paso largo, respectivamente. Todas las medidas de inmunofluorescencia se amplificaron logarítmicamente.

Los ajustes de voltaje para cada canal fluorescente se calibran usando la partícula de referencia Spherotech RFP 30-5. Después de la calibración se derivan empíricamente ajustes de compensación usando controles de color único.

La configuración del ajuste de fluidos en el citómetro de flujo se optimiza para la distribución de tamaño y características únicas de las células que se encuentran en el tejido derivado del hígado. Se usan una punta de boquilla fabricada a medida con un diámetro de orificio de 130 μm y un ajuste de presión de cubierta de 10 psi. La temperatura del depósito de cubierta, del soporte de muestras y del soporte tubular de recepción se mantiene a 4°C mediante un recirculador refrigerado.

Las subpoblaciones agrupadas de células derivadas del hígado se pueden identificar añadiendo PI a la suspensión celular, sometiendo a las células a citometría de flujo y analizando los datos como un gráfico de dispersión frontal frente a fluorescencia de PI. Se pueden resolver tres poblaciones distintas según los siguientes atributos: un pequeño grupo de células que muestran baja dispersión frontal, bajo nivel de fluorescencia (R1), un gran grupo de células que muestran alta dispersión frontal y fluorescencia media (R2) y células muertas que comprenden el tercer grupo diferente con un continuo de señal de dispersión frontal de nivel bajo a medio y muy alto nivel de fluorescencia. Los resultados

se muestran en la figura 1. Se demuestra que la subpoblación R2 es autofluorescente realizando el análisis descrito anteriormente en ausencia de PI. Se pueden resolver dos poblaciones diferentes según los siguientes atributos: un pequeño grupo de células que muestran baja dispersión frontal, bajo nivel de fluorescencia y un gran grupo de células que muestran alta dispersión frontal y media fluorescencia.

Se discriminan los agregados usando procesamiento en pulsos, representando gráficamente la altura de los picos de dispersión frontal frente a la anchura, que forma la base de la tercera región. Se define una celda de clasificación como la intersección de estas tres regiones. Se consigue un enriquecimiento primario de la población diana en la primera ronda de clasificación. El producto enriquecido se puede volver a clasificar entonces respecto a la pureza relativa. La pureza del producto siempre se verifica mediante un análisis repetido.

Ejemplo 2

Aislamiento de una célula progenitora hepática

Se tiñeron células hepáticas previamente congeladas o células hepáticas recién aisladas con 5E12. Las células se enriquecieron en cuanto a 5E12 mediante columna de MACS usando un anticuerpo 5E12, después se clasificaron las células 5E12+. Como alternativa, se clasificaron células 5E12 directamente después de la tinción. Para la clasificación, las células se clasifican entre celdas R1 y R2. Las células R2/5E12⁺ representan la mayoría de las células hepáticas de injerto en un ensayo *in vitro* o *in vivo*. Las células se caracterizaron mediante la expresión de ck19 y albúmina en la misma célula (se muestra en la figura 2A y 2B). Además de 5E12, la selección para niveles inferiores de expresión de HLA de clase I enriquecida para el injerto hepático, usando anticuerpo reactivo con HLA de clase I humano A, B, C (anticuerpo W6-32). Cuando se dividen en celdas las células R2, se pueden resolver tres subpoblaciones agrupadas de células distintas mediante el análisis de fluorescencia de 5E12 frente a fluorescencia de HLA de clase I como gráficos de densidad o de contorno bidimensionales (figura 1). Una subpoblación muestra tinción negativa tanto para 5E12 como para HLA de clase I (5E12⁻ HLA⁻), una segunda subpoblación muestra un nivel relativo menor de fluorescencia de 5E12 y mayores niveles de fluorescencia de HLA de clase I (5E12⁻ HLA⁺), y una tercera subpoblación muestra mayores niveles de fluorescencia de 5E12 y menores niveles de fluorescencia de HLA de clase I (5E12⁺ HLA^{bajo}).

Mientras que un análisis de tinción única, es decir, de un color, no proporciona necesariamente una distinción clara entre poblaciones, en las figuras está claro que en un gráfico de dos colores, las células entran en dos subpoblaciones distintas.

Resultados

Se proporciona un procedimiento para enriquecer en colonias progenitoras hepáticas clasificando en cuanto a la expresión de antígenos de la superficie celular. A partir de los resultados de un ensayo clonogénico de células hepáticas fetales humanas clasificadas: se clasificaron las células en cuanto a su viabilidad (PI), tamaño (FS) y autofluorescencia y se clasificaron adicionalmente mediante anticuerpos de superficie y se dispusieron en placas sobre FFS- o BMS-6. Se comparó la capacidad proliferativa de las colonias hepáticas generadas después de la clasificación (ck19/albúmina o sólo ck19) después de 2 semanas en cultivo. Sólo las células de la celda R2 (FS⁺PI^{bajo}) generaron colonias.

El anticuerpo 5E12 enriquece respecto a células progenitoras hepáticas fetales y adultas humanas. La figura 1 ilustra la tinción de células hepáticas humanas (16^a s.g.) con anticuerpos monoclonales 5E12. Las células incluidas en la celda R2 se tiñeron con 5E12 o anticuerpo monoclonal de control del mismo isotipo.

La tabla 1 y la tabla 2 muestran los resultados de un análisis de dilución limitante de células hepáticas clasificadas 5E12. Las células hepáticas fetales humanas se enriquecieron en células 5E12 positivas usando columnas MACS. Se clasificaron células L R2, 5E12 positivas en placas de 96 pocillos sobre un estroma de BMS-6 de 1 a 500 células por pocillo. Se controló la expresión de albúmina humana mediante ELISA con el fin de detectar colonias de células progenitoras en los pocillos de cultivo.

TABLA 1

Análisis de dilución limitante de células 5E12 positivas clasificadas

El análisis se realizó usando células hepáticas 5E12+ clasificadas con ACDU y 8 puntos de dilución (1, 5, 10, 25, 50, 125, 250, 500 células). Los pocillos positivos para albúmina se detectaron mediante ELISA en el día, día 14, día 21 y día 28.

Día	R2/5E12
D7	1/39
D14	1/50
D21	1/79
D28	1/147

Ejemplo 3

Caracterización del fenotipo de células hepáticas de injerto

5 Se obtuvieron células hepáticas fetales humanas y células hepáticas adultas humanas mantenidas a 4°C. Para realizar una suspensión celular, se trituró el tejido, se resuspendió en solución salina tamponada libre de Ca^{++} y se digirió con colagenasa en presencia de hialuronidasa durante 30 minutos a 37°C. Opcionalmente, las suspensiones celulares se digirieron adicionalmente con tripsina/EDTA durante 20 minutos a 37°C. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de nailon de 70 μm y se resuspendió en IMDM que contenía FBS al 2%, EDTA 2 mM. Se añadió a una
 10 alícuota de células una combinación de dos o más anticuerpos, previamente valorados, como se muestra en las figuras 3 y 4. Se utilizaron controles del mismo isotipo para todas las tinciones. Las células se analizaron mediante citometría de flujo como se describe en los ejemplos 1 y 2.

Los datos muestran (figura 3A) que CD14 no tñe las células LEC (R2, 5E12⁺, HLA^{bajo}). CD54, CD38 y CD34
 15 tñen positivamente las LEC (figuras 3B-3D). Las figuras 4A, 4D, 4G muestran el patrón de tinción típico para LEC. Las figuras 4B, 4E y 4H muestran que la cadherina E, EpCam y CD49f tienen un perfil de tinción similar al de 5E12 en la población R2. Las figuras 4C, 4F y 4I muestran que las poblaciones de LEC seleccionadas cadherina E, EpCam o CD49f son uniformemente positivas para 5E12. Estos datos demuestran que 5E12, cadherina E, EpCam y CD49f se pueden usar de forma intercambiable en la selección de LEC. Se obtuvieron datos similares con tejido hepático adulto
 20 (se muestra en la figura 9). La figura 10 resume estos datos.

