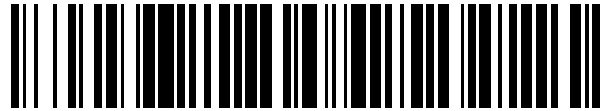


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 359 874**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2006 E 06819033 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **10.09.2014 EP 1969118**

54 Título: **Células madre hepáticas aisladas**

30 Prioridad:

21.12.2005 EP 05447286

17.10.2006 WO PCT/EP2006/010014

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

12.12.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN (100.0%)
PLACE DE L'UNIVERSITÉ 1
1348 LOUVAIN-LA-NEUVE, BE**

72 Inventor/es:

**SOKAL, ETIENNE y
NAJIMI, MUSTAPHA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 359 874 T5

Descripción

Células madre hepáticas aisladas

5 Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a células progenitoras o células madre hepáticas aisladas, originados a partir de hígado adulto, y a su uso en medicina, hepatología, errores congénitos del metabolismo hepático, trasplante, enfermedades infecciosas e insuficiencia hepática. La presente invención se refiere también a procedimientos de aislamiento de estas células y a su uso para trasplante, dispositivos de órganos artificiales, toxicología y farmacología.

Antecedentes de la invención

15 El hígado es un órgano clave que efectúa muchas funciones vitales tales como homeostasis de glucosa, detoxificación de xenobióticos o síntesis de macromoléculas. Por tanto, el deterioro de una de las múltiples funciones hepáticas podría tener un impacto drástico sobre la salud. La incidencia mundial de enfermedades hepáticas agudas o crónicas establece a estas patologías entre la 5ª y 9ª causa de muerte, según la Organización Mundial de la Salud. Hasta ahora, el único tratamiento curativo para enfermedades hepáticas terminales sigue siendo el trasplante de hígado. El desenlace para pacientes que se sometieron a sustitución hepática quirúrgica es bastante bueno, con más de un 95% de recuperación. Sin embargo, a pesar de las nuevas técnicas quirúrgicas que incluyen trasplante parcial de hígado y de pariente vivo, la creciente escasez de órganos conduce a una mayor mortalidad en la lista de espera. Por lo tanto, es un objetivo importante en la investigación de la medicina de trasplantes la demostración del uso potencial de células hepáticas en regeneración hepática y el tratamiento de enfermedades hepáticas.

20 El trasplante de células hepáticas (TCH) es un procedimiento emergente que implica la infusión de una suspensión de células hepáticas en el sistema portal del receptor. Está orientado a la recuperación de la función hepática del receptor como consecuencia del injerto y repoblación del parénquima enfermo. El TCH se validó por primera vez en modelos animales en los que se había demostrado que los hepatocitos singénicos podían sobrevivir indefinidamente y ser capaces de corregir diversos defectos enzimáticos (para revisión, véase Najimi y Sokal. 2005. Minerva Pediatr. 57 (5): 243-57).

30 En seres humanos, los estudios anteriores se habían diseñado para el tratamiento de insuficiencia hepática aguda. Estos estudios alentaron a los facultativos a extender el TCH a indicaciones adicionales y hasta ahora se han notificado al menos 30 casos en todo el mundo para diversos defectos (Strom y col. 1997. Transplant Proc. 29 (4): 2103-6). En el campo específico de las enfermedades metabólicas, 13 casos notificaron el uso de hepatocitos para el tratamiento, entre otros, del síndrome de Crigler-Najjar de tipo I, defectos del ciclo de la urea o enfermedades raras tales como, por ejemplo, enfermedad de Refsum infantil. Estos estudios demostraron el injerto de los hepatocitos en el parénquima y en consecuencia una mejora del estado del paciente hasta 18 meses después del trasplante.

40 Sin embargo, debido a que el suministro de hepatocitos humanos maduros para trasplantes es aún limitado, de hecho más o menos tan limitado como la disponibilidad del hígado completo, la investigación está también orientada a obtener células transplantables de otras fuentes, tales como células progenitoras y células madre, por ejemplo de origen embrionario o adulto, que podrían ser multiplicables, por ejemplo *in vitro*, y ser capaces de diferenciarse en hepatocitos maduros funcionales, especialmente *in vivo* después del trasplante. En consecuencia, hay una gran necesidad de desarrollar nuevos medios que sean útiles en el tratamiento de diversas enfermedades o afecciones asociadas a enfermedades asociadas al hígado, particularmente dados los tratamientos inadecuados disponibles actualmente para la mayoría de estos trastornos.

50 Históricamente, se creía que los células madre embrionarias (CME) estaban implicados solo en la organogénesis, debido a su división clonal ilimitada observada y a la diferenciación pluripotente en células derivadas de tejidos completos. Por otro lado, los procesos de regeneración en órganos adultos estaban típicamente adscritos a las células progenitoras adultas. No obstante, se ha revisado esta teoría a la vista del descubrimiento de células madre en órganos adultos que expresan marcadores embrionarios conocidos. Por tanto, las caracterizaciones de células madre y células progenitoras están basadas ahora no solo en el proceso de desarrollo (embrionario frente a adulto), sino también en la presencia de marcadores celulares específicos en los mismos. Es más, la expresión de marcadores celulares, tales como proteínas de membrana o factores de transcripción, puede variar a lo largo de las

5 rutas de diferenciación y reflejar diversos estímulos (por ejemplo, estímulos ambientales) y necesidades celulares. A menudo, se observa que, en el transcurso de un proceso de diferenciación, una célula madre dejará gradualmente de exhibir marcadores indicativos de su pluripotencia, por ejemplo Oct-4, y será capaz de expresar marcadores atribuibles a etapas posteriores, por ejemplo, marcadores de un linaje específico. Como ejemplo no limitante, puede perderse progresivamente Oct-4 durante la maduración y, por otro lado, las células que entran en el linaje endodérmico pueden empezar a expresar α -fetoproteína.

10 Con respecto a la regeneración hepática mediante trasplante de células, pueden considerarse varios tipos de célula fuente posibles. Por ejemplo, se esperaría que los CE fueran capaces de regenerar cualquier órgano debido a su pluripotencia. Es más, este camino está extensamente explorado en la técnica. Sin embargo, los CE tienden a generar crecimiento tumoral cuando se introducen en cualquier tejido distinto de útero. Por lo tanto, su uso *in vivo* continúa limitado por el riesgo de desviación carcinogénica. Incluso una diferenciación exitosa *in vitro* anterior de los CE podría no ser suficientemente segura para considerar la inoculación humana.

15 Sería una alternativa más segura el uso de células progenitoras adultas que, al contrario que los CE, tienden a presentar una capacidad limitada de división clonal y su diferenciación da lugar a células derivadas con destinos más limitados. En el hígado, se han descrito progenitoras adultas tales como células ovas (precursoras de colangiocitos y hepatocitos) o células de tipo hepatocito pequeñas. Sin embargo, su uso médico se hace difícil por su escasez en órganos adultos normales.

20 Por consiguiente, representarían una gran mejora en las fuentes de trasplante de células madre adultas que mostraran capacidad de división clonal con riesgo reducido o ausente de desviación carcinogénica. Se están evaluando actualmente varios tipos de células madre adultas en estudios de trasplante de células hepáticas. Por ejemplo, se están estudiando mesenquimales células madre mesenquimales (CM) de sangre periférica o de cordón umbilical debido a su capacidad de transdiferenciarse en células maduras adicionales de otro linaje. Además, las células madre hematopoyéticas de médula se han estudiado también en términos de potencias de regeneración hepática.

30 Aunque la caracterización *in vitro* de células madre adultos sigue presentando dificultades, se acepta actualmente en el campo que dicha caracterización puede implicar ventajosamente detectar (i) marcadores de su origen o linaje embrionario (especialmente mesodérmico, endodérmico, ectodérmico o hematopoyético), (ii) la expresión de marcadores que reflejen el nivel de diferenciación y por tanto en cierta medida predictivos de las diferentes progenies posibles, y (iii) el destino *in vitro* o *in vivo* después de la diferenciación. Por consiguiente, la caracterización y distinción de células madre adultas obtenibles a partir de hígado normal puede implicar ventajosamente la evaluación de la presencia o ausencia de (i) marcadores que reflejen el origen embrionario complejo de este órgano, (ii) marcadores de diferenciación (por ejemplo, de la presencia de albúmina) y (iii) al menos un marcador indicativo del destino de la célula madre.

40 Según el conocimiento actual, el hígado se origina principalmente a partir del endodermo y los hepatocitos son parte del linaje endodérmico. Sin embargo, la formación de células hepáticas implica también la interacción entre el epitelio endodérmico y el mesodermo cardiogénico. Además, en el desarrollo fetal, la hematopoyesis tiene lugar también en el hígado. Dada esta interacción durante el desarrollo, no hay que tener prejuicios cuando se contemplan los marcadores presentes en células madre hepáticas, puesto que podrían esperarse linajes endodérmico, mesodérmico y/o hematopoyético.

45 Cuando se valora el nivel de diferenciación y asignación de tipo celular, pueden evaluarse diferentes marcadores celulares, como se lleva a cabo adicionalmente en esta divulgación. Por ejemplo, durante el proceso de diferenciación de células pueden reducirse o desaparecer algunos marcadores, otros pueden aumentar u obtenerse y aún otros pueden recorrer todo el camino hasta una célula especializada y funcional. A modo de ejemplo no limitante, durante la organogénesis, concretamente durante la vida fetal, se considera que los hepatoblastos son los progenitores comunes de las células que forman el parénquima (especialmente hepatocitos y células biliares) y que expresan entre otros citoqueratina 7 (CK-7) así como CK-19, albúmina y α -fetoproteína. En el hígado adulto, un progenitor común conocido para hepatocitos y células biliares es la célula oval, que expresa CK-19, albúmina y α -fetoproteína. Después de la diferenciación en células biliares, se mantiene la expresión de CK-19 y α -fetoproteína, mientras que la expresión de CK-7 (considerada un rasgo de células más inmaduras) tiende a cesar. Por otro lado, los hepatocitos mantienen la expresión de α -fetoproteína y albúmina, pero no muestran expresión de las CK anteriores. También a partir de este ejemplo, se deduce que la caracterización de las células madre puede ser compleja, pero que puede usarse ventajosamente la valoración de los marcadores para indicar el tipo o propiedades de las células.

El documento WO 03/000848 da a conocer el aislamiento de células progenitoras hepáticas humanas a partir de hígado adulto humano. Además de expresar marcadores de hepatocitos, estas células expresan también el marcador biliar CK-19. El documento US 2005/074876 da a conocer un procedimiento para aislar células progenitoras hepáticas fetales, que implica pases repetidos, siendo dichas células progenitoras capaces de diferenciarse en hepatocitos y células de conducto biliar. El documento WO 2006/126236, que forma parte del estado de la técnica según el Art. 54(3) y (4) de la EPC1973, da a conocer el aislamiento de una población de células madre a partir de hígado humano. Estas células no muestran expresión de α -actina de músculo liso (ASMA).

Al entender de los inventores, los estudios previos describían el aislamiento de células progenitoras a partir de hígado adulto normal, mostrando dichas células más de un destino celular. No se ha descrito una línea de células madre hepáticas adultas capaz de amplificación *in vitro* y diferenciación *in vivo* en hepatocitos, y preferiblemente con solo el destino celular de hepatocito. Además, los estudios previos usaban técnicas complicadas, tales como FACS, medios suplementados con calcio o gradientes de densidad específica para aislar sus células madre hepáticas.

En consecuencia, es un objeto de la invención proporcionar células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto novedosos con propiedades mejoradas y particularmente útiles, por ejemplo, en trasplante de células hepáticas. La invención también pretende proporcionar un procedimiento sencillo para aislar dichas células.

Resumen de la invención

La presente memoria descriptiva describe células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto, líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos, obtenidos a partir de un tejido hepático normal. Se describen también en la presente memoria descriptiva procedimientos de aislamiento de estas células, su cultivo, caracterización antes y después de la diferenciación y su uso para trasplante, modelos animales de enfermedad humana, toxicología y farmacología.

La presente invención proporciona la materia en cuestión como se expone en todos y cada uno de los puntos (i) a (xxxiv) a continuación:

(i) Una célula progenitora o célula madre humana aislada originada a partir de hígado adulto humano caracterizado porque:

- (a) expresa el marcador mesenquimal α -actina de músculo liso (ASMA),
- (b) expresa el marcador de hepatocito albúmina (ALB), y
- (c) es negativo para citoqueratina 19 (CK-19).

(ii) La célula progenitora o célula madre humana aislada como se expone en (i) anteriormente, caracterizado porque:

- (a) expresa los marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina y ASMA,
- (b) expresa ALB, y
- (c) es negativa de CK-19.

(iii) La célula progenitora o célula madre humana aislada como se expone en (i) o (ii) anteriormente, que expresa adicionalmente CYP3A4.

(iv) La célula progenitora o célula madre humana aislada como se expone en una cualquiera de (i) a (iii) anteriormente, que expresa adicionalmente uno o más marcadores hepáticos o de hepatocitos distintos elegidos de CD29, α -fetoproteína (AFP), α -1-antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2.

(v) La célula progenitora o célula madre humana aislada como se expone en (iv) anteriormente, que expresa CD29, AFP, α -1-antitripsina y transportador MRP2.

(vi) La célula progenitora o célula madre humano aislado como se expone en (i) anteriormente, que es positivo para CD90, CD29 y CD44, que es positivo para albúmina, positivo para vimentina y positivo para α -actina de músculo liso (ASMA), y que es negativo para CD45, CD34, CD117 y CK-19.

(vii) La célula progenitora o célula madre humana aislada como se expone en una cualquiera de (i) a (vi) anteriormente, en la que dicha célula tiene morfología de tipo mesenquimal, que implica cualquiera o todos de crecimiento en monocapas, forma aplanada, citoplasma amplio y núcleos ovoides con uno o dos nucleolos.

(viii) La célula progenitora o célula madre humana aislada como se expone en una cualquiera de (i) a (vii) anteriormente, en la que dicha célula puede diferenciarse en hepatocitos o células de tipo hepatocito y no se diferencia en tipos de célula mesodérmicos.

5 (ix) Una línea celular o una población celular que comprende la célula progenitora o célula madre hepática humana aislada como se expone en una cualquiera de (i) a (viii) anteriormente.

10 (x) Una célula progenitora o célula madre hepática adulta humana aislada y una línea celular como se depositó el 20 de febrero de 2006 según el Tratado de Budapest en la Colección Coordinada de Microorganismos Belga (BCCM) con número de acceso LMBP 6452CB y las sublíneas de la misma, incluyendo sublíneas clonales.

15 (xi) Un procedimiento para la obtención de una célula progenitora o célula madre humana aislada o una población celular que comprende dicha célula progenitora o célula madre, comprendiendo el procedimiento: (a) disociar, preferiblemente mediante un procedimiento de colagenasa en dos etapas, un hígado adulto o una parte del mismo de un sujeto humano, formando una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo; (b) sembrar la población de células primarias sobre sustrato recubierto con colágeno de tipo I en medio E de Williams que comprende preferiblemente 10% (v/v) de suero de ternera fetal, EGF preferiblemente 25 ng/ml, insulina preferiblemente 10 µg/ml y dexametasona preferiblemente 1 µM; (c) permitir la adherencia de las células de la población celular primaria a dicho sustrato durante 24 horas y después de ello cambiar el medio por medio reciente que tiene la composición de (b); (d) cultivar las células en dicho medio de (c) durante 2 semanas, preferiblemente 15 días; (e) cambiar el medio por DMEM rico en glucosa que comprende preferiblemente 10% de FCS, y cultivar adicionalmente las células, con lo que las células progenitoras o células madre de la invención emergen y proliferan; (f) permitir a las células volverse aproximadamente un 70% confluentes y someter a pases las células al menos una vez y preferiblemente al menos dos veces, plantándose las células en el sustrato como en (b) y cultivándose en un medio como en (e).

25 (xii) Una célula progenitora o célula madre hepática adulta humana como se expone en (i) anteriormente, una línea celular de la misma y/o una población celular que comprende la misma, obtenible u obtenido directamente usando el procedimiento expuesto en (xi) anteriormente.