Ejemplo 4

Ensayo in vitro para células hepáticas humanas

25 Se muestra que las células hepáticas, incluyendo células progenitoras hepáticas sobreviven y proliferan sobre células estromales usadas como células de alimentación. El cultivo *in vitro* de estas células permite el aislamiento y la caracterización de células progenitoras del hígado. Se usaron dos líneas de células estromales de alimentación diferentes como células de alimentación, BMS-6, una línea celular estromal de médula ósea y FFS-1, un fibroblasto
 30 fetal. Este ensayo se basa en un sistema de cocultivo dependiente de una célula de alimentación y la naturaleza de una célula progenitora hepática que debería ser una célula altamente proliferativa con capacidad de injerto hepático.

Materiales y procedimientos

35 *Preparación de la capa de alimentación y condiciones de cultivo:* se trataron células FFS-1 de fibroblastos murinos (derivadas de STO) con mitomicina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma St. Louis, MO) durante 5 horas y se dispusieron en placas a 5×10^4 células/cm². Se dispusieron en placas estromas de médula ósea murina BMS-6 a $1,6 \times 10^4/\text{cm}^2$. Las capas de alimentación se cultivaron en mezcla 1:1 de medio de Tagle modificado de Dulbecco y medio 199 con FCS al 10%.

40 *Aislamiento de fracciones de células hepáticas usando citometría de flujo:* Se prepararon preparaciones de células hepáticas mediante procedimientos típicos de digestión de tejidos y se analizaron suspensiones de células individuales mediante citometría de flujo multiparamétrica. El aislamiento de subpoblaciones de células hepáticas específicas se llevó a cabo usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACSTM) fabricado por Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Específicamente, el FACS^{Vantage} SE está configurado con láseres de argón, criptón y
 45 helio-neón, que suministran tres fuentes de excitación separadas espacialmente. Esta configuración permite emplear una amplia variedad de muestras fluorescentes comercialmente disponibles para el análisis de características celulares discretas. Los subsistemas especializados incorporados en este instrumento permiten la deposición indexada de células individuales directamente en pocillos individuales de placas de cultivo de tejidos previamente cultivadas con células de capa de alimentación. Los sistemas de adquisición de datos de alta velocidad asistidos por ordenados permiten
 50 la recogida de hasta nueve parámetros de datos independientes para cada célula individual. La capacidad de recoger archivos de datos en modo de lista que comprenden más de un millón de acontecimientos facilita la discriminación de subpoblaciones de muy baja frecuencia. Se recogieron parámetros de datos en el archivo de datos en modo de lista y se analizaron mediante el programa de software Flowjo (www.Treestar.com). Se clasificaron poblaciones puras de células hepáticas directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o de 24 pocillos previamente cultivadas con
 55 células de capa de alimentación.

Protocolo para congelar células: resuspender las células hepáticas en IMDM + FCS al 10% con FCS al 40% durante 5 minutos sobre hielo, a continuación mezclar 1:1 con IMDM + FCS al 10% con DMSO al 15%. Congelar las células a -80°C y luego en nitrógeno líquido.

60 *Protocolo para la infección con hepatitis:* incubar las células hepáticas con suero humano que contenga hepatitis durante una hora sobre hielo, a continuación disponer las células en placas sobre estroma y cultivar las células durante 2 semanas.

65 *Resultados*

Se separaron poblaciones de células hepáticas en R2/5E12⁺ frente a R2/5E12⁻ mediante MACS o clasificación o ambos. A continuación se cultivaron las células durante 2 semanas y entonces se evaluaron las CFC-LBC (célula

formadora de colonia-colonia hepática bipotencial) por la expresión de albúmina y ck19 en las colonias en formación, como se muestra en la figura 8. La frecuencia de colonias hepáticas se calculó mediante dilución limitante usando 3 concentraciones celulares diferentes. Los datos se muestran en la tabla 3 y en la figura 8 (células humanas adultas).

Los ensayos de dilución limitante pueden utilizar una combinación de clasificación celular y ELISA para determinar las diluciones limitantes. Por ejemplo, se clasificaron las células en celdas R2, expresión de 5E12, y expresión de antígenos HLA. Las células clasificadas se diluyeron en placas de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente y se cultivaron *in vitro* durante 14 días, después se analizaron mediante ELISA respecto a la expresión de fetoproteína alfa, albúmina y antitripsina alfa 1.

Ejemplo 5

Modelo in vitro de infección con hepatitis

Se proporciona un procedimiento para la infección *in vitro* de colonias hepáticas por parte de virus de la hepatitis. Se aislaron células hepáticas fetales (18^a s. g.) que contenían células hepáticas progenitoras de injerto y se infectaron con virus de la hepatitis D (VHD) y se cultivaron durante 2 semanas. Las células se cultivaron durante dos semanas, se fijaron y se tiñeron respecto a albúmina (azul APC), citoqueratina 19 (verde FITC) y VHD (rojo PD) para identificar progenitores hepáticos infectados con el virus de la hepatitis D. Los núcleos se tiñeron contratados con Hoechst.

Se incubaron células hepáticas fetales con suero de pacientes infectados con virus VHD. 1 hora más tarde, la muestra se colocó sobre una capa de estroma y se dejó durante dos semanas. El cultivo se fijó y se tiñó con marcadores hepáticos y anti-VHD. Estos procedimientos de cultivo apoyan el crecimiento de células que pueden ser infectadas por virus de la hepatitis.

Ejemplo 6

Expansión ex vivo de poblaciones de células hepáticas de injerto humanas

Se dispusieron en placas células hepáticas de injerto humanas que se habían enriquecido en progenitores de hepatocitos que portaban en fenotipo HLA^{bajo} 5E12+ sobre o en una matriz extracelular (ECM) que proporciona unión, adhesión y proliferación celular. Las células se cultivaron en un medio básico adecuado en combinación con el componente de la matriz laminaria, en presencia de medio de células hepáticas de injerto (LEC). La morfología celular se muestra en la figura 11.

Medio de células hepáticas de injerto (LEC): DMEM/F12 (50:50) con L-glutamina, suero bovino fetal al 10%, dexametasona (10⁻⁷ M), nicotinamida (10 mM), beta-mercaptoetanol (0,05 mM), penicilina/estreptomicina (1X), factor de crecimiento de hepatocitos humano recombinante (40 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (20 ng/ml).

A lo largo del transcurso de la expansión *ex vivo* se evaluó el potencial clonogénico de las células expandidas en un ensayo de cocultivo estromal como se ha descrito anteriormente para las células hepáticas no cultivadas. Las proteínas secretadas hepáticas albúmina, antitripsina alfa 1 o fetoproteína alfa se controlaron mediante ensayos de ELISA de sobrenadantes de cultivo de células en proliferación sobre ECM más medio LEC o en cocultivo estromal.

El potencial de injerto de las células expandidas por cultivo sobre ECM más medio LEC se puede evaluar mediante el trasplante en varios modelos animales adecuados, incluyendo el ratón NOD-SCID o el ratón NOD-SCID/FAH. Un enfoque adicional es inducir la diferenciación de células expandidas como un medio para promover el injerto hepático mejorado o la función de los hepatocitos a largo plazo. Las células expandidas mediante cultivo sobre ECM más medio LEC se pueden exponer a factores de crecimiento adicionales, citocinas o agentes de diferenciación, para promover el estado de diferenciación de un hepatocito maduro. El impacto de tales tratamientos sobre el potencial de injerto de las células expandidas y diferenciadas se puede evaluar mediante el trasplante en modelos animales como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 7

Trasplante de poblaciones de células hepáticas de injerto humanas

Se evaluó el potencial de injerto y de diferenciación de células hepáticas humanas mediante el trasplante en el ratón NOD-SCID. En resumen, se resuspendieron células hepáticas humanas en un tampón de inyección (Matrigel al 50% BD Biosciences, No. 356234, DMEM al 50%) y se colocaron sobre hielo hasta la inyección. Se inyectaron hasta 20 microlitros de las células en tampón de inyección en los hígados de ratones NOD-SCID recién nacidos de 0-48 horas de edad. Se analizó el suero de los ratones a los que se les había inyectado mediante ELISA 5-6 semanas después del trasplante respecto a la presencia de proteínas hepáticas específicas humanas (albúmina, antitripsina alfa 1 o fetoproteína alfa). En la figura 6 se detectó antitripsina alfa 1 humana (AAT) y proteína albúmina (ALB) en el suero de ratones NOD-SCID 6 semanas después del trasplante de células hepáticas totales, células hepáticas totales clasificadas o células R2 5E12⁺ HLA^{bajo} clasificadas. Los niveles de AAT o ALB en ratones a los que se les habían injertado 10.000 células R2 5E12⁺ HLA^{bajo} clasificadas eran mayores o iguales que los de los ratones a los que se

ES 2 292 772 T3

les habían injertado 75.000 células hepáticas totales no clasificadas o 10.000 ó 40.000 células hepáticas totales no clasificadas. La AAT o ALB humanas eran detectables repetidamente en los ratones a los que se les había trasplantado células R2 5E12⁺ HLA^{bajo} clasificadas durante hasta 5 meses, lo que indica un injerto duradero y una diferenciación hepática sostenida. La figura 7 muestra la detección de proteína ALB o CK19 humana en células hepáticas fetales humanas injertadas en el interior del hígado de un ratón NOD-SCID representativo 6 semanas después del trasplante. Los niveles séricos de AAT y ALB detectados mediante análisis de ELISA en el momento del sacrificio se muestran en los paneles inferiores.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición de células hepáticas de injerto de mamíferos aisladas de un tejido hepático, en la que al menos el 80% de las células en dicha composición se **caracterizan** como células vivas, de alta dispersión frontal, autofluorescentes y positivas para un marcador seleccionado del grupo constituido por 5E12, Ep-Cam, CD49f y cadherina E y HLA^{bajo}, comprendiendo dicha composición células capaces de dar lugar a hepatocitos maduros.

2. La composición de células hepáticas de injerto según la reivindicación 1, en la que dichas células son negativas para CD117 y CD14.

3. La composición de células hepáticas de injerto según la reivindicación 1, en la que dichas células son células humanas.

4. La composición de células hepáticas de injerto según la reivindicación 1, en la que dichas células están modificadas genéticamente para comprender un vector de ADN exógeno.

5. Un procedimiento de enriquecimiento para una composición de células hepáticas de injerto de mamíferos aisladas a partir de tejido hepático, en la que al menos el 80% de las células en dicha composición se **caracterizan** como células vivas, de alta dispersión frontal, autofluorescentes y positivas para un marcador seleccionado del grupo constituido por 5E12, Ep-Cam, CD49f y cadherina E y HLA^{bajo}, comprendiendo el procedimiento:

Combinar reactivos que reconocen específicamente un marcador seleccionado del grupo constituido por 5E12, Ep-Cam, CD49f y cadherina E y con un reactivo que reconoce específicamente antígenos de HLA de clase I, con una muestra de células hepáticas;

Seleccionar dicha población de células vivas, de alta dispersión frontal, autofluorescentes;

Seleccionar aquellas células que son positivas para un marcador seleccionado del grupo constituido por 5E12, Ep-Cam, CD49f y cadherina E;

Seleccionar aquellas células que son bajas a negativas para antígenos de HLA de clase I;

Para proporcionar una población enriquecida de células que tienen actividad de injerto hepático.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, que comprende además la etapa de seleccionar las células que son negativas para CD117 y CD14.

7. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que dichas células son células humanas.

8. Una composición de células hepáticas de injerto de mamífero según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento de trasplante en un animal hospedador.

9. Uso de una población de células según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para la introducción en un animal hospedador para proporcionar hepatocitos funcionales y/o células biliares al animal hospedador.

10. La composición según la reivindicación 8 o el uso según la reivindicación 9, en los que dichas células son células humanas.

11. La composición según la reivindicación 8 o el uso según la reivindicación 9, en los que dichos hepatocitos funcionales secretan albúmina o antitripsina alfa 1.

12. La composición según la reivindicación 8 o el uso según la reivindicación 9, en los que dichos hepatocitos funcionales secretan antitripsina alfa 1.

13. La composición según la reivindicación 8 o el uso según la reivindicación 9, en los que dichos hepatocitos funcionales secretan albúmina.

14. La composición de células hepáticas de injerto según la reivindicación 1, en la que dichas células están modificadas genéticamente para comprender un vector de ADN exógeno.

15. Un cultivo celular *in vitro*, que comprende células hepáticas de injerto de mamífero, en el que al menos el 80% de las células en dicho cultivo se **caracterizan** como células vivas, de alta dispersión frontal, autofluorescentes y positivas para un marcador seleccionado del grupo constituido por 5E12, Ep-Cam, CD49f y cadherina E y HLA^{bajo}, con o sin una capa celular de alimentación.

16. El cultivo *in vitro* de la reivindicación 15, en el que dichas células hepáticas de injerto de mamífero son células humanas.

17. Un ratón quimérico inmunodeficiente, un ratón FAH^{-/-} o ratón inmunodeficiente FAH^{-/-} que comprende:

Hepatocitos y/o células biliares funcionales de regeneración generadas a partir de una composición sustancialmente puras de células hepáticas de injerto de mamífero aisladas a partir de tejido hepático, en el que al menos el 80% de las células en dicha composición se **caracterizan** como células vivas, de alta dispersión frontal, autofluorescentes y positivas para un marcador seleccionado del grupo constituido por 5E12, Ep-Cam, CD49f y cadherina E y HLA^{bajo}.

18. El ratón quimérico de la reivindicación 17, en el que dichas células hepáticas de injerto de mamífero son células humanas.

19. Un procedimiento para la detección selectiva de secuencias genéticas específicamente expresadas en células hepáticas de injerto de mamífero, comprendiendo el procedimiento:

Aislar ARN de una población de células según la reivindicación 1, un cultivo *in vitro* según la reivindicación 15 o un ratón quimérico según la reivindicación 17,

Generar una sonda a partir de dicho ARN,

Realizar una detección selectiva en una población de ácidos nucleicos para la hibridación a dicha sonda.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, que comprende además una comparación de la hibridación obtenida entre dichas células hepáticas de injerto y una segunda población de células distinta.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que dicha población de ácidos nucleicos está representada en un ensayo.

22. Un procedimiento para la detección selectiva de agentes que afectan a viabilidad, crecimiento, función metabólica o diferenciación de células hepáticas de injerto de mamífero, comprendiendo el procedimiento:

Poner en contacto una población de células según la reivindicación 1, un cultivo *in vitro* según la reivindicación 15 o un ratón quimérico según la reivindicación 17 y

Determinar el efecto de dicho agente sobre la viabilidad, crecimiento, función metabólica o diferenciación de dichas células hepáticas de injerto.

23. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho agente es un fármaco del que se sospecha que tiene toxicidad para hepatocitos humanos.

24. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho agente es un virus de la hepatitis humano.

25. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho agente es una vacuna para el virus de la hepatitis humano.

26. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho agente es un agente antiviral.

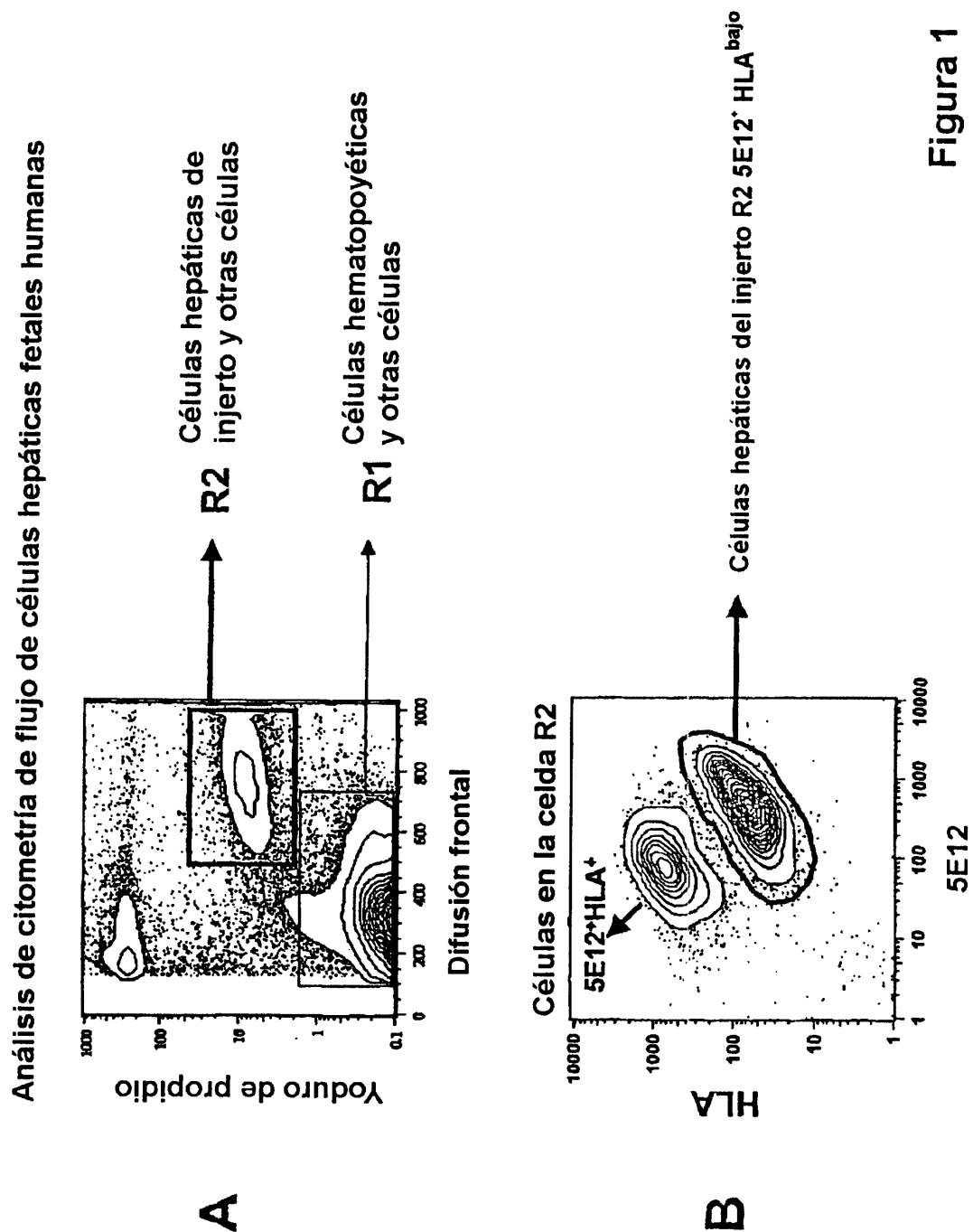


Figura 1

Heterogeneidad de la población hepática fetal humana

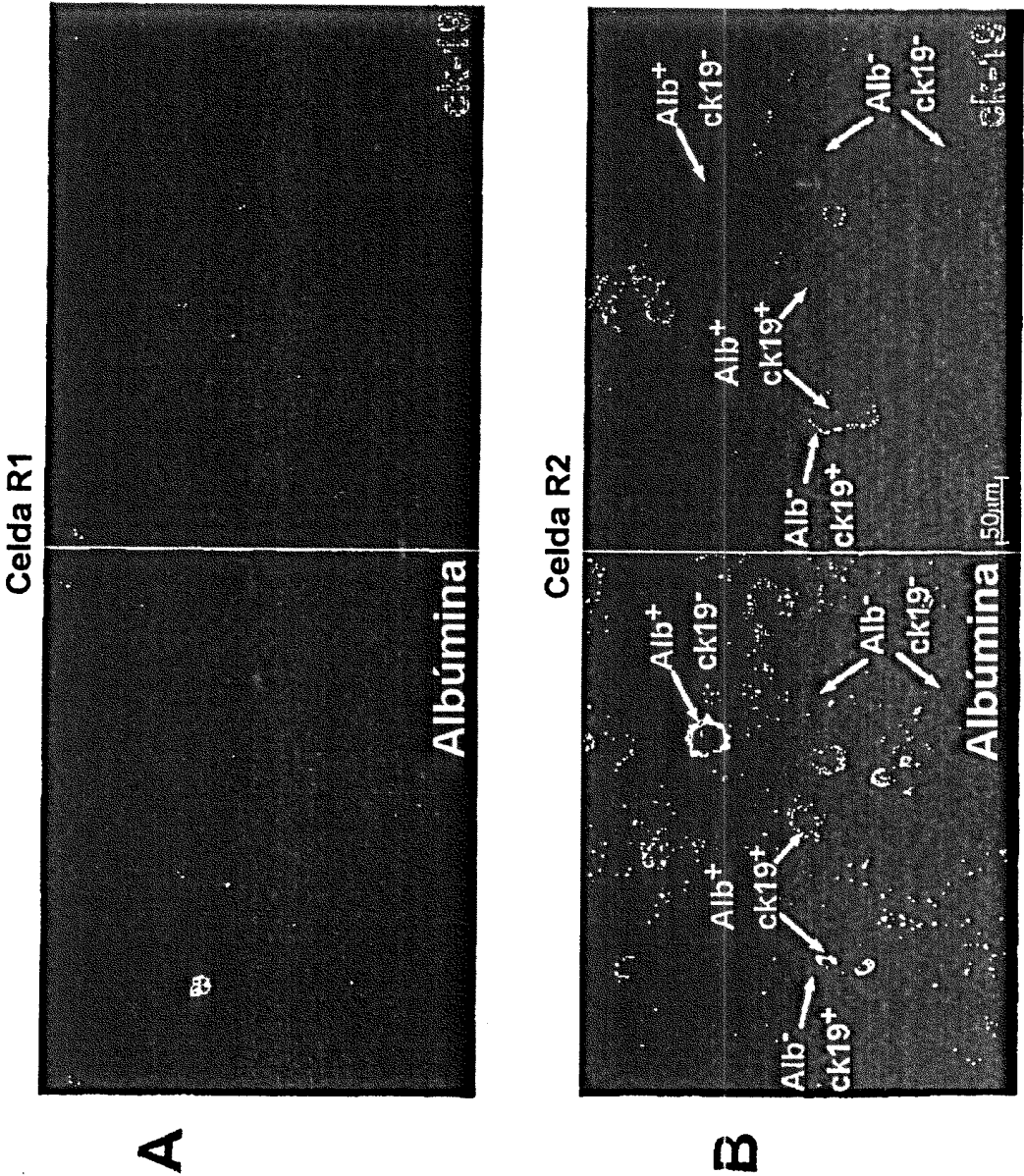