30 (xiii) Una composición que comprende la célula progenitora o célula madre hepática humana como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, opcionalmente en la que dicha composición es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

35 (xiv) Las células progenitoras o células madre hepáticas humanas como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en una cualquier de (ix), (x) o (xii) anteriormente, para uso en terapia, preferiblemente para uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas, más preferiblemente para uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas que incluyen fenilcetonuria y otras aminoacidopatías, hemofilia y otras deficiencias de factor de coagulación, hipercolesterolemia familiar y otros trastornos del metabolismo lipídico, trastornos del ciclo de la urea, glucogenosis, galactosemia, fructosemia, tirosinemia, deficiencias del metabolismo de proteínas y carbohidratos, aciduria orgánica, enfermedades mitocondriales, trastornos peroxisómicos y lisosómicos, anormalidades de la síntesis de proteínas, defectos de transportadores de células hepáticas, defecto de glucosilación, hepatitis, cirrosis, errores congénitos del metabolismo, insuficiencia hepática aguda, infecciones hepáticas agudas, toxicidad química aguda, insuficiencia hepática crónica, insuficiencia hepática fulminante, colangitis, cirrosis biliar, síndrome de Alagille, deficiencia de α -1-antitripsina, hepatitis autoinmune, atresia biliar, cáncer de hígado, enfermedad quística del hígado, esteatosis hepática, galactosemia, cálculos biliares, síndrome de Gilbert, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y otras infecciones víricas de hepatitis, porfiria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, tirosinemia, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo 1 o enfermedad de Wilson.

40 (xv) Un procedimiento de realización de un ensayo de toxicidad *in vitro* que comprende: exponer la célula progenitora o célula madre hepática humana como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, a un agente de ensayo, y observar al menos un efecto, si lo hubiera, del agente de ensayo sobre la población de células hepáticas, preferiblemente en el que el al menos un efecto incluye un efecto sobre la viabilidad celular, la función celular o ambas.

50 (xvi) Un procedimiento de realización de estudios de metabolismo de fármacos *in vitro* que comprende: (i) exponer la

- 5 célula progenitora o célula madre hepática humana como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, a un agente de ensayo, y (ii) observar al menos un cambio, si lo hubiera, que implique al agente de ensayo después de un periodo de ensayo predeterminado, preferiblemente en el que el al menos un cambio incluye un cambio de estructura, concentración o ambos del agente de ensayo.
- 10 (xvii) Un dispositivo auxiliar hepático que comprende una carcasa que alberga la célula progenitora o célula madre hepática humana como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente.
- 15 (xviii) La célula progenitora o célula madre hepática humana como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, en el que se ha introducido una copia funcional de un gen, o una composición que comprende dicha célula progenitora o célula madre, línea celular o población celular hepática humana, opcionalmente en el que dicha composición es una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, para tratar errores de la expresión génica.
- 20 (xix) La célula progenitora o célula madre hepática humana como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, para uso en la potenciación de la regeneración de un hígado lesionado o enfermo.
- 25 (xx) Un procedimiento de realización de ensayos de agentes eficaces para tratar infecciones hepáticas que comprende (i) infectar con un agente infeccioso de interés la célula progenitora o célula madre hepática como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular según una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, proporcionando una población infectada, (ii) exponer la población infectada a una cantidad predeterminada de agente de ensayo y (iii) observar los efectos, si los hubiera, de la exposición sobre la población infectada.
- 30 (xxi) El procedimiento como se expone en (xx) anteriormente, en que el agente infeccioso incluye un microorganismo, preferiblemente en el que el agente infeccioso incluye uno o más virus, bacterias, hongos o combinaciones de los mismos, más preferiblemente en el que el agente infeccioso vírico incluye un virus de la hepatitis.
- 35 (xxii) El procedimiento como se expone en (xx) anteriormente, en que los efectos observados incluyen efectos sobre la replicación vírica de un agente infeccioso vírico.
- 40 (xxiii) Un procedimiento de producción de una proteína de interés que comprende introducir en la célula progenitora o célula madre hepática como se expone en una cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o en la línea celular o población celular como se expone en una cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, un gen que codifica una proteína de interés, incubar la población de células hepáticas en condiciones eficaces para que tengan lugar la transcripción, traducción y opcionalmente modificación postraduccional, y recoger la proteína de interés.
- 45 (xxiv) El procedimiento como se expone en (xxiii) anteriormente, en que la proteína de interés comprende un antígeno de vacuna.
- 50 (xxv) El uso de células progenitoras o células madre hepáticas humanas como se expone en cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o la línea celular o población celular como se expone en cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, para la diferenciación *in vitro* o *ex vivo* de dichas células en células de linaje de hepatocito, particularmente hepatocitos o células de tipo hepatocito.
- 55 (xxvi) Un procedimiento para la diferenciación de células progenitoras o células madre hepáticas humanas como se expone en cualquiera de (i) a (viii), (x) o (xii) anteriormente, o de la línea celular o población celular como se expone en cualquiera de (ix), (x) o (xii) anteriormente, en células de linaje de hepatocito, particularmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, que comprende exponer las células progenitoras o células madre, línea celular o población celular a medio inductor de la diferenciación hepática.
- La materia en cuestión proporcionada por la invención pertenece por tanto específicamente a la divulgación, descripción y enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

5 La presente memoria descriptiva describe también una célula progenitora o célula madre aislada novedosa (una célula de vertebrado, preferiblemente de mamífero, aún más preferiblemente humana), originada a partir de hígado adulto, caracterizado porque expresa simultáneamente (concretamente es positivo para) al menos un marcador mesenquimal, especialmente uno, más de uno, por ejemplo 2, 3 o 4, o todos los marcadores CD90, CD44, CD73, vimentina y α -actina de músculo liso (ASMA), con el marcador de hepatocito albúmina (ALB) y posiblemente con uno o más de otros marcadores hepáticos o de hepatocitos, preferiblemente uno, más de uno o todos de CD29, α -fetoproteína (AFP), α -1-antitripsina y/o transportador MRP2. Dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta puede expresar adicionalmente una, más de una o todas las siguientes moléculas indicativas de propiedades o funciones de tipo hepatocito: G6P, CYP1B1, CYP3A4, HNF-4, TDO, TAT, GS, GGT, CK8, EAAT2. Dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta puede caracterizarse adicionalmente por uno, más de uno o todos los siguientes: negativo para al menos los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 y posiblemente también de uno o más de otros marcadores hematopoyéticos tales como, por ejemplo, CD105, HLA-DR, negativo del marcador epitelial colangiocítico citoqueratina 19 (CK-19) y posiblemente de más marcadores epiteliales; negativo para al menos los marcadores de células madre indiferenciados CD117 y Oct-4 y posiblemente también de uno o más de un marcador de células madre embrionarias; y bajo nivel de expresión de AFP. Preferiblemente, dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta puede tener una morfología de tipo mesenquimática, en particular que implica uno o más de uno o todos de crecimiento en monocapas, forma aplanada, citoplasma amplio y/o núcleos ovoides con uno o dos nucleolos.

20 La presente memoria descriptiva describe también una célula madre aislada originada a partir de hígado humano que es positivo para CD90, CD29 y CD44, que es positivo para albúmina, positivo para vimentina y positivo para α -actina de músculo liso. La memoria descriptiva describe que los células madre aisladas son también negativos de CK-19, negativos de CD45, negativos de CD34 y negativos de CD117. La presente memoria descriptiva describe también una población celular que comprende mesenquimales células madre mesenquimales progenitores que tienen al menos tres de las siguientes características: expresión de albúmina detectable por anticuerpo; expresión de vimentina detectable por anticuerpo; expresión de α -actina de músculo liso detectable por anticuerpo; ausencia de CK-19; ausencia de CD45, ausencia de marcador CD45, ausencia de marcador CD34, ausencia de marcador CD117, evidencia de marcador CD90, evidencia de marcador CD29 o evidencia de marcador CD44. Preferiblemente, las células tienen todas las características anteriormente enumeradas. La memoria descriptiva describe que las células madre son células madre hepáticas humanas. La presente memoria descriptiva describe que el célula madre aislado originado a partir de hígado adulto es positivo para CD90, CD73, CD29 y CD44 y positivo para albúmina, positivo para vimentina y positivo para α -actina de músculo liso.

35 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento para obtener una célula progenitora o célula madre aislado o una población celular que comprende dicha célula progenitora o citoblasto, comprendiendo el procedimiento: (a) disociar hígado adulto o una parte del mismo formando una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo, (b) sembrar la población de células primarias sobre un sustrato que permita la adherencia de células sobre el mismo y (c) cultivar las células de la población de células primarias, que se han adherido a dicho sustrato, durante al menos 7 días, preferiblemente al menos 10, al menos 13 o al menos 15 días.

45 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento para obtener el célula madre hepática aislada, o la población de la misma como se describe en la presente memoria, que comprende las etapas de cultivar células hepáticas adultas, aislar hepatocitos de las mismas, sembrar los hepatocitos y cultivar dichos hepatocitos durante al menos 7 días, preferiblemente al menos 10, al menos 13 y al menos 15 días.

50 La presente memoria descriptiva describe también una célula progenitora o célula madre hepática adulta humano aislada, una línea celular del mismo y/o población celular que comprende la misma, obtenible u obtenido directamente usando los procedimientos descritos en la presente memoria.

55 En un aspecto, los presentes inventores han establecido una población celular particular (línea celular) de células progenitoras o células madre hepáticas humanas adultas según la invención y han depositado dicha línea celular aislada el 20 de febrero de 2006 según el Tratado de Budapest en la Colección Coordinada de Microorganismos Belga (BCCM/LMBP) con el número de acceso LMBP 6452CB (dado por la autoridad depositaria internacional, referencia de identificación dada por el depositante: ADHLSC). En consecuencia, la presente invención se refiere a una célula aislada, línea celular y población celular depositada en la BCCM con el número de acceso LMBP 6452CB (en la presente memoria, la línea celular "LMBP 6452CB"), a las sublíneas de la misma, incluyendo sublíneas clonales, y a derivados modificados genéticamente o de otro modo de la misma.

La presente memoria descriptiva describe también una composición que comprende la célula progenitora o célula madre hepático aislado o la población del mismo según la invención. Preferiblemente, las células hepáticas son células hepáticas humanas, o células hepáticas de mamífero.

5 Las células progenitoras o células madre según la invención (mencionando específicamente, aunque por supuesto sin limitación, la línea LMBP 6452CB) suponen varias ventajas considerables. Por ejemplo, al contrario que las células de origen embrionario, las presentes células progenitoras o células madre son de origen adulto y pueden presentar un menor riesgo de crecimiento incontrolado (tumoral) o transformación maligna cuando se usan en

10 Además, los inventores advirtieron que las células progenitoras o células madre como se describen en la presente memoria no presentan sustancialmente capacidad de diferenciarse en los tipos celulares mesodérmicos (por ejemplo, osteocitos o condrocitos, células de tejido conectivo), lo que reduce la formación ectópica de dichos tejidos cuando las células se administran e implantan en tejido hepático.

15 Los presentes inventores advirtieron también que las células progenitoras o células madre descritas en la presente memoria pueden tener preferencia particular por diferenciación en hepatocitos o células de tipo hepatocito, lo que las hace particularmente adecuadas para la reconstitución de funciones hepatocíticas en el hígado.

20 Las presentes células progenitoras o células madre son claramente diferentes de los células madre derivadas de hígado descritos anteriormente, tales como células ovales, por ejemplo en sus características morfológicas y de expresión de marcador.

25 Las células progenitoras o células madre hepáticas adultas descritas en la presente memoria son particularmente útiles en medicina, hepatología, errores congénitos del metabolismo hepático, trasplante, enfermedades infecciosas e insuficiencia hepática. Las células progenitoras o células madre hepáticas según la invención son particularmente útiles para el trasplante de células hepáticas (humanas), la preparación de modelos animales de trasplante de células hepáticas humanas, hígados bioartificiales, líneas celulares hepáticas *in vitro* y modelos animales de enfermedades hepáticas humanas adquiridas, pruebas de cribado del metabolismo hepático (farmacocinética, citotoxicidad, genotoxicidad) y terapia génica dirigida a células hepáticas. Las células progenitoras o células madre hepáticas como se describen en la presente memoria pueden diferenciarse adicionalmente en hepatocitos.

35 La presente memoria descriptiva describe también una composición farmacéutica que comprende una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular del mismo o población celular del mismo, o una progenie del mismo incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria, y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las células hepáticas son células hepáticas humanas o células hepáticas de mamífero.

40 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento de tratamiento de enfermedad hepática que comprende administrar una cantidad eficaz de una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular de la misma o una población celular de la misma, o progenie de la misma incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria. La presente memoria descriptiva describe también que la enfermedad hepática incluye, pero sin limitación, fenilcetonuria y otras aminoacidopatías, hemofilia y otras deficiencias de factor de coagulación, hipercolesterolemia familiar y otros trastornos del metabolismo lipídico, trastornos del ciclo de la urea, glucogenosis, galactosemia, fructosemia, tirosinemia, deficiencias del metabolismo de proteínas y carbohidratos, aciduria orgánica, enfermedades mitocondriales, trastornos peroxisómicos y lisosómicos, anormalidades de la síntesis de proteínas, defectos de transportadores de células hepáticas, defecto de glucosilación, hepatitis, cirrosis, errores congénitos del metabolismo, insuficiencia hepática aguda, infecciones hepáticas agudas, toxicidad química aguda, insuficiencia hepática crónica, insuficiencia hepática fulminante, colangitis, cirrosis biliar, síndrome de Alagille, deficiencia de α -1-antitripsina, hepatitis autoinmune, atresia biliar, cáncer de hígado, enfermedad quística del hígado, esteatosis hepática, galactosemia, cálculo biliar, síndrome de Gilbert, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y otras infecciones víricas de hepatitis, porfiria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, tirosinemia, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo 1 o enfermedad de Wilson.

55 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento para tratar errores de la expresión génica que comprende: (i) introducir en una célula progenitora o célula madre hepática, línea celular de la misma o población celular de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito como se describe en la presente memoria, una copia funcional de un gen, proporcionando una

población transformada; y (ii) introducir en el hígado de un paciente, estando dicho paciente necesitado de la copia funcional del gen, al menos una porción de la población transformada. Como alternativa, la población transformada puede introducirse en el hígado de un mamífero no humano produciendo un nuevo modelo animal de patología hepática.

5 La presente memoria descriptiva describe también una composición para tratar errores de la expresión génica que comprende una célula progenitora o célula madre hepática transformada, una línea celular de la misma o población celular de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células similares de hepatocitos, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria, en los que se ha introducido una copia funcional de un gen.

10 La presente memoria descriptiva describe también una composición farmacéutica para tratar errores de la expresión génica que comprende una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular de la misma o población celular de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, como se describe en la presente memoria, en los que se ha introducido una copia funcional de un gen, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento para potenciar la regeneración de un hígado lesionado o enfermo que comprende administrar al hígado una cantidad eficaz de una célula progenitora o célula madre hepática, de una línea celular de la misma o población celular de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria.

20 La presente memoria descriptiva describe también un dispositivo auxiliar hepático que comprende una carcasa que alberga una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular de la misma o población de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria.

25 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento de realización de un ensayo de toxicidad *in vitro* que comprende: exponer una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular del mismo o población del mismo o progenie del mismo, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria, a un agente de ensayo y observar al menos un efecto, si lo hubiera, del agente de ensayo sobre la población de células hepáticas. Preferiblemente, el al menos un efecto incluye un efecto sobre la viabilidad celular, la función celular o ambas.

30 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento de realización de estudios de metabolismo de fármacos *in vitro* que comprende: (i) exponer una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular de la misma o población de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria, a un agente de ensayo, y (ii) observar al menos un cambio, si lo hubiera, que implique al agente de ensayo después de un periodo de ensayo predeterminado. Preferiblemente, el al menos un cambio incluye un cambio de estructura, concentración o ambos del agente de ensayo.