Figura 2

Análisis fenotípico de células hepáticas fetales humanas

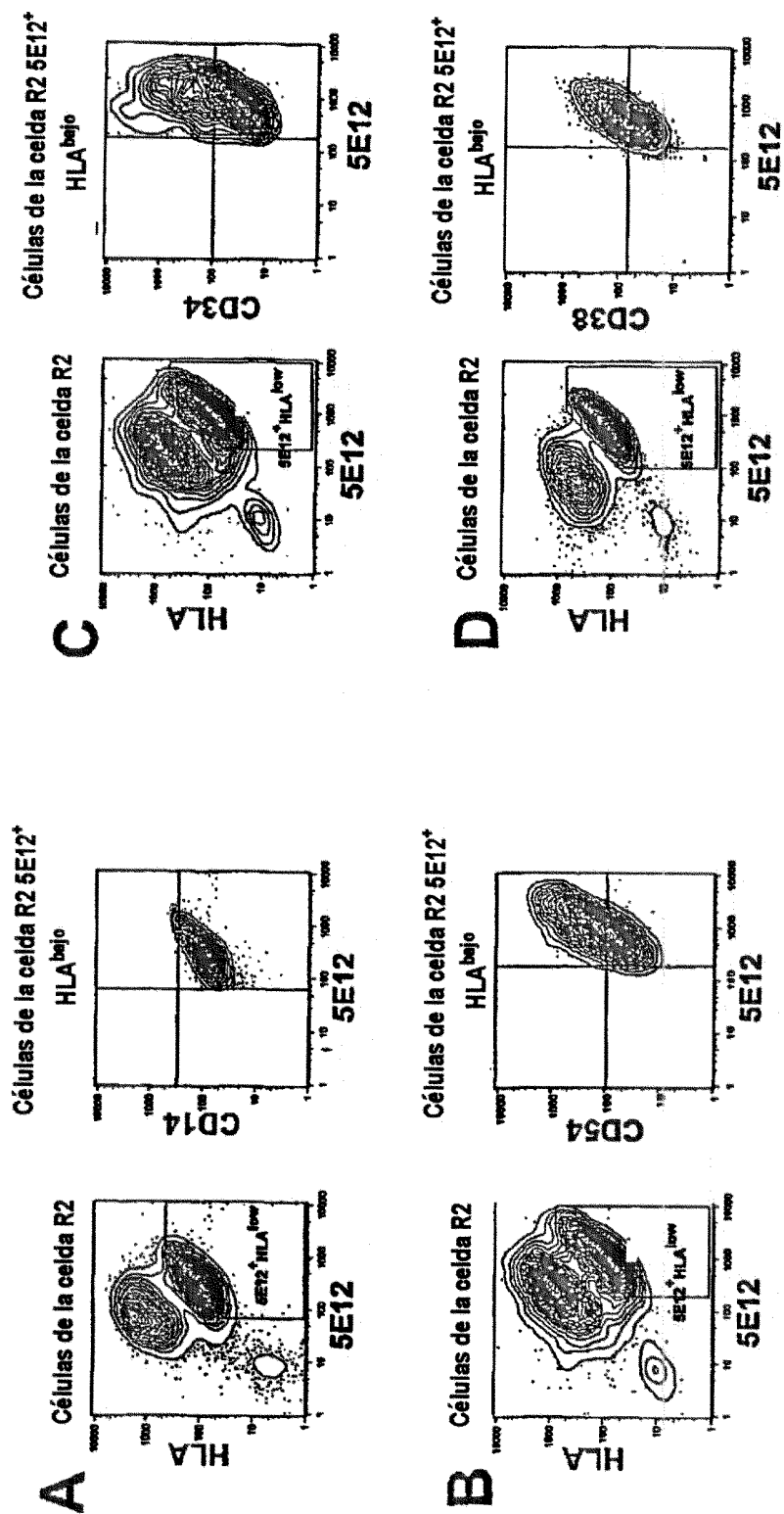


Figura 3

Hígado fetal humano

Cadherina E⁺ HLA^{bajo} o EpCAM⁺ HL^{bajo} o CD49f⁺

HLA^{bajo} reconocen la misma población que 5E12⁺ HLA^{bajo}

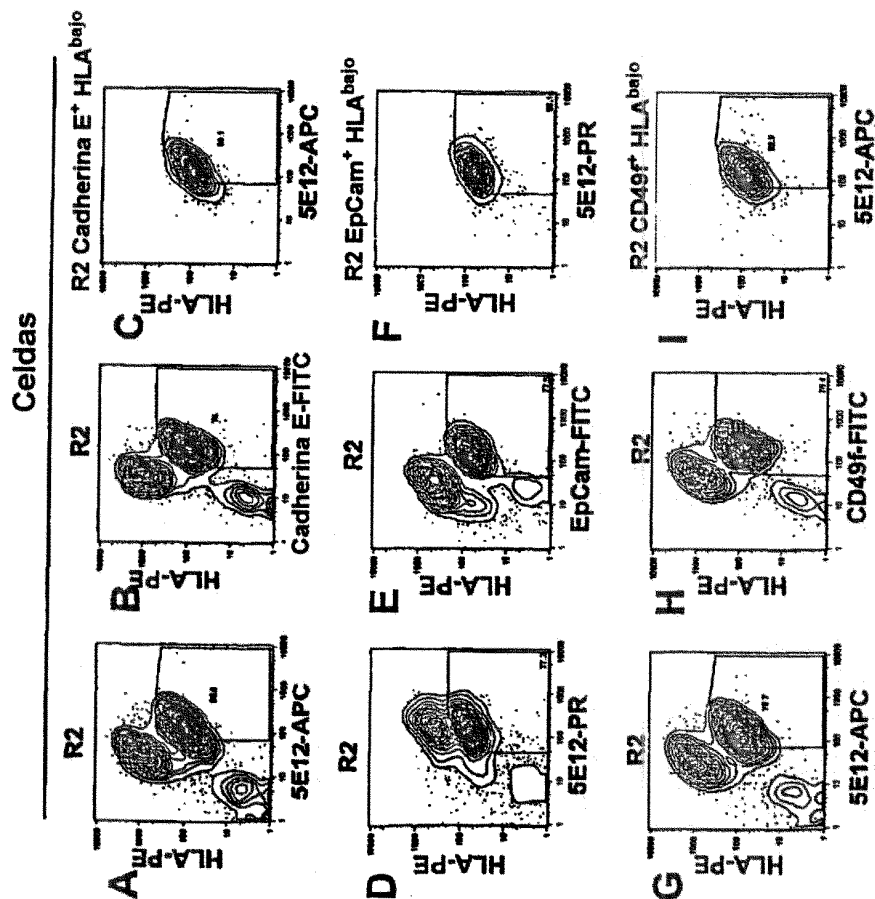


Figura 4

Colonias de R2 5E12⁺ HLA^{bajo} después de 2 semanas en cultivo

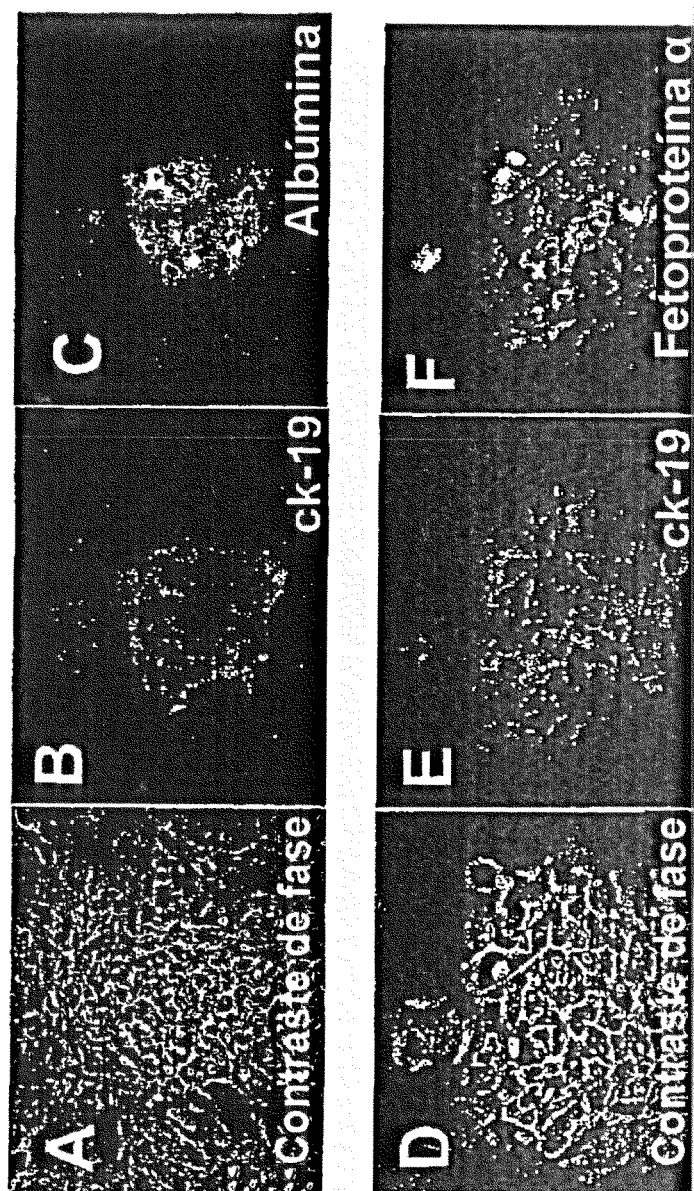


Figura 5

Injerto de progenitores hepáticos R2 5E12⁺ HLA^{bajo}