35 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento de realización de ensayos de agentes eficaces para tratar infecciones víricas que comprende (i) infectar con un agente infeccioso de interés una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular de la misma o población de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria, proporcionando una población infectada, (ii) exponer la población infectada a una cantidad predeterminada de agente de ensayo y (iii) observar los efectos, si los hubiera, de la exposición sobre la población infectada. En una realización, el agente infeccioso incluye un microorganismo. En otra realización, el agente infeccioso incluye uno o más virus, bacterias, hongos o combinaciones de los mismos. En una realización particular, los efectos observados incluyen efectos sobre la replicación vírica de un agente infeccioso vírico. Preferiblemente, el agente infeccioso vírico incluye un virus de la hepatitis.

40 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento de producción de una proteína de interés que comprende (i) introducir en una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular de la misma o población de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria, un gen funcional que codifica una proteína de interés, (ii) incubar dicha población celular en condiciones eficaces para

que tenga lugar la transcripción, traducción y opcionalmente modificación postraduccional y (iii) recoger la proteína de interés. Preferiblemente, las células hepáticas son células hepáticas humanas. En una realización, la proteína de interés comprende un antígeno de vacuna.

5 La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento de realización de estudios *in vitro* o *in vivo* sobre el desarrollo hepático y la diferenciación de hepatocitos que comprende: exponer una célula progenitora o célula madre hepática, una línea celular de la misma o población de la misma o progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificada genéticamente, como se describe en la presente memoria, *in vitro* o *in vivo* a condiciones que afecten a las
10 condiciones de diferenciación y observando al menos un efecto sobre la población de las células.

La presente memoria descriptiva describe también las células, la preparación de las mismas, la caracterización de las mismas, el procedimiento de cultivo de las mismas y la producción de las mismas.

15 La presente memoria descriptiva describe también la conservación de estas células mediante crioconservación y el cultivo de las células.

La presente memoria descriptiva describe también la técnica de trasplante de células en animales y seres humanos.

20 La presente memoria descriptiva describe también el uso del célula madre hepática según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas. La presente memoria descriptiva describe también el uso del célula madre hepática como se describe en la presente memoria en un kit o kit en piezas.

25 Breve descripción de las figuras:

La **Figura 1** muestra la apariencia morfológica de células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto humano de la invención (ADHLSC), preparados como en el ejemplo 1, después de un mes de cultivo, usando
30 microscopía óptica (contraste de fases). **A**, a menor confluencia; **B**, a mayor confluencia. Aumentos: 100 x

Figura 2A: Presencia de tinción inmunofluorescente de células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto humano de la invención (ADHLSC), preparados como en el ejemplo 1, después de 1 mes de cultivo, para α -
35 actina de músculo liso (A1), vimentina (A2) y albúmina (A3, policlonal; A4, monoclonal), **B:** perfiles de expresión génica según PCR-TI en dicha línea celular (ADHLSC, hilera 1), en comparación con hepatocitos humanos (hHep, hileras 2), células estrelladas humanas (hSC, hileras 3) y hepatoblastoma humano (HepG2, hileras 4).

La **Figura 3** muestra la diferenciación de células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto humano de la invención (ADHLSC) en el linaje de tipo hepatocito *in vitro*. Se diferenciaron las células como en el ejemplo 1,
40 se tomaron fotografías el día 2 (J2), día 14 (J14) y día 30 (J30) del proceso.

La **Figura 4** muestra varias imágenes de tinción con hematoxilina y eosina en hígado quimérico de ratones uPA/SCID transplantados con células ADHLSC indiferenciadas, como se detalla en el ejemplo 1, demostrando que
45 estas células se vuelven hepatocitos diferenciados.

La **Figura 5** muestra varias imágenes de tinción de albúmina humana que desvelan el origen humano de la población de tipo hepatocito observada 10 semanas después del trasplante como en el ejemplo 1 con ADHLSC
50 indiferenciadas.

Descripción detallada

Como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen tanto los referentes singulares como plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. A modo de ejemplo, “una célula”
55 designa una o más de una célula.

Los términos “comprendiendo”, “comprende” y “comprendido por” como se usan en la presente memoria son sinónimos de “incluyendo”, “incluye” o “conteniendo” y “contiene”, son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de procedimiento adicionales no enumerados.

Obtención de las células de la invención

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para obtener una célula progenitora o célula madre aislada, o una población celular que comprende dicha célula progenitora o célula madre, comprendiendo el procedimiento: (a) disociar hígado adulto o una parte del mismo, formando una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo, (b) plantar la población de células primarias sobre un sustrato que permita la adherencia de las células al mismo y (c) cultivar células de la población celular primaria que se hayan adherido a dicho sustrato durante al menos 7 días, preferiblemente al menos 10, al menos 13 o al menos 15 días.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para obtener una célula progenitora o célula madre humana aislada, o una población celular que comprende dicha célula progenitora o célula madre, comprendiendo el procedimiento: (a) disociar, preferiblemente mediante un procedimiento de colagenasa en dos etapas, un hígado adulto o una parte del mismo de un sujeto humano, formando una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo; (b) sembrar la población de células primarias sobre sustrato recubierto con colágeno de tipo I en medio E de Williams que comprende preferiblemente 10% (v/v) de suero de ternera fetal, EGF preferiblemente 25 ng/ml, insulina preferiblemente 10 µg/ml y dexametasona preferiblemente 1 µM; (c) permitir la adherencia de las células de la población celular primaria a dicho sustrato durante 24 horas y después de ello cambiar el medio por medio reciente que tiene la composición de (b); (d) cultivar las células en dicho medio de (c) durante 2 semanas, preferiblemente 15 días; (e) cambiar el medio por DMEM rico en glucosa que comprende preferiblemente 10% de FCS, y cultivar adicionalmente las células, con lo que las células progenitoras o células madre de la invención emergen y proliferan; (f) permitir a las células volverse aproximadamente un 70% confluentes y someter a pases las células al menos una vez y preferiblemente al menos dos veces, plantándose las células sobre el sustrato como en (b) y cultivándose en un medio como en (e).

Como se usa en la presente memoria, el término "célula aislada" designa en general una célula que no está asociada a una o más células o uno o más componentes celulares con los que la célula está asociada *in vivo*. Por ejemplo, una célula aislada puede haberse retirado de su entorno nativo, o puede resultar de la propagación, por ejemplo propagación *ex vivo*, de una célula que se ha retirado de su entorno nativo.

El término "*in vitro*" como se usa en la presente memoria denota exterior o externo al cuerpo animal o humano. El término "*in vitro*" como se usa en la presente memoria debería entenderse que incluye "*ex vivo*". El término "*ex vivo*" designa típicamente tejidos o células retirados de un cuerpo animal o humano y mantenidos o propagados fuera del cuerpo, por ejemplo en un recipiente de cultivo.

El término "población celular" designa en general un agrupamiento de células. A menos que se indique otra cosa, el término designa un agrupamiento celular constituido por o que comprende células aisladas como se definen en la presente memoria.

Una población celular puede consistir en células que tienen un fenotipo común o puede comprender al menos una fracción de células que tienen un fenotipo común. Se dice que las células tienen un fenotipo común cuando son sustancialmente similares o idénticas en una o más características demostrables incluyendo, pero sin limitación, apariencia morfológica, la presencia, ausencia o nivel de expresión de componentes celulares o productos particulares, por ejemplo, ARN, proteínas u otras sustancias, actividad de ciertas rutas bioquímicas, capacidad y/o cinética de proliferación, potencial de diferenciación y/o respuesta a las señales de diferenciación o comportamiento durante el cultivo *in vitro* (por ejemplo, adherencia, no adherencia, crecimiento en monocapa, cinética de proliferación o similares). Dichas características demostrables pueden definir por lo tanto una población celular o una fracción de la misma.

Cuando se dice en la presente memoria que una población celular es "heterogénea", esto denota en general una población celular que comprende dos o más células o fracciones de células que no tienen un fenotipo común, por ejemplo, una población celular que comprende células de dos o más tipos celulares diferentes. A modo de ejemplo y no de limitación, puede aislarse una población celular heterogénea a partir del hígado, y puede comprender diversos tipos de células hepáticas incluyendo, pero sin limitación, hepatocitos (por ejemplo, hepatocitos grandes y pequeños), colangiocitos, células de Kupffer, células estrelladas hepáticas (células de Ito) y células endoteliales hepáticas.

Cuando se dice en la presente memoria que una población celular es "homogénea", consiste en células que tienen un fenotipo común. Una población celular que se dice en la presente memoria que es "sustancialmente homogénea" comprende una mayoría sustancial de células que tienen un fenotipo común. Una población celular "sustancialmente

homogénea” puede comprender al menos un 70%, por ejemplo al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, por ejemplo al menos un 95% o incluso al menos un 99% de células que tienen un fenotipo común, tal como el fenotipo designado específicamente (por ejemplo, el fenotipo de la célula progenitora o célula madre). Como se usa en la presente memoria, el término “sustancialmente homogéneo” como se usa en la presente memoria puede englobar también por tanto una población homogénea.

El término “población celular que comprende una célula progenitora o citoblasto” designa una población celular como se define en la presente memoria que comprende al menos una célula progenitora o célula madre y típicamente una fracción de células progenitoras o células madre como se definen en la presente memoria. Habitualmente, las células progenitoras o células madre de dicha fracción pueden tener un fenotipo común.

El término “célula progenitora” designa en general una célula no especializada o relativamente menos especializada y competente de proliferación, o su progenie, que puede dar lugar a al menos un tipo celular relativamente más especializado. A modo de ejemplo y no de limitación, una célula progenitora puede dar lugar a descendientes que pueden diferenciarse en uno o más linajes, produciendo células relativamente más especializadas cada vez, en el que dichos descendientes y/o células relativamente más especializadas cada vez pueden ser ellas mismas células progenitoras, o incluso producir células diferenciadas terminalmente, concretamente, células totalmente especializadas que pueden ser postmitóticas. El término engloba también células madre como se definen en la presente memoria.

Se dice que una célula progenitora “da lugar” a otra célula relativamente más especializada cuando, a modo de ejemplo y no de limitación, la célula progenitora se diferencia volviéndose la otra célula sin experimentar primero división celular, o la otra célula se produce después de una o más rondas de división y/o diferenciación celular de la célula progenitora o progenie de la misma.

El término “célula madre” designa una célula progenitora capaz de autorrenovación, concretamente, que puede proliferar sin diferenciación, con lo que la progenie de una célula madre o al menos una parte de la misma retiene sustancialmente el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, el potencial de diferenciación y la competencia de proliferación de la célula madre. El término engloba células madre capaces de una autorrenovación sustancialmente ilimitada, concretamente, en los que la capacidad de la progenie o parte de la misma de proliferación adicional no está sustancialmente reducida en comparación con la célula madre, así como células madre que presentan una autorrenovación limitada, concretamente en los que la capacidad de la progenie o parte de la misma de proliferación adicional está demostrablemente reducida en comparación con la célula madre.

Un experto sabe que las propiedades anteriores designan en general el comportamiento *in vivo* de células progenitoras y células madre, y pueden duplicarse en condiciones apropiadas completamente o al menos en parte *in vitro* y/o *ex vivo*.

Basándose en la capacidad de dar lugar a diversos tipos celulares, una célula progenitora o célula madre puede describirse habitualmente como totipotente, pluripotente, multipotente o unipotente. Se define una célula única “totipotente” por ser capaz de crecer, concretamente, desarrollarse, hasta un organismo completo. Una célula “pluripotente” no es capaz de crecer hasta un organismo completo, pero es capaz de dar lugar a tipos celulares originarios de las tres capas germinales, concretamente mesodermo, endodermo y ectodermo, y puede ser capaz de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo. Una célula “multipotente” es capaz de dar lugar al menos a un tipo celular de cada uno de dos o más órganos o tejidos diferentes de un organismo, en la que dichos tipos celulares pueden originarse a partir de la misma o diferente capa germinal, pero no es capaz de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo. Una célula “unipotente” es capaz de diferenciarse en células de solo un linaje celular.

Los términos “diferenciación”, “diferenciar” o derivados de los mismos como se usan en la presente memoria denotan el proceso mediante el cual una célula no especializada o relativamente menos especializada se vuelve relativamente más especializada. En el contexto de la ontogenia celular, el adjetivo “especializado” es un término relativo. Por tanto, una “célula diferenciada” es una célula que ha progresado más allá en una cierta ruta de desarrollo que la célula con la que se está comparando. Una célula diferenciada puede ser, por ejemplo, una célula diferenciada terminalmente, concretamente una célula totalmente especializada que asume funciones especializadas en diversos tejidos y órganos de un organismo, y que puede ser, pero no es necesario, postmitótica. En otro ejemplo, una célula diferenciada puede ser también una célula progenitora en un linaje de diferenciación, que puede proliferar y/o diferenciarse adicionalmente. De forma similar, una célula está “relativamente más especializada” si ha progresado más allá en una cierta ruta de desarrollo que la célula con la que se está comparando, considerándose por lo tanto la última “no especializada” o “relativamente menos especializada”. Una

5 célula relativamente más especializada puede diferir de la célula no especializada o relativamente menos especializada en una o más características fenotípicas demostrables tales como, por ejemplo, la presencia, ausencia o nivel de expresión de componentes celulares o productos particulares, por ejemplo, ARN, proteínas u otras sustancias, la actividad de ciertas rutas bioquímicas, la apariencia morfológica, la capacidad y/o cinética de proliferación, el potencial de diferenciación y/o la respuesta ante señales de diferenciación, etc., en la que dichas características significan la progresión de la célula relativamente más especializada más allá en dicha ruta de desarrollo.

10 Los ejemplos no limitantes de diferenciación pueden incluir, por ejemplo, el cambio de un célula madre pluripotente a un tipo dado de célula progenitora o célula madre multipotente, el cambio de una célula progenitora o célula madre multipotente a un tipo dado de célula progenitora o célula madre unipotente o el cambio de una célula progenitora o célula madre unipotente a tipos celulares más especializados o a células especializadas terminalmente en un linaje celular dado. La diferenciación de una célula no especializada o menos especializada en una célula más especializada puede proceder mediante la aparición de células con un grado intermedio de especialización.

15 **Disociación del tejido hepático**

20 Como se ha mencionado, el procedimiento de la invención comprende la etapa de disociar hígado adulto o una parte del mismo, formando una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo.

25 El término "hígado" designa el órgano denominado hígado. El término "parte del hígado" designa en general cualquier parte del órgano hígado, sin ninguna limitación en cuanto a la cantidad de dicha parte o de la región del órgano hígado donde se origina. Preferiblemente, todos los tipos celulares presentes en el órgano hígado pueden estar también representados en dicha parte del hígado. La cantidad de la parte del hígado puede deducirse al menos en parte de consideraciones prácticas, por ejemplo, la necesidad de obtener suficientes células hepáticas primarias para practicar razonablemente el procedimiento de la invención. Dichas consideraciones resultarán evidentes para un experto a la vista de las presentes enseñanzas. Por tanto, a modo de ejemplo y no de limitación, una parte del hígado puede representar (típicamente en p/p) al menos un 0,1% del hígado, o al menos un 1%, o al menos un 10%, o al menos un 20%, o al menos un 30%, o al menos un 40%, o al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90% o más del órgano hígado. En otros ejemplos no limitantes, una parte del hígado puede ser de al menos 1 g, o de al menos 10 g, o de al menos 100 g, o de al menos 200 g, o de al menos 300 g, o de al menos 400 g, o de al menos 500 g, o de al menos 600 g, o de al menos 700 g, o de al menos 800 g, o de al menos 900 g, o de al menos 1000 g, o de al menos 1100 g, o de al menos 1200 g, o de al menos 1300 g o de al menos 1400 g o más. Por ejemplo, una parte del hígado puede ser un lóbulo hepático, por ejemplo, el lóbulo derecho o el lóbulo izquierdo, o el segmento IV extirpado durante la operación de división del hígado.

35 El término "hígado adulto" como se usa en la presente memoria designa el hígado que ha alcanzado una madurez de desarrollo sustancial en la organización de tejido y composición celular.