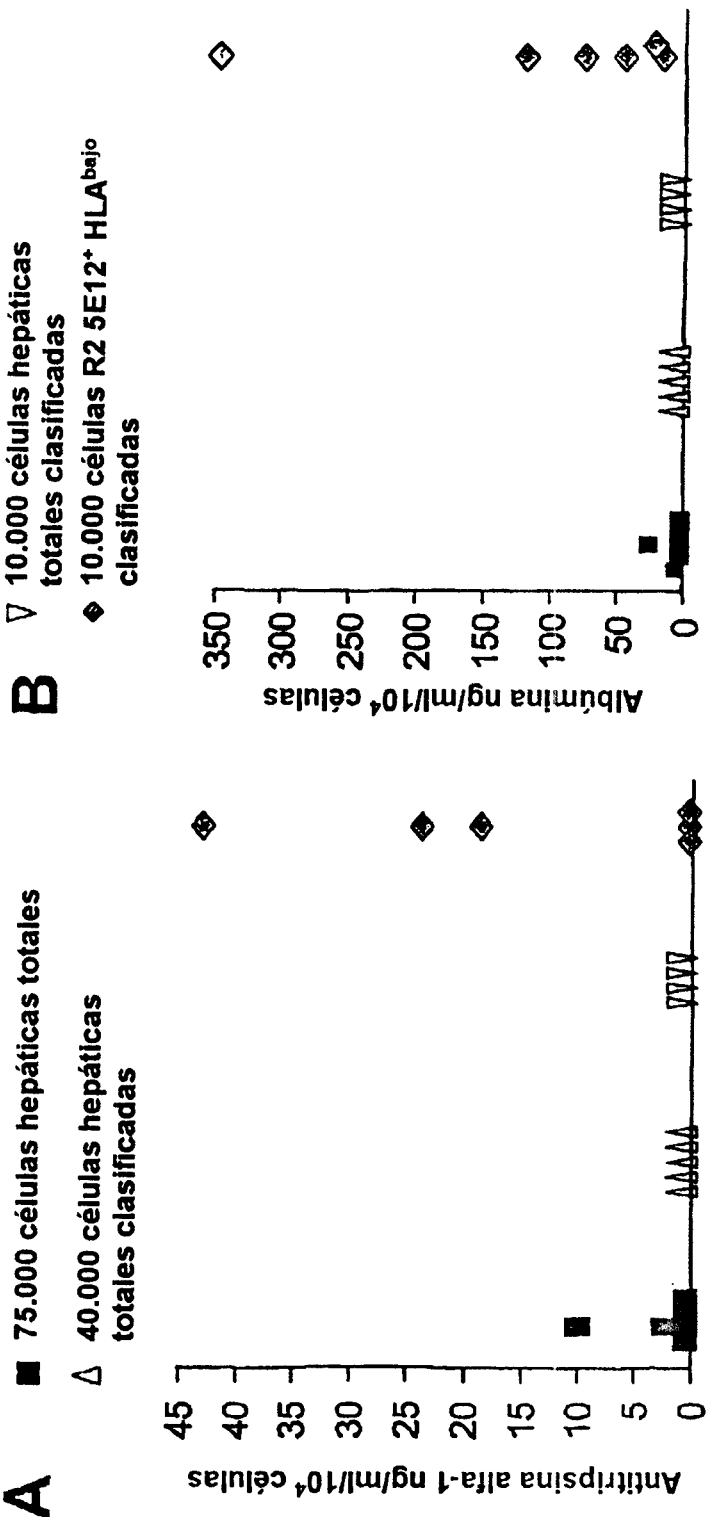


Figura 6

Expresión huALB continua de células de injerto huFL en hígados NOD/SCID

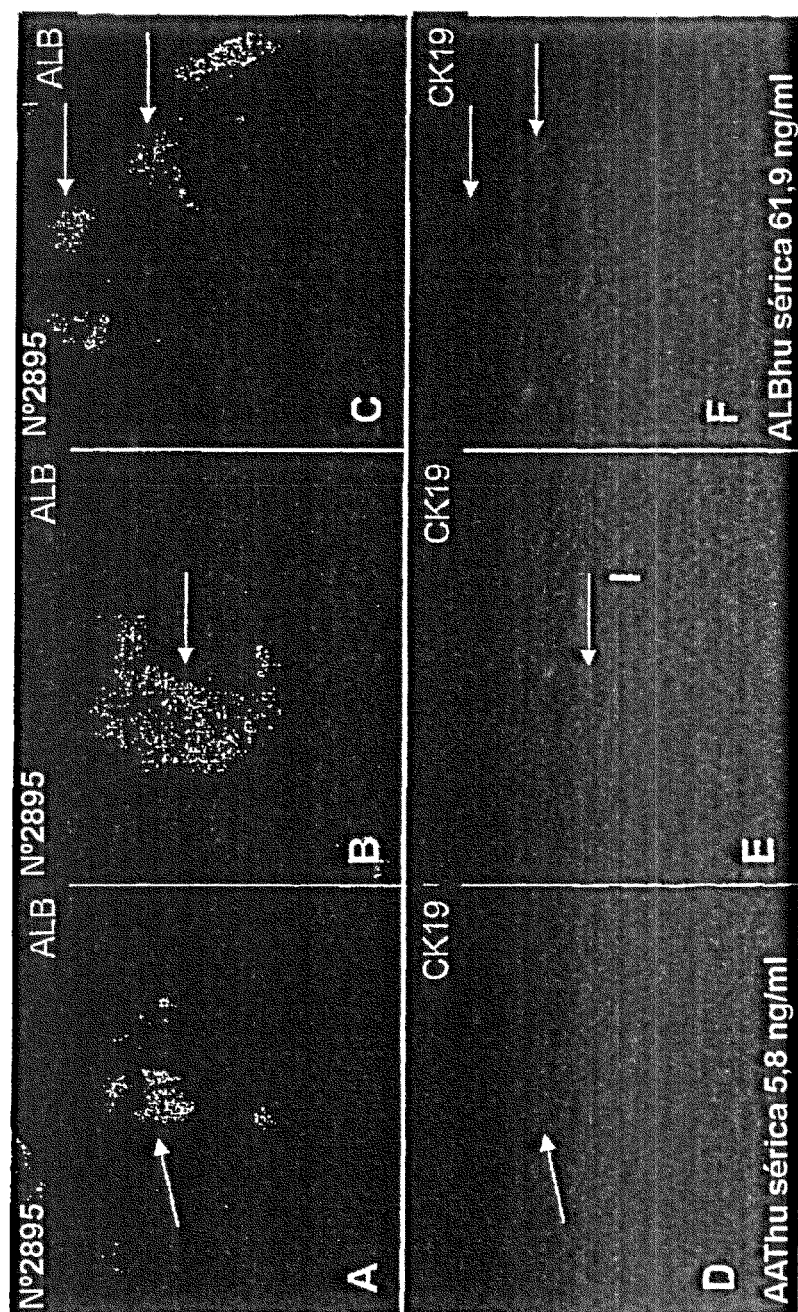
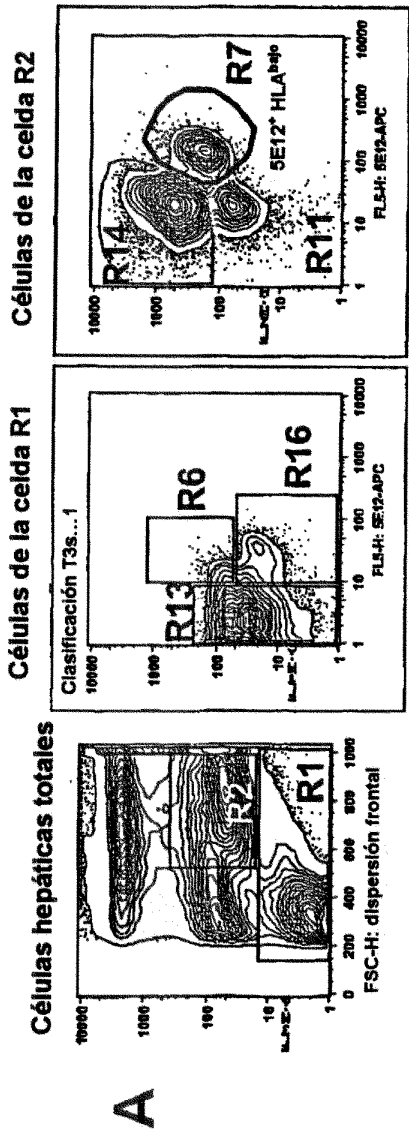
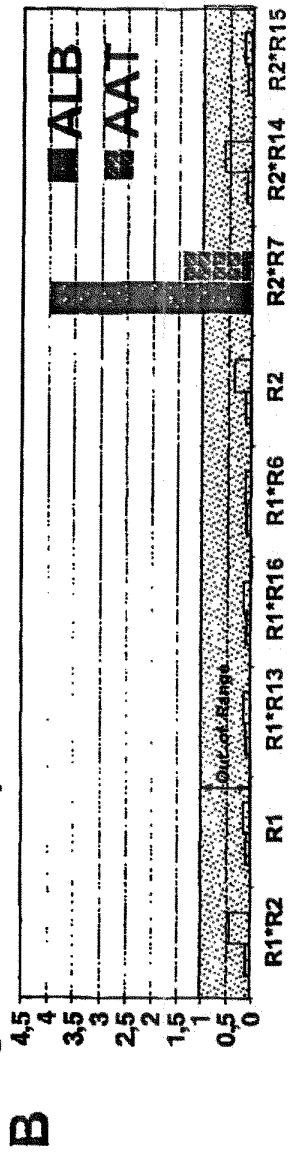


Figura 7

Aislamiento de subconjuntos de poblaciones de hígado humano adulto

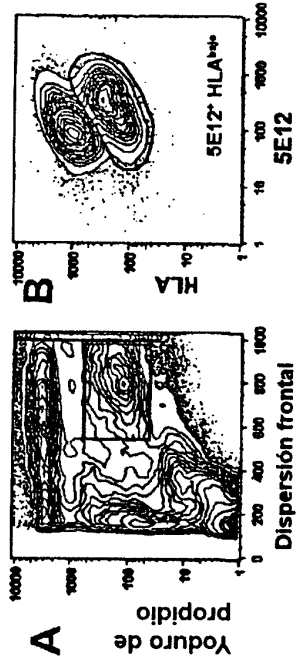


ng/ml ELISA de proteínas séricas humanas secretadas



5.000 células clasificadas por población, 2 semanas con BMS6 Figura 8

Análisis fenotípico de células hepáticas humanas adultas



R2 5E12⁺ HLA bajo

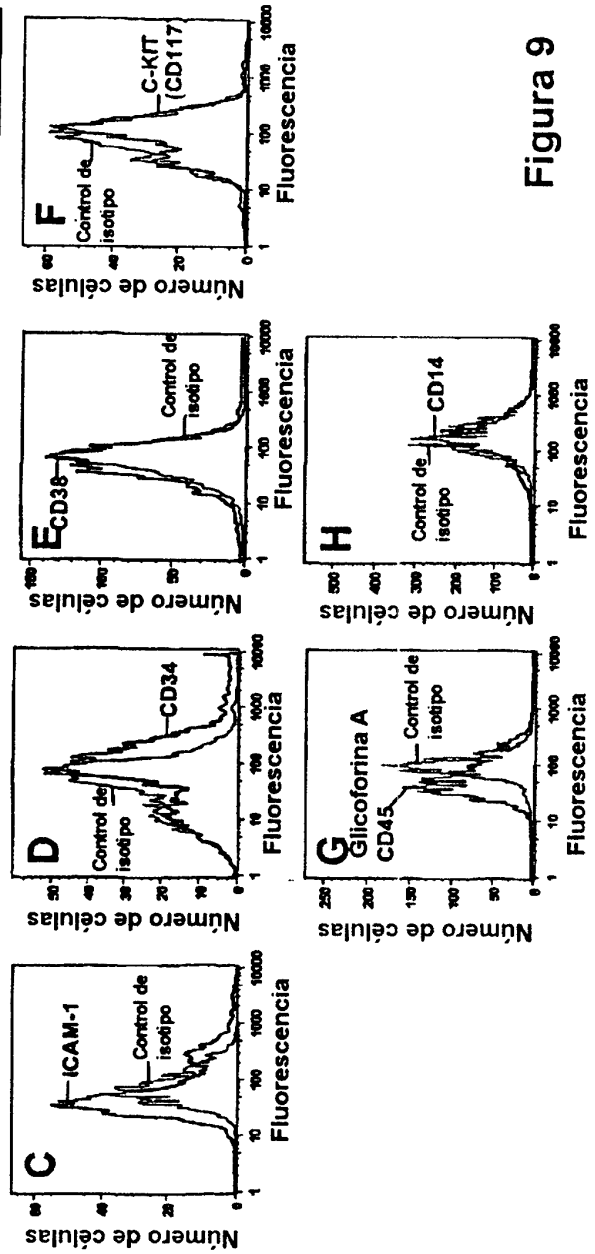


Figura 9

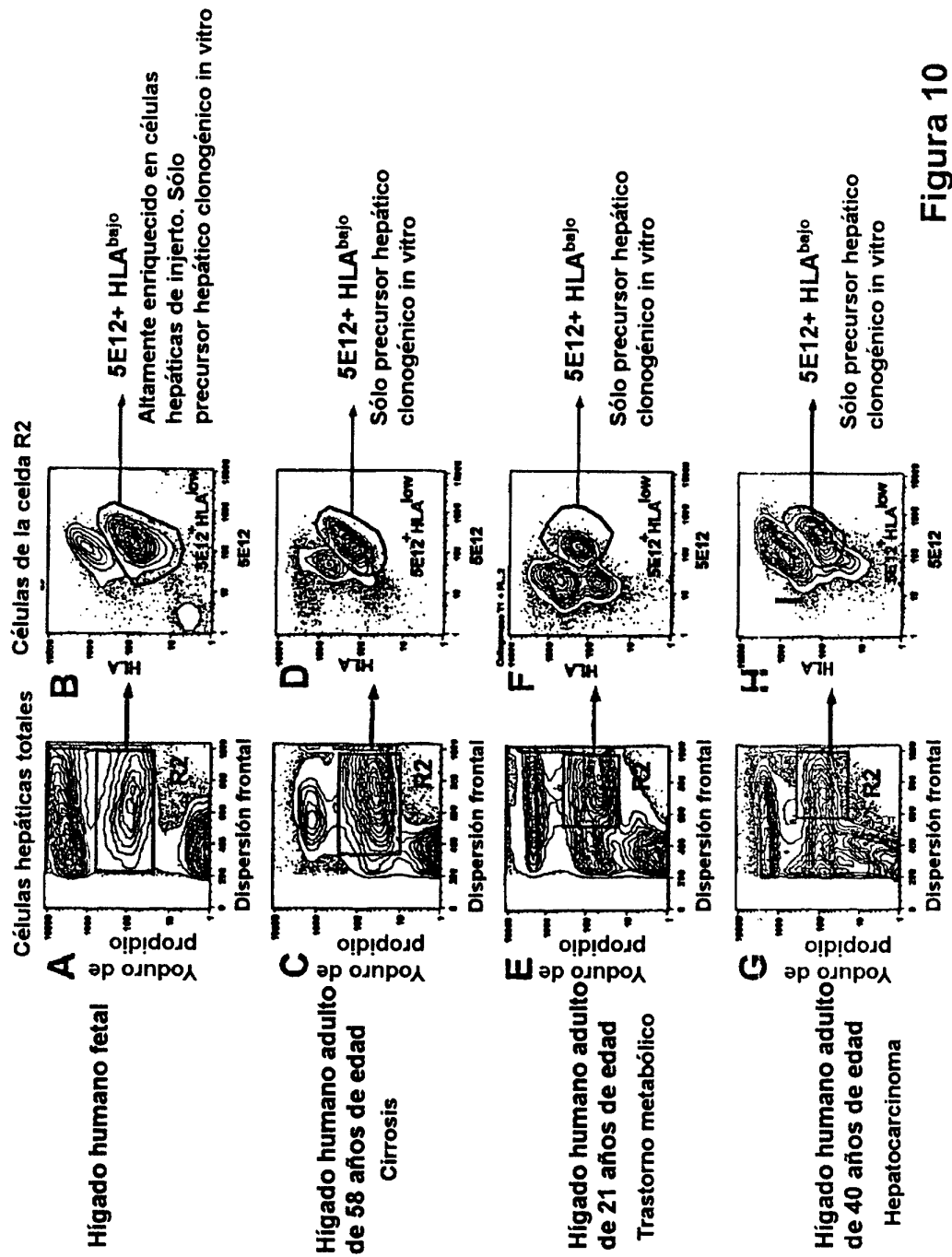


Figura 10

**Expansión in vitro de las células hepáticas
de injerto en cultivo exento de estroma**

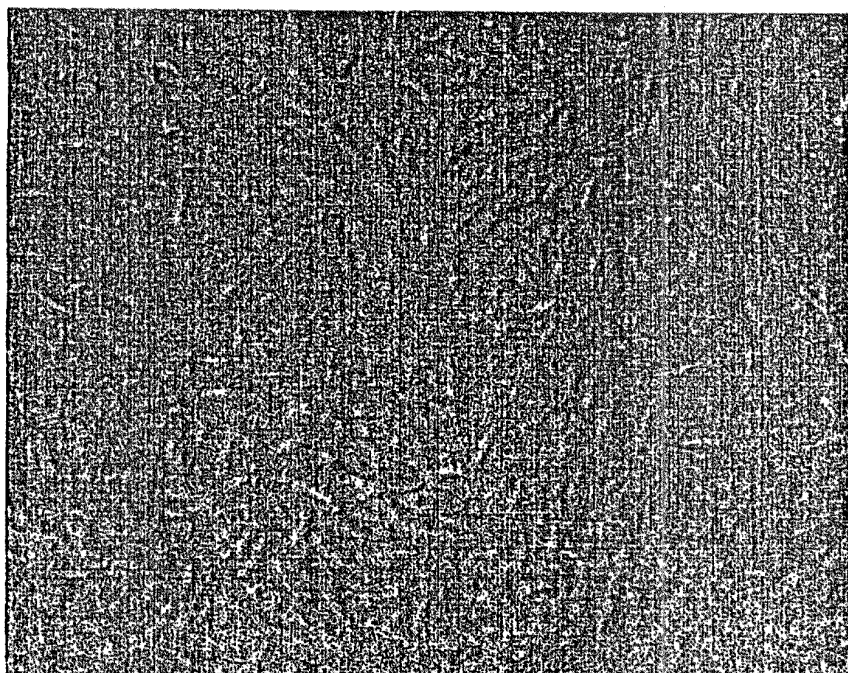


Figura 11

Análisis restrictivo de dilución de células hepáticas humanas del Injerto (LEC) después de la clasificación

	ALB	AAT	AFP
R1 y R2	1/14,975	1/374,377	0
R2	1/308	1/249	1/940
R2 5E12*	1/20	1/28	1/74
R2 5E12*	1/1,546	1/816	1/7,488
R2 5E12* HLA ^{bajo}	1/7	1/4	1/58
R2 5E12* HLA*	1/2,135	1/1,053	1/374,378

DIFERENCIA MULTIPLICATIVA EN LA ACTIVIDAD DE LEC

	ALB Frente a R2	AAT Frente a R2	AFP Frente a R2
R2	N/A	N/A	N/A
R2 5E12*	15,4	8,9	12,7
R2 5E12*	-5	-3,8	-7,9
R2 5E12* HLA ^{bajo}	44	62,2	15,9
R2 5E12* HLA*	-6,9	-4,2	-388

Tabla 2

Detección selectiva de LEC mediante inmunotinción (ck19+/Alb+)

TEJIDO N°	MUESTRA	FRECUENCIA DE LAS COLONIAS	DETERMINACIÓN MULTIPLO Frente al total Frente a 5E12-
MUESTRA A			
Tejido Fresco	Células totales	1/1,045	
	5E12 POST MACS	1/218	4,8
MUESTRA B			
Tejido Fresco	TOTAL CELLS	1/1487	
	5E12 POST MACS	1/291,6	5,1
MUESTRA C			
Tejido Fresco	Células totales	1/306	
	5E12 POST MACS	1/57,3	5,3
Células clasificadas	R2*5E12-	1/711	-2,3
	R2*5E12+	1/96,1	3,2
	R2*5E12+ POST MACS	1/80,0	3,8
MUESTRA D			
Células clasificadas		1/691	
	R2*5E12-	1/21413	-30,9
Tejido Fresco	R2*5E12+	1/2000,0	-2,8
			10,7

Tabla 3