40 En particular, es sabido por un experto que el hígado puede experimentar cambios de desarrollo durante un periodo de tipo inmediatamente después del nacimiento, después del cual alcanza una organización sustancialmente madura. Por ejemplo, en sujetos humanos, el hígado en el nacimiento contiene una población considerable de células hematopoyéticas, que desaparecen sustancialmente del hígado al cabo de 1-2 semanas después del nacimiento. Además, el hígado de sujetos humanos en el nacimiento contiene una población de células progenitoras hepáticas, que se reemplazan sustancialmente por hepatocitos maduros y células biliares al cabo de varios meses después del nacimiento.

45 En consecuencia, en sujetos humanos, "hígado adulto" designa el hígado de sujetos en cualquier momento después del nacimiento, preferiblemente a término, y pueden ser, por ejemplo, de al menos un mes de edad después del nacimiento, por ejemplo, de al menos 2 meses, al menos 3 meses, por ejemplo, al menos 4 meses, al menos 5 meses, por ejemplo, al menos 6 meses después del nacimiento tal como, por ejemplo, 1 año o más, 5 años o más, al menos 10 años o más, 15 años o más, 20 años o más o 25 años o más después del nacimiento. Por tanto, un "hígado adulto", o hígado maduro, puede encontrarse en sujetos humanos que por lo demás se describirían en términos convencionales de "lactante", "niño", "joven", "adolescente" o "adulto".

50 Un experto apreciará que el hígado puede alcanzar una madurez de desarrollo sustancial en diferentes intervalos postnatales de tiempo en diferentes especies animales, y puede interpretar apropiadamente el término "hígado adulto" con referencia a cada especie.

El hígado o parte del mismo se obtiene a partir de un "sujeto", "sujeto donante" o "donante", que designan intercambiamente un animal vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

5 El término "mamífero" incluye cualquier animal clasificado como tal incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, animales de deportes, mascotas, animales de compañía y animales experimentales tales como, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos y primates, por ejemplo, monos y simios.

10 Según la invención, el hígado adulto o parte del mismo es de un sujeto humano. Como se detalla en otro lugar de la memoria descriptiva, las células progenitoras o células madre o líneas celulares o progenie de las mismas derivadas según la invención de hígados de sujetos humanos, pueden usarse ventajosamente, por ejemplo, en la investigación y terapia de pacientes, especialmente pacientes humanos, que padecen enfermedad hepática.

15 La presente memoria descriptiva describe también que el hígado adulto o parte del mismo puede proceder de un sujeto animal no humano, preferiblemente un sujeto mamífero no humano. Las células progenitoras o células madre o líneas celulares o progenie de los mismos, derivados como se describe en la presente memoria de hígados de sujetos animales no humanos o mamíferos no humanos, pueden usarse ventajosamente, por ejemplo, en la investigación y terapia de enfermedad hepática en miembros de la misma especie, relacionada u otra especie animal
20 no humana o de mamífero no humano, o incluso en la terapia de pacientes humanos que padecen enfermedad hepática (por ejemplo, xenotransplante, dispositivos hepáticos bioartificiales que comprenden células de animal no humano o mamífero no humano). A modo de ejemplo y no de limitación, pueden originarse células de mamífero no humano particularmente adecuadas para uso en terapia humana a partir de cerdos.

25 Un sujeto donante puede estar vivo o muerto, según se determina por criterios aceptados en la técnica tales como, por ejemplo, el criterio "cardiopulmonar" (que implica habitualmente un cese irreversible de las funciones circulatoria y respiratoria) o el criterio de "muerte cerebral" (que implica habitualmente un cese irreversible de todas las funciones del cerebro completo, incluyendo el tronco encefálico). La recogida puede implicar procedimientos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, biopsia, extirpación o escisión.

30 Un experto apreciará que al menos algunos aspectos de recoger el hígado o parte del mismo de sujetos donantes pueden estar sometidos a las normas legales y éticas correspondientes. A modo de ejemplo y no de limitación, la recogida de tejido hepático de un donante humano vivo puede tener que ser compatible con la sustentación de la vida posterior del donante. En consecuencia, puede retirarse típicamente solo una parte del hígado de un donante humano vivo, por ejemplo usando biopsia o extirpación, de tal modo que se mantenga un nivel adecuado de funciones hepáticas fisiológicas en el donante. Por otro lado, la recogida del hígado o parte del mismo de un animal no humano puede ser, pero no es necesario, compatible con la supervivencia posterior del animal no humano. Por ejemplo, el animal no humano puede sacrificarse humanitariamente después de la recogida del tejido. Estas y otras consideraciones análogas resultarán evidentes para un experto en la técnica y reflejan los estándares legales y éticos.

35 Como se describe en la presente memoria, el hígado o parte del mismo puede obtenerse a partir de un donante, especialmente un donante humano, que tenga una circulación sostenida, por ejemplo el corazón latiendo, y funciones respiratorias sostenidas, por ejemplo los pulmones respirando o ventilación artificial. Según las normas éticas y legales, el donante puede tener que estar en muerte cerebral o no (por ejemplo, la retirada del hígado completo o una porción del mismo, que no sería compatible con la supervivencia posterior de un donante humano, puede permitirse en seres humanos con muerte cerebral). La recogida del hígado o parte del mismo de dichos donantes es ventajosa, puesto que el tejido no sufre la anoxia sustancial (falta de oxigenación) que resulta habitualmente de la isquemia (cese de la circulación).

40 Como se describe también en la presente memoria, y como advirtieron sorprendentemente los presentes inventores, el hígado o parte del mismo puede obtenerse a partir de un donante, especialmente un donante humano, en que en el momento de recogida del tejido haya cesado la circulación, por ejemplo, no lata su corazón, y/o hayan cesado las funciones respiratorias, por ejemplo, no respiren los pulmones y no tenga ventilación artificial. Aunque el hígado o parte del mismo de estos donantes puede haber sufrido al menos cierto grado de anoxia, los presentes inventores advirtieron que pueden obtenerse también células progenitoras o células madre viables según la presente invención a partir de dichos tejidos. El hígado o parte del mismo puede obtenerse al cabo de aproximadamente 24 horas después del cese de la circulación del donante (por ejemplo del latido cardíaco), por ejemplo, al cabo de aproximadamente 20 h, por ejemplo al cabo de aproximadamente 16 h, más preferiblemente al cabo de

aproximadamente 12 h, por ejemplo al cabo de aproximadamente 8 h, aún más preferiblemente al cabo de aproximadamente 6 h, por ejemplo al cabo de aproximadamente 5 h, al cabo de aproximadamente 4 h o al cabo de aproximadamente 3 h, todavía más preferiblemente al cabo de aproximadamente 2 h, y lo más preferiblemente al cabo de aproximadamente 1 h, tal como al cabo de aproximadamente 45, 30 o 15 minutos después del cese de la circulación del donante (por ejemplo del latido cardiaco).

Los tejidos recogidos como anteriormente pueden enfriarse aproximadamente a temperatura ambiente o a una temperatura menor que la temperatura ambiente, pero habitualmente se evita la congelación del tejido o partes del mismo, especialmente cuando dicha congelación daría como resultado la nucleación o el crecimiento de cristales de hielo. Por ejemplo, el tejido puede mantenerse a cualquier temperatura entre aproximadamente 1°C y temperatura ambiente, entre aproximadamente 2°C y temperatura ambiente, entre aproximadamente 3°C y temperatura ambiente, entre aproximadamente 4°C y temperatura ambiente, y puede mantenerse ventajosamente a aproximadamente 4°C. El tejido puede mantenerse también "en hielo" como es conocido en la técnica. El tejido puede enfriarse durante todo o parte del periodo isquémico, concretamente, el tiempo después del cese de la circulación en el donante. Es decir, el tejido puede someterse a isquemia en caliente, isquemia en frío o una combinación de isquemia en caliente y en frío. El tejido recogido puede mantenerse así durante, por ejemplo, hasta 48 h antes del procesamiento, preferiblemente durante menos de 24 h, por ejemplo menos de 16 h, más preferiblemente durante menos de 12 h, por ejemplo menos de 10 h, menos de 6 h, menos de 3 h, menos de 2 h o menos de 1 h.

El tejido recogido puede mantenerse ventajosamente, pero no necesariamente, sumergido, por ejemplo completa o al menos parcialmente, en un medio adecuado y/o puede perfundirse, aunque no necesariamente, con un medio adecuado antes del procesamiento posterior del tejido. Un experto es capaz de seleccionar el medio adecuado que puede apoyar la supervivencia de las células del tejido durante el periodo antes del procesamiento.

El procedimiento de la invención comprende disociar tejido de hígado adulto como se describe anteriormente formando una población de células primarias.

El término "disociar" como se usa en general en la presente memoria designa desestabilizar parcial o completamente la organización celular de un tejido u órgano, concretamente, desestabilizar parcial o completamente la asociación entre las células y los componentes celulares de un tejido u órgano. Como puede entenderse por un experto, el objetivo de disociar un tejido u órgano es obtener una suspensión de células (una población celular) a partir de dicho tejido u órgano. La suspensión puede comprender células solitarias o individuales, así como células unidas físicamente formando conglomerados o grupos de dos o más células. La disociación preferiblemente no causa, o causa lo menos posible, una reducción de la viabilidad celular.

Un procedimiento adecuado para disociar hígado o parte del mismo para obtener una población (suspensión) de células primarias a partir del mismo puede ser cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación, digestión enzimática, separación mecánica, filtración, centrifugación y combinaciones de los mismos. En una realización, el procedimiento para disociar hígado o parte del mismo puede comprender la digestión enzimática del tejido hepático para liberar células hepáticas. En una realización, el procedimiento para disociar hígado o parte del mismo puede comprender la desestabilización o separación mecánica del tejido hepático para liberar células hepáticas. En una realización, el procedimiento para disociar hígado o parte del mismo puede comprender una combinación de digestión enzimática y desestabilización o separación mecánica del tejido hepático para liberar células hepáticas.

Los procedimientos para disociar hígado o parte del mismo como anteriormente están documentados en la técnica. Por ejemplo, el aislamiento de células hepáticas a partir de tejido hepático es bien conocido desde mediados de los 60 (Howard y col. 1967. *J. Cell. Biol.* 35: 675-84). Se aislaron hepatocitos de rata usando una técnica de digestión mecánica y enzimática combinada modificada posteriormente por Berry y Friend (*J. Cell. Biol.* 43: 506-20, 1969). Esta técnica se desarrolló adicionalmente por Seglen convirtiéndose en la técnica de perfusión con colagenasa en dos etapas usada ampliamente (*Methods Cell. Biol.* 13: 29-83, 1976).

En consecuencia, en una realización, el procedimiento para disociar hígado o parte del mismo para obtener una población (suspensión) de células primarias a partir del mismo es o comprende la técnica de perfusión con colagenasa en dos etapas. Un experto será consciente de que, desde la publicación anterior de dicha técnica, se han descrito y/o son concebibles diversas modificaciones de la misma, y se incluyen en la invención.

A modo de ilustración y no de limitación, sigue una breve descripción de una técnica con colagenasa en dos etapas

común. Para hígados completos, las cánulas pueden disponerse en los vasos sanguíneos mayores del hígado, y fijarse mediante suturas. Para partes o segmentos del hígado, las cánulas pueden disponerse en aberturas de los vasos sanguíneos abiertas sobre la superficie cortada y fijarse mediante suturas. En este caso, habitualmente tienen que sellarse las aberturas de vasos sanguíneos pequeños para evitar escapes de las disoluciones de perfusión por la superficie cortada. Se perfunde el tejido hepático con una disolución tampón exenta de cationes divalentes precalentada a 37°C que contiene un agente quelante de cationes tal como, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido etilenglicoltetraacético (EGTA). Las disoluciones tampón pueden comprender disoluciones salinas tales como, por ejemplo, ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazin-*N'*-etanosulfónico (HEPES), medio E de Williams, disolución salina equilibrada de Hank o disolución salina equilibrada de Earl, y pueden incluir también sales tales como NaCl y KCl, entre otras. Esto conduce a la desestabilización de las estructuras desmosómicas que mantienen juntas las células. Se perfunde entonces el tejido con una disolución tampón que contiene cationes divalentes tales como Ca²⁺ y Mg²⁺ y enzimas degradantes de la matriz que actúan digiriendo el tejido. Las células hepáticas primarias, especialmente hepatocitos, se liberan habitualmente mediante desestabilización mecánica suave, por ejemplo, rascando con un peine, agitando y comprimiendo a través de filtros, por ejemplo filtros de acero inoxidable, estopilla o tela de nailon, para completar mecánicamente el proceso de disociación celular. Dichos filtros pueden tener tamaños de tamiz que permitan el paso de hepatocitos a su través, a modo de ejemplo y no de limitación, de aproximadamente 0,1 mm o más, aproximadamente 0,25 mm o más, aproximadamente 0,50 mm o más, aproximadamente 1 mm o más, o aproximadamente 2 mm, 3 mm, 4 mm o 5mm. Puede usarse una sucesión de filtros con tamaños de tamiz progresivamente menores para disociar gradualmente el tejido y liberar células. Las células disociadas se aclaran con un tampón que contiene inhibidor de proteasa, suero y/o plasma para inactivar la colagenasa y otras enzimas usadas en el proceso de perfusión, se separan mediante centrifugación a baja velocidad, por ejemplo a entre 10 x g y 500 x g (ventajosamente, pueden sedimentarse sustancialmente todas las células vivas, mientras que las células muertas y desechos celulares se eliminan sustancialmente), y se lavan los sedimentos obtenidos con disolución tampón enfriada con hielo para purificar las suspensiones celulares.

El número y calidad de las células hepáticas aisladas puede variar dependiendo, por ejemplo, de la calidad del tejido usado, las composiciones de las disoluciones tampón de perfusión y el tipo y la concentración de enzima. Las enzimas usadas frecuentemente incluyen, pero sin limitación, colagenasa, pronasa, tripsina, dispasa, hialuronidasa, termolisina y pancreatina, y combinaciones de las mismas. La colagenasa es la usada más comúnmente, preparada a menudo a partir de bacterias (por ejemplo, de *Clostridium histolyticum*), y puede consistir a menudo de una combinación poco purificada de enzimas que puede tener una acción enzimática inconsistente. Algunas de las enzimas exhiben actividad proteasa, que puede causar reacciones indeseadas que afecten a la calidad y cantidad de células viables/sanas. Se entiende por los expertos en la técnica que hay que usar enzimas de suficiente pureza y calidad para obtener poblaciones de células hepáticas viables.

Otros procedimientos de recogida de células hepáticas primarias pueden excluir las técnicas de digestión enzimática. Se ha usado ampliamente la desestabilización mecánica, aunque los rendimientos de células hepáticas producidas mediante este enfoque tienden a ser menores que mediante digestión con colagenasa, así como ser menos consistentes. Sin embargo, se han desarrollado con un éxito razonable procedimientos recientes que implican la perfusión con sacarosa-EDTA en combinación con una vibración controlada en un entorno enfriado (Kravchenko y col. 2002. *Cell. Biol. Int.* 26: 1003-1006). La perfusión hepática se efectúa *in situ* usando una disolución de sacarosa que contiene EDTA (pH 7,4). Después de la perfusión, se retira el hígado del cuerpo, se dispone en un disco y se divide finamente en un pequeño volumen de medio enfriado con hielo. Se liberan las células de los fragmentos hepáticos mediante disgregación vibracional mecánica controlada (MVD) usando un motor homogeneizador. La suspensión densa resultante producida mediante este procedimiento puede filtrarse entonces a través de una malla gruesa dando una suspensión inicial de células hepáticas. Las células pueden suspenderse en medio y recuperarse mediante centrifugación. En consecuencia, en una realización, la disociación del hígado o parte del mismo puede ser mediante desestabilización mecánica.

Un experto será consciente de que las técnicas con colagenasa en dos etapas pueden ser particularmente adecuadas para liberar al menos hepatocitos a partir de tejido hepático. Las suspensiones celulares obtenidas usando dicha técnica pueden comprender una proporción considerable de hepatocitos, y pueden contener también otros tipos de células hepáticas. Como se ha mencionado, los presentes inventores han advertido que dichas suspensiones celulares son un material de partida particularmente adecuado para la obtención de la célula progenitora o célula madre de la invención.

En una realización, el procedimiento de disociación de hígado o parte del mismo puede formar una suspensión celular (como podría optimizarse fácilmente por un experto) que comprende al menos un 10%, por ejemplo al menos

un 20%, al menos un 30%, por ejemplo al menos un 40%, al menos un 50%, por ejemplo al menos un 60%, al menos un 70%, por ejemplo al menos un 80% o al menos un 90% o hasta aproximadamente un 100% de células individuales, concretamente células únicas.

5 Como se ha mencionado, disociar tejido hepático proporciona por tanto una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "célula primaria" incluye células presentes en una suspensión de células obtenida a partir de un tejido u órgano de un sujeto, por ejemplo, mediante disociación del mismo (concretamente, una población celular antes de ser sembrada), células presentes en un tejido extraído, ambas de las clases anteriores de células cuando se siembran por primera vez, y células de las suspensiones celulares derivadas de estas células sembradas por primera vez. El término "célula secundaria" designa células en todas las etapas posteriores de cultivo. Por tanto, cuando se someten a pases células primarias sembradas por primera vez, por ejemplo sacadas de la superficie de un sustrato y resembradas, se designan a menudo en la presente memoria como células secundarias, así como todas las células de pases posteriores.

15 La población de células primarias como se define y obtiene en la presente memoria disociando hígado o parte del mismo puede ser típicamente heterogénea, concretamente, puede comprender células que pertenecen a más de un tipo celular que está comprendido en el hígado. Los tipos de células constituyentes del hígado ejemplares incluyen, pero sin limitación, hepatocitos, colangiocitos (células de conducto biliar), células de Kupffer, células estrelladas hepáticas (células de Ito), células ovales y células endoteliales hepáticas. Los términos anteriores tienen significados establecidos en la técnica y se interpreta ampliamente en la presente memoria que engloban cualquier tipo de célula clasificado como tal. Los tipos de célula constituyentes del hígado engloban adicionalmente tanto células hepáticas parenquimáticas como no parenquimáticas.

20 A modo de ilustración adicional pero no de limitación, "hepatocito" engloba células hepáticas epiteliales parenquimáticas incluyendo, pero sin limitación, hepatocitos de diferentes tamaños (por ejemplo, hepatocitos "pequeños", "medianos" y "grandes"), ploidías (por ejemplo, diploides, tetraploides u octaploides) u otras características. Por ejemplo, algunos autores proponen que los hepatocitos "grandes", como definen los mismos, son las células parenquimáticas responsables de las funciones fisiológicas del hígado, mientras que los hepatocitos "pequeños" proporcionan una reserva de células progenitoras asignadas al desarrollo hasta hepatocitos (véase, por ejemplo, Mitaka y col. Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 310-7, 1995). Adicionalmente, a modo de ilustración y no de limitación, "colangiocitos" engloba las células epiteliales de los conductos biliares. También a modo de ilustración y no de limitación, "célula oval" engloba células de morfología (por ejemplo, la forma del núcleo) y expresión de marcadores celulares distintivas, como es conocido en la técnica, que se propone que son células progenitoras capaces, en ciertas condiciones, de dar lugar a hepatocitos y células de conducto biliar (Lowe y col. J. Gastroenterol. Hepatol. 18: 4-12; Yi y col. 1999. J. of Hepatology 31: 497-507).

30 Por tanto, la presente memoria descriptiva describe también una población heterogénea de células hepáticas primarias que puede comprender células de al menos dos, por ejemplo al menos tres o al menos cuatro o más, tipos de célula constituyentes del hígado, por ejemplo células que pertenecen a todos, o sustancialmente todos, los tipos de célula constituyentes del hígado incluyendo, pero sin limitación, los tipos de célula hepática enumerados anteriormente. Un experto apreciará que la población heterogénea puede comprender tipos de célula hepática que se han descrito anteriormente como tales, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como tipos de célula hepática que no se han descrito, clasificado, aislado y/o caracterizado anteriormente en la técnica.

35 Un experto apreciará también que la población celular heterogénea puede comprender, pero no es necesario, diversos tipos de célula hepática en las mismas, o sustancialmente las mismas, proporciones relativas que están presentes en el hígado o parte del mismo que se ha disociado. Por ejemplo, un experto sabe que las maneras particulares de disociar tejidos hepáticos pueden conducir a un aislamiento más eficaz de uno o más tipos de célula en comparación con uno o más tipos de célula distintos, con lo que la suspensión celular obtenida puede estar enriquecida inadvertida o intencionalmente en el uno o más tipos de célula anteriores. Además, algunos procedimientos de disociación pueden afectar de forma diferente a la supervivencia y/o viabilidad de los diferentes tipos de célula hepática. También, un experto será bien consciente de los procedimientos de la técnica para enriquecer una población celular obtenida disociando hígado o parte del mismo en uno o más tipos de célula hepática deseada. Dichos procedimientos incluyen, pero sin limitación, centrifugación diferencial, centrifugación por gradiente de densidad de flotación, filtración, elutriación celular, purificación por afinidad, digestión con proteasa o similares.

También según la presente memoria descriptiva, la población heterogénea de células hepáticas primarias puede comprender células que pertenecen a todos o sustancialmente todos los tipos de célula constituyentes del hígado. Los presentes inventores desarrollaron un procedimiento para obtener un tipo anteriormente no dado a conocer de célula progenitora o célula madre a partir de hígado. No obstante, los inventores no desean ligarse a hipótesis alguna en cuanto al origen de dicha célula progenitora o célula madre novedoso.

A modo de ejemplo y no de limitación, dicha célula progenitora o citoblasto, o ancestro del mismo, puede haber estado presente en el hígado, por ejemplo en el parénquima o no en el parénquima del mismo. Por ejemplo, dicho ancestro puede haber tenido un fenotipo idéntico, similar o diferente a la célula progenitora o célula madre aislada (por ejemplo, cultivar como se describe en la presente memoria puede haber alterado el fenotipo del ancestro). Como alternativa, o además, la célula progenitora o célula madre aislada puede haber surgido debido a la alteración, por ejemplo diferenciación o desdiferenciación, de uno o más tipos de célula hepática, por ejemplo un tipo de célula hepática conocido anteriormente o no. A la vista de ello, el procedimiento de la presente invención puede comenzar preferiblemente a partir de una población celular representativa de todos o sustancialmente todos los tipos de célula hepática.

Los inventores han advertido que la célula progenitora o célula madre de la invención puede obtenerse ventajosamente a partir de una población celular formada disociando hígado o parte del mismo, en el que dicha población celular comprende hepatocitos. Por tanto, un procedimiento adecuado para disociar hígado o parte del mismo según la invención forma una población celular que comprende hepatocitos. Sin ligarse a teoría alguna, los inventores creen que la célula progenitora o célula madre de la invención, o un ancestro del mismo, se libera conjuntamente a partir de tejido hepático disociando el hígado de manera que se liberen al menos hepatocitos a partir del hígado.

En una realización, el procedimiento de disociación de hígado o parte del mismo puede formar una población celular que comprende una proporción de hepatocitos que es de al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, preferiblemente al menos aproximadamente un 50%, por ejemplo al menos un 60%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 70%, por ejemplo al menos un 80%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% o más, tal como al menos un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98% o al menos aproximadamente un 99%. Los inventores advirtieron que el procedimiento de disociación de hígado o parte del mismo que forma una población celular que comprende una proporción sustancial de hepatocitos, por ejemplo al menos aproximadamente un 50% o más como anteriormente, proporciona una población celular de partida adecuada para obtener la célula progenitora o célula madre de la invención.

La presente memoria descriptiva describe también que puede obtenerse una población celular que comprende las proporciones anteriores de hepatocitos disociando hígado o parte del mismo, sin incluir etapas de enriquecimiento adicional de la población celular en hepatocitos y/u otros tipos de célula.

La presente memoria descriptiva describe también que puede obtenerse una población celular que comprende las proporciones anteriores de hepatocitos disociando hígado o parte del mismo y una o más etapas adicionales para enriquecer la población celular en hepatocitos y/u otros tipos de célula, especialmente hepatocitos. Sin embargo, un experto apreciará que, aunque la célula progenitora o célula madre como se usa en la presente memoria, o ancestro del mismo, puede liberarse a partir del hígado en condiciones de disociación adecuadas para la liberación de hepatocitos a partir del mismo, puede purificarse simultáneamente, pero no necesariamente siempre, con hepatocitos o uno o más subgrupos de hepatocitos (por ejemplo, hepatocitos “grandes” o “pequeños”) u otros tipos de célula, en procedimientos para enriquecer una población celular en hepatocitos, subgrupos de los mismos u otros tipos de célula. Está dentro de la capacidad de un experto seleccionar los procedimientos para enriquecer hepatocitos u otros tipos de célula, especialmente hepatocitos, que retengan la célula progenitora o célula madre como se describe en la presente memoria, o ancestro del mismo, en la población celular resultante.

Además, un experto entenderá que la célula progenitora o célula madre como se describe en la presente memoria, o un ancestro del mismo, puede tener ciertas propiedades (por ejemplo, propiedades físicas o de expresión de marcador de superficie) que pueden permitir su enriquecimiento en la población celular obtenida a partir de hígado, usando una técnica de separación adecuada. Puede estar dentro del alcance de un experto determinar qué fracción de una población celular separada basándose en uno o más criterios comprende, o está enriquecida en, la célula progenitora o célula madre como se describe en la presente memoria, o un ancestro del mismo. Esto puede hacerse, por ejemplo, cultivando células de las diversas fracciones de ensayo según el procedimiento de la invención y determinando cuáles fracciones proporcionan la célula progenitora o célula madre de la invención. Una

“población enriquecida” de células designa una población de células en que están presentes uno o más tipos de célula en proporciones relativas mayores que lo que podría encontrarse *in vivo* o en la población celular sometida a enriquecimiento.

5 Siembra de células primarias procedentes de tejido hepático

El procedimiento de la invención comprende cultivar la población de células primarias obtenida disociando tejido hepático como se explica. Con este objetivo, se siembra la población primaria de células hepáticas sobre un sustrato que permita la adherencia de las células al mismo.

10 El término “siembra” se usa en la presente memoria como sinónimo de diseminación o inoculación, y designa generalmente introducir una población celular en un entorno *in vitro* capaz de promover la supervivencia y/o el crecimiento de las células introducidas. Típicamente, dicho entorno puede proporcionarse en un sistema que esté adecuadamente delimitado de los alrededores, de tal modo que pueda evitar un intercambio indeseado de material
15 entre dicho entorno y los alrededores (evitando así, por ejemplo, la contaminación del entorno o el escape de medio de cultivo o células del mismo), mientras que puede permitir un intercambio continuo o intermitente de otros componentes materiales útiles entre dicho entorno y los alrededores (por ejemplo, un intercambio ocasional de parte o todo el medio de cultivo, el intercambio continuo de gases o la recogida de células después del cultivo, etc.). Habitualmente, pueden generarse entornos adecuados para el cultivo de células en recipientes de cultivo bien
20 conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, matraces de cultivo celular, placas de pocillos y discos de diversos formatos.

En la presente invención, se siembran células (por ejemplo, células hepáticas primarias) sobre un sustrato que permita la adherencia de las células al mismo, concretamente, una superficie que no sea en general repulsora de la
25 adhesión o unión celular. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, sembrando las células en un sistema de cultivo (por ejemplo un recipiente de cultivo) que presente una o más superficies de sustrato compatibles con la adhesión celular. Cuando dichas una o más superficies de sustrato entran en contacto con la suspensión de células (por ejemplo, suspensión en un medio) introducida en el sistema de cultivo, puede seguir una adhesión celular entre las células y las superficies del sustrato. En consecuencia, el término “sembrar sobre un sustrato que permita la
30 adherencia de células sobre el mismo” designa introducir células en un sistema de cultivo que ofrezca al menos una superficie de sustrato que sea en general compatible con la adherencia de las células al mismo, de tal modo que las células sembradas puedan entrar en contacto con dicha superficie de sustrato. Los principios generales de mantenimiento de cultivos de células adherentes son bien conocidos en la técnica.

35 Generalmente, un sustrato que permita la adherencia de células al mismo puede ser cualquier sustrato sustancialmente hidrófilo. Como es conocido en la técnica, los recipientes de cultivo, por ejemplo matraces de cultivo, placas de pocillos, discos o similares, pueden estar hechos habitualmente de una gran variedad de materiales poliméricos incluyendo, pero sin limitación, poliácridatos, polimetacrilatos, policarbonatos, poliestirenos,
40 polisulfonas, polihidroxiácidos, polianhídridos, poliortoésteres, polifosfazenos, polifosfatos, poliésteres, nailones o mezclas de los mismos, etc. En general, los recipientes de cultivo hechos de dichos materiales se tratan en superficie después del moldeo para proporcionar superficies de sustrato hidrófilas y potenciar así la probabilidad de una unión celular eficaz. El tratamiento de superficie puede tomar la forma de un recubrimiento de superficie, o puede implicar el uso de energía dirigida a la superficie con la intención de generar grupos químicos sobre la superficie polimérica. Estos grupos químicos tendrán una afinidad genérica por el agua o exhibirán de otro modo
45 suficiente polaridad para permitir una adsorción estable con otro grupo polar. Estos grupos funcionales conducen a hidrofilia y/o a un aumento del oxígeno de superficie, y son propiedades reconocidas por potenciar el crecimiento celular sobre las superficies de sustrato así modificadas. Dichos grupos químicos pueden incluir grupos tales como aminas, amidas, carbonilos, carboxilatos, ésteres, hidroxilos, sulfhidrilos y similares. Los ejemplos de energía dirigida incluyen descarga en corona atmosférica, tratamiento con plasma a vacío con radiofrecuencia (RF) y descarga
50 luminiscente o tratamiento con plasma a CC (por ejemplo, documento US 6.617.152). La práctica estándar actual para cultivar células adherentes puede implicar el uso de medios químicos definidos con adición de suero bovino, humano o de otro animal. El suero añadido, además de proporcionar nutrientes y/o promotores del crecimiento, puede promover también la adhesión celular al recubrir las superficies de plástico tratado con una capa de matriz a la que las células pueden adherirse mejor.

55 Una superficie de sustrato alternativa compatible con la adhesión celular puede ser vidrio, opcionalmente tratado en superficie para introducir grupos funcionales, por ejemplo como se enumeran anteriormente, para aumentar la hidrofilia del mismo.

Pueden generarse otras superficies de sustrato adherentes mediante recubrimiento de superficie, por ejemplo, recubrimiento de las superficies poliméricas o poliméricas tratadas como anteriormente. En un ejemplo no limitante, el recubrimiento puede implicar policondicionamientos adecuados tales como, por ejemplo, poliornitina o polilisina.

5 En otro ejemplo, el recubrimiento preferido, y en consecuencia el sustrato, comprende uno o más componentes de matriz extracelular, por ejemplo, las proteínas de MEC fibrina, laminina, colágeno, preferiblemente colágeno de tipo 1, glucosaminoglucanos, por ejemplo heparina o sulfato de heparano, fibronectina, gelatina, vitronectina, elastina, tenascina, agrecano, agrina, sialoproteína ósea, proteína de matriz de cartílago, fibrinógeno, fibulina, mucinas, entactina, osteopontina, plasminógeno, restrictina, serglicina, SPARC/osteonectina, versicano, trombospondina 1 o moléculas de adhesión celular incluyendo cadherinas, conexinas o selectinas, por sí mismas o en diversas combinaciones.

10 Los ejemplos preferidos pueden incluir fibrina, laminina o colágeno. Los ejemplos preferidos adicionales pueden implicar composiciones que comprenden componentes de la MEC tales como, por ejemplo, Matrigel® Basement Membrane Matrix (BD Biosciences), que es una preparación de membrana basal solubilizada extraída de sarcoma de ratón EHS, un tumor rico en proteínas de la MEC, con laminina como componente principal, seguido de colágeno de tipo 4, sulfato de heparano, proteoglucanos y entactina.

15 Según la invención, el recubrimiento consiste en o comprende colágeno de tipo 1.

20 Como se aprecia por los expertos en la técnica, las células pueden contarse para facilitar la siembra posterior de las células a una densidad deseada. Cuando, como en la presente invención, las células después de la siembra pueden adherirse principalmente a una superficie de sustrato presente en el sistema de cultivo (por ejemplo, en un recipiente de cultivo), la densidad de siembra puede expresarse como el número de células sembradas por mm² o cm² de dicha superficie de sustrato. En la presente invención, la densidad de siembra de las células primarias obtenidas por disociar hígado o parte del mismo puede estar entre 1 célula/mm² y 1x10⁸ células/mm², por ejemplo entre 1x10¹ y 1x10⁵ células/mm² o entre 1x10² y 1x10⁵ células/mm², por ejemplo entre 1x10³ y 1x10⁵ células/mm², entre 5x10³ y 5x10⁴ células/mm², entre 1x10¹ y 1x10³ células/mm², entre 1x10² y 1x10⁴ células/mm², por ejemplo aproximadamente 1x10¹, 5x10¹, 1x10², 5x10², 1x10³, 5x10³, 6x10³, 7x10³, 8x10³, 9x10³, 1x10⁴, 2x10⁴, 3x10⁴, 4x10⁴, 5x10⁴ o 1x10⁵ células/mm².

25 Típicamente, después de sembrar las células hepáticas primarias, se deja la suspensión celular en contacto con la superficie adherente para permitir la adherencia de células de la población celular a dicho sustrato. Al poner en contacto las células hepáticas primarias con sustrato adherente, las células pueden suspenderse ventajosamente en un entorno que comprende al menos un medio, en los procedimientos de la invención típicamente un medio líquido, que apoya la supervivencia y/o crecimiento de las células. El medio puede añadirse al sistema antes, junto con o después de la introducción de las células al mismo. El medio puede ser reciente, concretamente no usado anteriormente para cultivar células, o puede comprender al menos una porción que se ha acondicionado mediante cultivo previo de las células en el mismo, por ejemplo, cultivo de las células que se están sembrando o ancestros de las mismas, o cultivo de células relacionadas más lejanamente o no relacionadas con las células que se están sembrando.

30 Para facilitar dicha adherencia, la presente memoria descriptiva describe que la suspensión de células primarias puede ponerse en contacto con la superficie adherente durante al menos aproximadamente 0,5 h, por ejemplo durante al menos aproximadamente 1 h, preferiblemente durante al menos aproximadamente 2 h, por ejemplo durante al menos aproximadamente 4 h, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 8 h, durante al menos aproximadamente 12 h, aún más preferiblemente durante al menos aproximadamente 16 h, por ejemplo durante al menos aproximadamente 20 h y lo más preferiblemente durante al menos aproximadamente 24 h o más, por ejemplo durante al menos aproximadamente 28, 32, 36, 40, 44 o 48 h.

35 La presente memoria descriptiva describe adicionalmente que la suspensión de células primarias puede ponerse en contacto con la superficie adherente durante entre aproximadamente 2 h y aproximadamente 48 h, por ejemplo durante entre aproximadamente 12 h y aproximadamente 48 h, preferiblemente durante entre aproximadamente 12 h y aproximadamente 36 h, por ejemplo durante entre aproximadamente 16 h y aproximadamente 32 h, aún más preferiblemente durante entre aproximadamente 20 h y aproximadamente 28 h, y lo más preferiblemente durante aproximadamente 24 h.

40 Según la invención, las células de la población de células primarias se permiten adherir al sustrato durante 24 h.

Después de permitir a las células de la población de células hepáticas primarias unirse al sustrato adherente como se describe anteriormente, se retira el material no adherente del sistema de cultivo. El material no adherente puede comprender, pero sin limitación, células que no se han unido al sustrato adherente (tales como, por ejemplo, células que no tienden a la adherencia, o células que no se unieron al cabo del tiempo permitido para ello), células no viables o muertas, desechos celulares, etc. El material no adherente puede retirarse típicamente desechando el medio del sistema de cultivo, con lo que las células adherentes permanecen unidas al sustrato, y opcionalmente lavando, una vez o repetidamente, las células adherentes y el sistema de cultivo con medio o tampón isotónico adecuado (por ejemplo, PBS). Así, las células de la población de células hepáticas primarias que se han adherido a la superficie del sustrato se seleccionan para cultivo adicional.

El entorno en el que se siembran las células y se permiten unirse puede comprender al menos un medio, en los procedimientos de la invención típicamente un medio líquido, que apoya la supervivencia y/o crecimiento de las células. El medio puede añadirse al sistema antes, junto con o después de la introducción de las células al mismo. El medio puede ser reciente, concretamente no usado anteriormente para el cultivo de células, o puede comprender al menos una porción que se ha acondicionado mediante cultivo anterior de células en el mismo, por ejemplo, cultivo de las células que se están sembrando o ancestros de las mismas, o cultivo de células relacionadas más lejanamente o no relacionadas con las células que se están sembrando. El medio puede ser un medio de cultivo adecuado como se describe en otro lugar de esta memoria descriptiva. Preferiblemente, la composición del medio puede tener los siguientes rasgos, puede ser la misma o sustancialmente la misma que la composición del medio usado en las etapas siguientes de cultivo de las células unidas. De otro modo, el medio puede ser diferente. Ventajosamente, el medio puede comprender suero o plasma, que pueden facilitar adicionalmente la adherencia celular.

Según la invención, el medio es medio E de Williams, que comprende preferiblemente 10% (v/v) de suero de ternera fetal, EGF preferiblemente 25 mg/ml, insulina preferiblemente 10 µg/ml y dexametasona preferiblemente 1 µM.

Cultivo de células primarias a partir de tejido hepático

Se cultivan posteriormente células de la población de células primarias que se han adherido a dicho sustrato, preferiblemente en dicho entorno, durante al menos 7 días, por ejemplo durante al menos 8 días o durante al menos 9 días, preferiblemente durante al menos 10 días, por ejemplo al menos 11 o al menos 12 días, al menos 13 días o al menos 14 días, más preferiblemente durante al menos 15 días, por ejemplo durante al menos 16 días o durante al menos 17 días o incluso durante al menos 18 días, por ejemplo durante al menos 19 días o al menos 20 días o más. El término "cultivar" es común en la técnica y designa ampliamente el mantenimiento y/o crecimiento de células y/o la progenie de las mismas.

En realizaciones, las células primarias pueden cultivarse durante al menos entre aproximadamente 10 días y aproximadamente 40 días, preferiblemente durante al menos entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 35 días, por ejemplo durante al menos aproximadamente 15 días y 20 días, tal como durante al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días. Preferiblemente, las células primarias pueden cultivarse así durante no más de 60 días, o no más de 50 días o no más de 45 días.

Como aprecian los expertos en la técnica, el cultivo prolongado de células en un sistema de cultivo puede necesitar un cambio regular del medio de cultivo por un medio reciente. Un experto es capaz de valorar la necesidad de cambio de medio inspeccionando los parámetros de cultivo celular tales como, por ejemplo, el pH del mismo, la densidad celular o la apariencia celular. Típicamente, el medio puede cambiarse a intervalos regulares, por ejemplo cada 1 a 10 días, preferiblemente entre 16 y 32 horas (por ejemplo, aproximadamente 24 horas) después de sembrar y entonces preferiblemente cada 2 a 6 días, o más preferiblemente cada 2 a 4 días, por ejemplo aproximadamente cada 2, 3 o 4 días. Puede cambiarse el volumen completo de medio o, como alternativa, puede cambiarse solo parte del medio, de tal modo que se retenga una porción del medio acondicionado mediante el cultivo previo de las células. En una realización, se cambia sustancialmente todo el volumen de medio por medio reciente. En otra realización preferida, el medio no se cambia durante un cultivo prolongado de las células.

La suspensión de células primarias y las células adherentes posteriores se cultivan en presencia de un medio de cultivo líquido. Típicamente, el medio comprenderá una formulación de medio basal como es conocida en la técnica. Pueden usarse muchas formulaciones de medio basal (disponibles, por ejemplo, en la American Type Culture Collection, ATCC; o en Invitrogen, Carlsbad, California) para cultivar las células primarias en el mismo incluyendo, pero sin limitación, medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo modificado α (α -MEM), medio esencial basal (BME), medio de Dulbecco modificado por

5 Iscove (IMDM), medio BGJb, medio nutriente F-12 (Ham), Liebovitz L-15, DMEM/F-12, medio de Eagle esencial modificado (EMEM), RPMI-1640, medio 199, MB 752/1 de Weymouth o medio E de Williams y modificaciones y/o combinaciones de los mismos. Las composiciones de los medios basales anteriores son conocidas en general en la técnica y están dentro de la experiencia de un experto en la técnica modificar o modular las concentraciones de medios y/o medios complementados según sea necesario para las células cultivadas. Según la invención, la formulación de medio basal es medio E de Williams, que es una formulación rica que se ha notificado que sustenta el cultivo *in vitro* de células hepáticas adultas. La presente memoria descriptiva describe también formulaciones de medios basales adicionales tales como las elegidas de las anteriores.

10 Dichas formulaciones de medios basales contienen los ingredientes necesarios para el desarrollo de células de mamífero que son conocidos *per se*. A modo de ilustración y no de limitación, estos ingredientes pueden incluir sales inorgánicas (en particular sales que contienen Na, K, Mg, Ca, Cl, P y posiblemente Cu, Fe, Se y Zn), tampones fisiológicos (por ejemplo, HEPES, bicarbonato), nucleótidos, nucleósidos y/o bases de ácido nucleico, ribosa, desoxirribosa, aminoácidos, vitaminas, antioxidantes (por ejemplo glutatión) y fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, piruvato, por ejemplo piruvato de sodio, acetato, por ejemplo acetato de sodio), etc. Resultará también evidente que muchos medios están disponibles como formulaciones pobres en glucosa con o sin piruvato de sodio.

15 Para uso en cultivo, pueden suministrarse a los medios basales uno o más componentes adicionales. Por ejemplo, pueden usarse complementos adicionales para suministrar a las células los elementos traza necesarios y sustancias para un crecimiento y expansión óptimos. Dichos complementos incluyen insulina, transferrina, sales de selenio y combinaciones de los mismos. Estos componentes pueden incluirse en una disolución salina tal como, pero sin limitación, disolución salina equilibrada de Hanks (HBSS) o disolución salina de Earle. Pueden añadirse complementos antioxidantes adicionales, por ejemplo, β -mercaptoetanol. Aunque muchos medios basales contienen ya aminoácidos, pueden complementarse con algunos aminoácidos después, por ejemplo L-glutamina, que es conocida por ser menos estable en disolución. Pueden suministrarse adicionalmente a un medio compuestos antibióticos y/o antimicóticos tales como, típicamente, mezclas de penicilina y estreptomina y/u otros compuestos ejemplificados, pero sin limitación, por anfotericina, ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, ácido micofenólico, ácido nalidíxico, neomicina, nistatina, paromomicina, polimixina, puromicina, rifampicina, espectinomicina, tetraciclina, tilosina y zeocina.

20 También pueden usarse ventajosamente hormonas en el cultivo celular e incluyen, pero sin limitación, D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormona de crecimiento humano (HGH), tirotrópina, tiroxina, L-tironina, factor de crecimiento epitelial (EGF) y factor de crecimiento de hepatocito (HGF). Las células hepáticas pueden beneficiarse también del cultivo con triyododitironina, acetato de α -tocoferol y glucagón.

25 Pueden usarse también lípidos y portadores lipídicos para complementar medios de cultivo celular. Dichos lípidos y portadores pueden incluir, pero sin limitación, ciclodextrina, colesterol, ácido linoleico conjugado con albúmina, ácido linoleico y ácido oleico conjugados con albúmina, ácido linoleico no conjugado, ácido linoleico-oleico-araquidónico conjugado con albúmina, ácido oleico no conjugado y conjugado con albúmina, entre otros. La albúmina puede usarse de forma similar en formulaciones exentas de ácidos grasos.

30 Se contempla también la complementación del medio de cultivo celular con plasma o suero de mamífero. El plasma o suero a menudo contienen factores y componentes celulares que son necesarios para la viabilidad y multiplicación. El uso de reemplazos de suero adecuados está también contemplado.

35 El término "plasma" es como se define convencionalmente. El plasma se obtiene habitualmente a partir de una muestra de sangre entera, a la que se proporciona o se pone en contacto con un anticoagulante tal como heparina, citrato (por ejemplo, citrato de sodio o citrato ácido de dextrosa), oxalato o EDTA, al extraer la muestra de sangre o poco después para evitar la coagulación. Posteriormente, se separan los componentes celulares de la muestra de sangre del componente líquido (plasma) mediante una técnica apropiada, típicamente mediante centrifugación. El término "plasma" designa por lo tanto una composición que no forma parte de un cuerpo humano o animal.

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

coagulación e incluyen adicionalmente un gel de densidad diseñada para disponerse entre el componente líquido y el coágulo y los componentes celulares después de la centrifugación, simplificando por tanto la separación. Como alternativa, el suero puede obtenerse a partir del plasma retirando anticoagulante y fibrina. El término "suero" designa por lo tanto una composición que no forma parte de un cuerpo humano o animal.

5 El plasma o suero aislados pueden usarse directamente en los procedimientos de la presente invención. Pueden almacenarse también apropiadamente para un uso posterior en el procedimiento de la presente invención. Típicamente, el plasma o suero puede almacenarse durante periodos cortos de tiempo, por ejemplo de hasta aproximadamente 1-2 semanas, a una temperatura por encima de los puntos de congelación respectivos de plasma o suero, pero por debajo de la temperatura ambiente. Habitualmente, esta temperatura será de aproximadamente 15°C o menos, preferiblemente de aproximadamente 10°C o menos, más preferiblemente de aproximadamente 5°C o menos, por ejemplo, de aproximadamente 5°C, 4°C, 3°C, 2°C o aproximadamente 1°C, lo más preferiblemente de aproximadamente 5°C o aproximadamente 4°C. Como alternativa, el plasma o suero pueden almacenarse a temperaturas por debajo de sus puntos de congelación respectivos, concretamente mediante almacenamiento en congelador. Como es habitual en la técnica, las temperaturas ventajosas para el almacenamiento en congelador de plasma o suero pueden ser de aproximadamente -70°C o menos, por ejemplo de aproximadamente -75°C o menos o de aproximadamente -80°C o menos. Dichas temperaturas pueden evitar ventajosamente cualquier descongelación del plasma o suero almacenado, conservando así la calidad del mismo. El almacenamiento en congelador puede usarse independientemente del periodo de tiempo durante el que sea necesario almacenar el plasma o suero, pero puede ser particularmente adecuado si se requiere un almacenamiento largo, por ejemplo durante más de unos pocos días o durante más de 1-2 semanas.

25 Antes del almacenamiento o uso, el plasma o suero aislado puede inactivarse térmicamente. La inactivación térmica se usa en la técnica principalmente para retirar el complemento. Por tanto la inactivación térmica implica típicamente incubar el plasma o suero a 56°C durante 30 a 60 min, por ejemplo 30 min, con agitación sostenida, después de lo cual se permite enfriar gradualmente el plasma o suero hasta temperatura ambiente. Un experto será consciente de cualquier modificación y requisito común del procedimiento anterior.

30 Opcionalmente, el plasma o suero puede esterilizarse también antes del almacenamiento o uso. Los medios habituales de esterilización pueden implicar, por ejemplo, filtración a través de uno o más filtros de tamaño de poro menor de 1 µm, preferiblemente menor de 0,5 µm, por ejemplo menor de 0,45 µm, 0,40 µm, 0,35 µm, 0,30 µm o 0,25 µm, más preferiblemente de 0,2 µm o menor, por ejemplo 0,15 µm o menor, 0,10 µm o menor.

35 Los sueros o plasmas adecuados para uso en los medios como se describen en la presente memoria pueden incluir suero o plasma humano, o suero o plasma de animales no humanos, preferiblemente mamíferos no humanos tales como, por ejemplo, primates no humanos (por ejemplo, lémures, monos, simios, etc.), suero o plasma fetal o adulto bovino, de caballo, porcino, de cordero, de cabra, de perro, de conejo, de ratón o rata, etc. En otra realización, la invención prevé el uso de cualquiera combinación de los plasmas y/o sueros anteriores.

40 La presente memoria descriptiva describe que el suero o plasma pueden obtenerse a partir de un organismo de la misma especie que la especie de la que se obtienen las células hepáticas primarias. En un ejemplo no limitante, puede usarse suero o plasma humano para cultivar células hepáticas humanas primarias.

45 Según la invención, el medio comprende suero o plasma bovino, preferiblemente suero o plasma fetal bovino (de ternero), más preferiblemente suero fetal bovino (de ternero) (FCS o FBS).

50 En un aspecto de la invención, el medio usado para cultivar células hepáticas primarias comprende suero o plasma bovino, preferiblemente suero o plasma fetal bovino (de ternero), más preferiblemente suero fetal bovino (de ternero) (FCS o FBS).

55 En realizaciones, el medio comprende entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 40% (v/v) de suero o plasma o suero de reposición, preferiblemente entre aproximadamente un 5% y un 20% (v/v), por ejemplo entre aproximadamente un 5% y un 15% (v/v), más preferiblemente entre aproximadamente un 8% (v/v) y aproximadamente un 12% (v/v), por ejemplo aproximadamente un 10% (v/v) de suero o plasma o suero de reposición, especialmente el suero o plasma como se define anteriormente.

En una realización preferida adicional, el medio usado para cultivar células hepáticas humanas primarias comprende un suero o plasma bovino, preferiblemente suero o plasma fetal bovino (de ternero), más preferiblemente suero fetal bovino (de ternero) (FCS o FBS), en una cantidad de entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 40%

(v/v), preferiblemente entre aproximadamente un 5% y un 20% (v/v), por ejemplo entre aproximadamente un 5% y un 15% (v/v), más preferiblemente entre aproximadamente un 8% (v/v) y aproximadamente un 12% (v/v), por ejemplo aproximadamente un 10%.

5 La presente memoria descriptiva describe adicionalmente que un medio puede comprender plasma o suero derivado de más de una especie. Por ejemplo, el medio puede comprender una mezcla de suero o plasma derivado de una especie correspondiente a las células hepáticas primarias cultivadas y de otra especie. Por ejemplo, un medio para cultivar células hepáticas humanas puede comprender una mezcla de plasma o suero humano, preferiblemente suero humano, y plasma o suero bovino, preferiblemente suero bovino.

10 Adicionalmente, el medio puede comprender adicionalmente un factor de crecimiento añadido exógenamente (concretamente, además del plasma o suero). Un experto apreciaría que los componentes ordinarios de los medios basales (antes de la adición de suero o plasma), por ejemplo particularmente, disolución salina isotónica, tampones, sales inorgánicas, aminoácidos, fuentes de carbono, vitaminas, antioxidantes, indicadores del pH y antibióticos, no se consideran factores de crecimiento ni factores de diferenciación en la técnica. Por otro lado, el suero o plasma es una composición compleja que comprende posiblemente uno o más de dichos factores de crecimiento o factores de diferenciación.

15 El término “factor de crecimiento” como se usa en la presente memoria designa una sustancia biológicamente activa que influye en la proliferación, crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración de diversos tipos de células, y puede efectuar cambios de desarrollo, morfológicos y funcionales en un organismo solo o cuando se modula por otras sustancias. Un factor de crecimiento puede actuar típicamente uniéndose, como ligando, a un receptor (por ejemplo, receptor de superficie o intracelular) presente en células sensibles al factor de crecimiento. Un factor de crecimiento de la presente memoria puede ser particularmente una entidad proteica que comprende una o más cadenas polipeptídicas.

20 A modo de ejemplo y no de limitación, el término “factor de crecimiento” engloba los miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP), la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF), la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), la familia del factor de crecimiento relacionado con insulina (IGF), la familia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), los factores de crecimiento hematopoyéticos (HeGFs), el factor de crecimiento de células endoteliales derivadas de plaquetas (PD-ECGF), angiopoyetina, la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), glucocorticoides y similares.

25 En un aspecto de la invención, el medio comprende factor de crecimiento epidérmico (EGF). La presente memoria descriptiva describe también que el medio comprende un factor de crecimiento que es un miembro de la familia del EGF, en el que dicho miembro de la familia del EGF es cualquiera elegido del grupo constituido por anfirregulina, betacelulina, EGF, epirregulina, HB-EGF (factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina, NRG1 (neurregulina 1) isoforma GGF2, NRG1 isoforma SMDF, NRG1- α , NRG1- β , TGF α , tomorregulina 1 y TMEFF2.

30 También según la invención, el medio comprende insulina. La presente memoria descriptiva describe también que el medio comprende un factor de crecimiento que es un miembro de la familia del factor de crecimiento relacionado con insulina (IGF), en el que dicho miembro de la familia del IGF es cualquiera elegido del grupo constituido por insulina, IGF1A (factor de crecimiento de tipo insulina 1A), IGF1B, IGF2, INSL3 (de tipo insulina 3), INSL5, INSL6 y relaxina.

35 La presente memoria descriptiva describe adicionalmente que el medio comprende un factor de crecimiento que es un glucocorticoide elegido del grupo constituido por dexametasona, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, triamcinolona, corticosterona, fluocinolona, cortisona y betametasona en un aspecto de la invención.

40 La presente memoria descriptiva describe también que el medio puede comprender una combinación de dos cualquiera o más factores de crecimiento añadidos exógenamente o factores de crecimiento preferidos como se definen anteriormente. A modo de ejemplo y no de limitación, el medio puede comprender EGF e insulina, o EGF y dexametasona, o insulina y dexametasona o cada uno de EGF, insulina y dexametasona; un medio que comprende estos factores de crecimiento añadidos exógenamente puede comprender preferiblemente suero o plasma como se define en las realizaciones anteriores.

45 Un experto es generalmente conocedor de las concentraciones en que los factores de crecimiento particulares pueden inducir un efecto, especialmente sobre células cultivadas *in vitro*, y puede usar dichas concentraciones para

los factores de crecimiento anteriormente enumerados. A modo de ejemplo y no de limitación, el EGF puede usarse típicamente a una concentración entre aproximadamente 0,1 ng/ml y 1 µg/ml, y preferiblemente entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, preferiblemente a aproximadamente 25 ng/ml; la insulina puede usarse típicamente a concentraciones entre aproximadamente 0,1 µg/ml y 1 mg/ml y preferiblemente entre aproximadamente 1 µg/ml y 100 µg/ml, preferiblemente aproximadamente a 10 µg/ml; la dexametasona puede usarse típicamente a concentraciones entre aproximadamente 0,1 nM y 1 µM, preferiblemente 1 µM.

En una realización preferida, el factor de crecimiento usado en el presente procedimiento puede ser un factor de crecimiento humano. Como se usa en la presente memoria, el término "factor de crecimiento humano" designa un factor de crecimiento sustancialmente igual que un factor de crecimiento humano de origen natural. Por ejemplo, cuando el factor de crecimiento es una entidad proteica, el o los péptidos o polipéptidos constituyentes del mismo pueden tener una secuencia aminoacídica primaria idéntica a un factor de crecimiento humano de origen natural. Se prefiere el uso de factores de crecimiento humanos en el presente procedimiento, ya que se espera que dichos factores de crecimiento desencadenen un efecto deseable sobre la función celular.

Como se ha descrito, los presentes inventores han advertido que cultivando células hepáticas primarias durante periodos de tiempo como se han definido anteriormente, y usando preferiblemente composiciones de medios como se han descrito anteriormente, emerge y prolifera una célula progenitora o célula madre de la invención, mientras que los tipos de célula hepática diferenciados se vuelven menos prevalentes en el cultivo prolongado de las células hepáticas primarias. Sin limitarse a hipótesis alguna, los tipos de célula hepática diferenciados pueden, por ejemplo, no conseguir proliferar, morir y/o retrodiferenciarse durante el cultivo prolongado. Como se detalla en la sección experimental, la célula progenitora o célula madre puede distinguirse de los demás tipos de célula presentes en el cultivo de células primarias, entre otras cosas, por su morfología, que, según el conocimiento de los inventores, puede denotarse como morfología mesenquimática o de tipo mesenquimal y puede comprender típicamente una forma aplanada, citoplasma amplio y núcleos ovoides con uno o dos nucleolos.

Los inventores han advertido también que la emergencia, proliferación y enriquecimiento del cultivo primario con dicha célula progenitora o célula madre puede promoverse adicionalmente alterando el medio de cultivo de modo que éste favorezca la eliminación adicional de uno o más tipos de célula hepática diferenciada, especialmente de hepatocitos que pueden prevalecer en un cultivo de células hepáticas primarias aisladas. En dichas condiciones, la célula progenitora o célula madre de la invención puede proliferar ventajosamente y volverse el tipo de célula prevalente en el cultivo de células hepáticas primarias. Los tipos de célula hepática diferenciados pueden perderse, por ejemplo, debido a que uno o más tipos celulares diferenciados se reducen o eliminan físicamente durante el cultivo; como alternativa, los fenotipos diferenciados pueden reducirse debido a uno o más tipos celulares se retrodiferencian durante el cultivo.

La presente memoria descriptiva describe también por lo tanto que puede usarse cualquier medio que favorezca la eliminación de uno o más tipos de célula hepática diferenciada, especialmente hepatocitos, sustentando la proliferación de la célula progenitora o célula madre de la invención (como puede juzgarse fácilmente, por ejemplo, mediante inspección visual en el cultivo celular de la prevalencia de los diferentes tipos de célula). A modo de ilustración, como se ejemplifica por los inventores, una alteración puede ser el uso de un medio basal que comprende una alta concentración de glucosa, por ejemplo, una concentración entre 3000 mg/l y 6000 mg/l, preferiblemente entre 4000 mg/l y 5000 mg/l, y típicamente de aproximadamente 4500 mg/l. Una alteración adicional puede ser la ausencia de factores de crecimiento añadidos exógenamente (concretamente, además de aquellos presentes en el suero o plasma). A modo de ejemplo, al menos insulina, dexametasona y/o EGF añadidos exógenamente pueden estar ausentes del medio. Una alteración adicional más puede ser el uso de un medio basal distinto de medio E de Williams (que puede ser particularmente adecuado para el cultivo a largo plazo de tipos celulares hepáticos primarios, especialmente hepatocitos). A modo de ejemplo y no de limitación, pueden usarse ventajosamente medios basales tales como MEM, DMEM, α -MEM o EMEM. Ha de entenderse que el medio puede alterarse en uno, más de uno o todos los modos anteriores. Ha de entenderse adicionalmente que el medio comprende suero o plasma o suero de reposición como se describe anteriormente, incluyendo las realizaciones preferidas detalladas anteriormente. En un aspecto de la invención, el medio que elimina uno o más tipos de célula hepática diferenciados es DMEM rico en glucosa y preferiblemente 10% de FCS.

En una realización, puede añadirse un medio que favorezca la eliminación de uno o más tipos de célula hepática diferenciada, y que promueva la célula progenitora o célula madre de la invención como se describe anteriormente, al comienzo del cultivo de las células hepáticas primarias. En otra realización, el medio puede alterarse así durante el cultivo prolongado de las células hepáticas primarias. A modo de ejemplo, el medio puede alterarse así empezando aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, 3 días, por ejemplo aproximadamente 4 o 5 días, o

empezando aproximadamente 6 días tal como, por ejemplo, aproximadamente 7 u 8 días, o empezando aproximadamente 9 días tal como, por ejemplo, aproximadamente, 10 u 11 días, empezando aproximadamente 12 días, por ejemplo, aproximadamente 13 o 14 días, más preferiblemente empezando aproximadamente 15 días, por ejemplo, aproximadamente 16, 17, 18, 19 o 20 días después de la siembra de las células hepáticas primarias. En una realización ejemplar, el medio puede alterarse así entre 16 y 32 horas después de la siembra, por ejemplo, aproximadamente 24 horas. En realizaciones, después de alterar así el medio, puede cambiarse/renovarse, por ejemplo, cada 2 a 6 días, preferiblemente cada 4 días, por ejemplo, cada 3 o 4 días.

Por tanto, la presente memoria descriptiva describe que las células hepáticas primarias pueden cultivarse después de la siembra en un medio que favorezca la supervivencia de los tipos de célula hepática primaria, incluyendo los tipos de célula hepática diferenciados tales como hepatocitos, y al tiempo anterior, el medio puede alterarse a un medio que favorezca la eliminación de uno o más tipos de célula hepática diferenciada, incluyendo hepatocitos, y que promueva la célula progenitora o célula madre de la invención. Por ejemplo, las células hepáticas primarias pueden cultivarse en primer lugar en un medio que tenga uno, más de uno o todos los siguientes rasgos: que comprenda un medio basal rico tal como, por ejemplo, medio E de Williams, que comprenda poca glucosa, por ejemplo, entre 500 mg/l y 2999 mg/l, y preferiblemente entre 1000 mg/l y 2000 mg/l, que comprenda al menos un factor de crecimiento añadido exógenamente y preferiblemente uno, más de uno o todos de insulina, dexametasona y EGF. Después de ello, a los tiempos anteriores, el medio puede alterarse para incluir uno, más de uno o todos los siguientes rasgos: que comprenda un medio basal distinto de medio E de Williams, por ejemplo medios basales tales como MEM, DMEM, α -MEM o EMEM, que comprenda mucha glucosa, que no comprenda factores de crecimiento añadidos exógenamente o que no comprenda al menos dexametasona, insulina y/o EGF. Ha de entenderse que los medios anteriores comprenderían suero o plasma o suero de reposición como se describe anteriormente, incluyendo las realizaciones preferidas detalladas anteriores de los mismos.

Como se ha descrito, el cultivo anterior de células hepáticas primarias conduce a la emergencia y proliferación de una célula progenitora o célula madre de la invención en el cultivo. Dicho cultivo puede continuarse ventajosamente hasta que la célula progenitora o célula madre de la invención haya proliferado suficientemente. En un aspecto de la invención, dicho cultivo se continúa hasta que la población celular alcanza un cierto grado de confluencia, por ejemplo, al menos un 40%, preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60% y aún más preferiblemente al menos un 70%, por ejemplo, al menos un 80% o al menos un 90% o más confluencia. El término "confluencia", como se usa en la presente memoria, designa la densidad de células cultivadas a que las células entran en contacto entre sí cubriendo sustancialmente todas las superficies disponibles para crecimiento (concretamente, confluencia total).

35 Pase de células

Después del cultivo anterior de las células hepáticas primarias y la emergencia y proliferación de las células progenitoras o células madre de la invención, se somete a un pase la población celular así obtenida al menos una vez, y preferiblemente al menos dos veces.

Los presentes inventores advirtieron sorprendentemente de que las células progenitoras o células madre de la invención que emergían en el cultivo de células primarias retenían sustancialmente su capacidad de proliferación después de someter a pase, lo que permite por tanto ventajosamente enriquecer adicionalmente la población celular en estas células. Por razones de simplicidad, el pase efectuado en esta etapa del procedimiento se designa en la presente memoria como "primer pase" (o pase 1) en el procedimiento de la invención. Las células pueden someterse a pases al menos una vez y preferiblemente dos o más veces. Cada pase posterior al pase 1 se designa en la presente memoria con un número que va aumentando en 1, por ejemplo, pase 2, 3, 4, 5, etc.

Cuando se someten a pase, las células cultivadas se separan y se disocian del sustrato de cultivo y entre sí. La separación y disociación de las células pueden llevarse a cabo como es conocido en general en la técnica, por ejemplo, mediante tratamiento enzimático con enzimas proteolíticas (por ejemplo, elegidas de tripsina, colagenasa, por ejemplo de tipo I, II, III o IV, dispasa, pronasa, papaína, etc.), tratamiento con quelantes de iones divalentes (por ejemplo, EDTA o EGTA) o tratamiento mecánico (por ejemplo, pipeteado repetido a través de una pipeta de orificio pequeño o punta de pipeta) o cualquier combinación de estos tratamientos. Preferiblemente, la separación y disociación de las células cultivadas proporcionaría una proporción sustancial de células como células únicas. Por ejemplo, pueden recuperarse como células únicas un 40% o más de las células, por ejemplo al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, por ejemplo al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, por ejemplo al menos un 90% o al menos un 95% de las células pueden recuperarse como células únicas. Además, las células restantes pueden estar presentes en grupos o conglomerados de células la mayoría de los cuales puede

contener un número relativamente pequeño de células, por ejemplo, de media entre más de 1 y 10 células, por ejemplo menos de 8 células, preferiblemente menos de 6 células, más preferiblemente menos de 4 células, por ejemplo menos de 3 o menos de 2 células.

5 Típicamente, un procedimiento adecuado de separación y dispersión celular debería mantener la viabilidad de las células. Preferiblemente, una suspensión celular obtenida después de la separación y dispersión puede comprender al menos un 60% de células viables, por ejemplo al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80% y lo más preferiblemente al menos un 90% y hasta un 100% de células viables. Un experto sabrá generalmente elegir las condiciones que aseguren el grado deseado de separación y dispersión celulares, manteniendo la viabilidad celular.

10 A continuación, las células así separadas y disociadas (típicamente en forma de una suspensión celular en un tampón isotónico o un medio) se resiembran en un sustrato que permita la adherencia de células al mismo, y se cultivan posteriormente en un medio como se describe anteriormente que sustente la proliferación adicional de las células progenitoras o células madre de la invención. Típicamente, las células pueden sembrarse a una densidad de siembra de entre 1×10^1 y 1×10^6 células/cm², por ejemplo, entre 1×10^2 y 1×10^6 células/cm², y preferiblemente entre 1×10^3 y 1×10^5 células/cm², por ejemplo aproximadamente a 1×10^3 células/cm², aproximadamente a 5×10^3 células/cm², aproximadamente a 1×10^4 células/cm², aproximadamente a 5×10^4 células/cm² o aproximadamente a 1×10^5 células/cm², y preferiblemente a entre aproximadamente 1×10^3 y 1×10^4 células/mm².

20 Como alternativa, las células pueden sembrarse a una relación de división de, por ejemplo, entre aproximadamente 1/8 y 1/2, preferiblemente entre aproximadamente 1/4 y 1/2, y más preferiblemente a aproximadamente 1/2 o aproximadamente 1/3. La relación de división denota la fracción de células sometidas a pase que se siembra en un recipiente de cultivo vacío (típicamente nuevo) de la misma área superficial que el recipiente del que se obtuvieron las células.

25 El sustrato adherente sobre el que se resiembran las células es como se describe con detalle en otro lugar de esta memoria descriptiva. El sustrato puede ser preferiblemente de la misma clase que el sustrato sobre el que se sembraron las células hepáticas primarias, incluyendo las realizaciones preferidas de dicho sustrato descritas anteriormente, o puede ser diferente. Según la invención, este sustrato es colágeno de tipo I como se describe anteriormente.

30 Las células así sometidas a pase se cultivan adicionalmente, ventajosamente hasta que las células se han convertido al menos un 50% en confluentes, por ejemplo al menos un 60%, preferiblemente al menos un 70%, por ejemplo al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, por ejemplo al menos un 95% o incluso completamente confluentes.

35 Los presentes inventores han advertido que aunque la población celular obtenida en esta etapa del procedimiento comprende una fracción sustancial de células progenitoras o células madre de la invención, puede someterse a pase ventajosamente al menos una vez más (concretamente, al menos un segundo pase), esencialmente como se describe anteriormente para el primer pase. Esto aumenta adicionalmente la proporción de células progenitoras o células madre de la invención en la población celular, a juzgar por el análisis de morfología y/o marcadores, e incluso puede obtenerse una población sustancialmente homogénea de células progenitoras o células madre de la invención.

40 Por tanto, según la invención, después de la siembra y cultivo de células hepáticas primarias que conducen a la emergencia y proliferación de las células progenitoras o células madre en dicho cultivo, se someten a pases las células cultivadas al menos una vez (concretamente, primer pase) y preferiblemente al menos dos veces (concretamente, primer y segundo pases), y opcionalmente más veces (concretamente, primer, segundo y cada pase posterior). Por ejemplo, las células pueden someterse a pases al menos una vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces después de la siembra de células hepáticas primarias. En otra realización, las células pueden someterse a pases entre 2 y 10 veces, por ejemplo entre 2 y 8 veces o entre 2 y 5 veces, después de la siembra de células hepáticas primarias. Los pases adicionales (por ejemplo, separación y dispersión celular, resiembra, sustrato, etc.) y el cultivo (por ejemplo, medio, cambios de medio, confluencia resultante, etc.) pueden efectuarse en condiciones sustancialmente idénticas o análogas a las del primer pase, como se describe anteriormente, incluyendo las realizaciones preferidas del mismo, y pueden incluir modificaciones que serán obvias para el experto.

45 El procedimiento de la invención puede proporcionar por tanto una población celular que comprende una fracción considerable de células progenitoras o células madre como se definen en esta divulgación, y la fracción de dichas

células progenitoras o células madre puede aumentarse mediante uno o más pases del cultivo prolongado de células hepáticas primarias. Típicamente, la población comprenderá al menos aproximadamente un 10%, por ejemplo al menos aproximadamente un 20% de dichas células progenitoras o células madre, pero los inventores encontraron que se obtendrán proporciones típicamente mayores de dichas células progenitoras o citoblastos, por ejemplo de al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% o más. Además, el procedimiento puede incluso proporcionar una población sustancialmente homogénea u homogénea de dichas células progenitoras o células madre. La fracción de las células progenitoras o células madre puede evaluarse mediante cualquier procedimiento estándar apropiado, por ejemplo mediante citometría de flujo.

Mantenimiento de las células obtenidas

Quando se consigue una población que comprende las células progenitoras o células madre derivadas de hígado de la invención mediante los procedimientos de la invención, y posiblemente enriquecida adicionalmente en dichas células progenitoras o células madre, la población celular puede mantenerse y/o propagarse a continuación en condiciones que permitan el crecimiento y duplicación de dichas células progenitoras o células madre sin diferenciación. Dichas condiciones pueden ser, por ejemplo, aquellas usadas para obtener las células progenitoras o citoblastos. Un experto que sea capaz de valorar la presencia o ausencia de diferenciación celular puede establecer fácilmente condiciones adicionales. Esto puede aumentar ventajosamente el número de células progenitoras o células madre disponibles para uso adicional de las mismas.

Los presentes inventores han advertido que el pase primario o cualquier otro posterior podría criopreservarse para uso posterior, como es conocido en general en la técnica para células de mamífero.

Los presentes inventores han advertido que las células progenitoras o células madre de la invención que emergieron en el cultivo de células primarias retienen sustancialmente su capacidad de proliferación después de congelar y descongelar. Dichas células pueden almacenarse en forma de suspensión celular concentrada congelada, descongelarse como se hace en general en la técnica, y sembrarse en las mismas condiciones que se describen en otro lugar de esta memoria descriptiva.

Células progenitoras o células madre de la invención

Los presentes inventores han advertido que la población celular obtenida tras el cultivo, y preferiblemente también el pase de células hepáticas primarias como se describe anteriormente, comprende células progenitoras o células madre derivadas de hígado de la invención que expresan simultáneamente (concretamente son positivos de) al menos un marcador mesenquimal, especialmente uno, más de uno, por ejemplo 2, 3 o 4, o todos los marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso (ASMA), con el marcador de hepatocito albúmina (ALB) y posiblemente con uno o más marcadores hepáticos o de hepatocitos distintos, preferiblemente uno, más de uno o todos de CD29, α -fetoproteína (AFP), α -1-antitripsina y/o transportador MRP2.

En una realización más particular, las células progenitoras o células madre derivadas de hígado de la invención pueden expresar simultáneamente (concretamente son positivos de) al menos un marcador mesenquimal, especialmente uno, más de uno, por ejemplo 2, 3 o 4 o todos los marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso (ASMA), con el marcador de hepatocito albúmina (ALB) y posiblemente con uno o más marcadores de hepatocitos distintos, preferiblemente uno o ambos de α -1-antitripsina y transportador MRP2, y con al menos un marcador hepático CD29 o α -fetoproteína (AFP).

Dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta de la invención es negativa del marcador epitelial de colangiocito citoqueratina 19 (CK-19).

Cualquiera de dichas células progenitoras o células madre hepáticas adultas puede expresar adicionalmente una, más de una o todas las siguientes moléculas, indicativas de propiedades o funciones de tipo hepatocito: G6P, CYP1B1, CYP3A4, HNF-4, TDO, TAT, GS, GGT, CK8, EAAT2. Dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta puede caracterizarse adicionalmente por uno, más de uno o todos los siguientes: negativo para al menos los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 y posiblemente también de uno o más de otros marcadores hematopoyéticos tales como, por ejemplo, CD105 y HLA-DR; negativo para marcadores epiteliales; negativo para al menos los marcadores de células madre indiferenciados CD117 y Oct-4 y posiblemente también de uno o más de un marcador de célula madre embrionario y bajo nivel de expresión de α -fetoproteína (AFP). Preferiblemente, dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta puede tener una morfología similar a la mesenquimática, en

particular implicando uno, más de uno o todos de crecimiento en monocapas, forma aplanada, citoplasma amplio y/o núcleos ovoides con uno o dos nucleolos.

5 La identificación de moléculas de superficie celular particulares por sus denominaciones DC (“determinante común”) es un lugar común en la técnica. Se usan también otros nombres o denominaciones de moléculas en la presente solicitud como bien establecidos en la técnica. Puede encontrarse también en los ejemplos una especificación adicional de moléculas particulares.

10 Si una célula se dice que es positiva de un marcador particular, esto significa que un experto concluirá la presencia o evidencia de una señal distintiva de ese marcador, por ejemplo, detectable por anticuerpo o de detección posible mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa, al llevar a cabo la medida apropiada, en comparación con controles adecuados. Cuando el procedimiento permite la valoración cuantitativa del marcador, las células positivas pueden generar de media una señal que es significativamente diferente del control, por ejemplo pero sin limitación, al menos 1,5 veces mayor que dicha señal generada por células de control, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces mayor o incluso mayor.

20 La expresión de marcadores específicos de célula puede detectarse usando cualquier técnica inmunológica adecuada conocida en la técnica, tal como citometría de flujo, inmunocitoquímica o adsorción por afinidad, análisis de transferencia Western, ELISA, etc., o mediante cualquier técnica adecuada de medida de la cantidad de ARNm de marcador, por ejemplo, transferencia Northern, PCR-TI semicuantitativa o cuantitativa, etc.

25 Un experto apreciará que la población celular obtenida mediante el presente procedimiento, que comprende las células progenitoras o células madre anteriores, puede recogerse (por ejemplo mediante cualquier técnica de separación adecuada) y opcionalmente enriquecerse adicionalmente en células que presenten características específicas mediante procedimientos conocidos en general en la técnica (por tanto, dichas células pueden aislarse a partir de dicha población). A modo de ilustración y no de limitación, las células que presentan una o más moléculas de superficie características de las células progenitoras o células madre de la invención, por ejemplo, uno o más de los marcadores enumerados anteriormente, pueden reconocerse por anticuerpos específicos (marcados) u otros agentes de reconocimiento ante dichos marcadores y clasificarse separadamente de células que no presentan dichas moléculas de superficie, por ejemplo, usando clasificación celular activada por fluorescencia o usando unión por afinidad, por ejemplo, a columnas, perlas o superficies (adsorción). Está también incluido en la invención cualquier otro modo de enriquecimiento de las células.

35 En un aspecto adicional, los presentes inventores han desarrollado por tanto una célula progenitora o célula madre aislada novedosa (una célula de vertebrado, preferiblemente de mamífero, aún más preferiblemente humana) originado a partir de hígado adulto, caracterizado porque expresa simultáneamente α -actina de músculo liso (ASMA) con el marcador de hepatocito albúmina (ALB) y posiblemente con uno o más marcadores de hepatocitos distintos. Dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta se caracteriza adicionalmente porque es negativo para citoqueratina 19 (CK-19). Dicha célula progenitora o célula madre hepático adulto puede caracterizarse adicionalmente por uno, más de uno o todos los siguientes: negativo para al menos los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34 y CD117 y posiblemente también de uno o más de otros marcadores hematopoyéticos; morfología similar a la mesenquimática, en particular que implica cualquiera o todos de crecimiento en monocapas, forma aplanada, citoplasma amplio y/o núcleos ovoides con uno o dos nucleolos.

45 Por tanto, en una realización particular (1), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado aislado expresa simultáneamente CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso (ASMA) con ALB. En una realización adicional (2), la célula progenitora o célula madre derivado de hígado expresa simultáneamente CD90, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso (ASMA) con ALB y α -1-antitripsina. En una realización adicional (3), la célula progenitora o célula madre derivado de hígado expresa simultáneamente CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso (ASMA) con ALB y MRP2. En otra realización (4), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado expresa simultáneamente CD90, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso (ASMA) con ALB, α -1-antitripsina y MRP2. En realizaciones adicionales (5), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (4) expresa adicionalmente CD29. En realizaciones adicionales (6), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (4) expresa adicionalmente α -fetoproteína. En realizaciones adicionales (7), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (4) expresa adicionalmente CD29 y α -fetoproteína.

En realizaciones adicionales (8), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las

realizaciones anteriores (1) a (7) es negativo para CD45 y CD34. En realizaciones adicionales (9), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (7) es negativo para CD117 y Oct-4. En realizaciones adicionales (10), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (7) es negativo para CD45, CD34, CD117 y Oct-4.

5 La célula progenitora o célula madre derivada de hígado de todas las realizaciones anteriores (1) a (10) es negativo para CK19. En realizaciones adicionales (11), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (10) es negativo para CK7. En realizaciones adicionales (12), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (10) es negativo para CK19 y CK7.

10 En una realización adicional (13), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (12) muestra una morfología de tipo mesenquimal, preferiblemente que implica cualquiera o todos de crecimiento en monocapas, forma aplanada, citoplasma amplio y/o núcleos ovoides con uno o dos nucleolos.

15 En realizaciones adicionales (14), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (13) expresa adicionalmente una, más de una o todas las siguientes moléculas indicativas de propiedades o funciones de tipo hepatocito: G6P, CYP1B1, CYP3A4, HNF-4, TDO, TAT, GS, GGT, CK8 y EAAT2.

20 En realizaciones adicionales (15), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (14) expresa adicionalmente una, más de una o todas las siguientes moléculas: CD49e, CD13, CD54, complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I (HLA-ABC).

25 En realizaciones adicionales (16), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (1) a (15) es negativo para una, más de una o todas las siguientes moléculas: CD105, HLA-DR, CD133, CD49b, CD49f y CD140.

30 En realizaciones adicionales (17), la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de cualquiera de las realizaciones anteriores (6) a (16) expresa un bajo nivel de expresión de α -fetoproteína (AFP). Preferiblemente, dicho bajo nivel corresponde esencialmente con el nivel de expresión medido en hepatocitos normales. Preferiblemente, es menor que el nivel de expresión medido en la línea de células hepáticas humanas modificadas tumorigénica, por ejemplo HepG2.

35 La célula progenitora o célula madre derivada de hígado aislado de la invención puede presentar preferiblemente características de célula madre, especialmente, puede presentar típicamente al menos una autorrenovación limitada (y posiblemente sustancialmente ilimitada), concretamente, la capacidad de propagarse sin diferenciación. A modo de ejemplo y no de limitación, las células progenitoras o células madre de la invención pueden propagarse así durante al menos 4 pases, por ejemplo al menos 6 pases, al menos 10 pases o al menos 20 pases, al menos 50 pases o más.

40 En otro aspecto, la invención proporciona una célula progenitora o célula madre hepática adulta aislada, una línea celular de la misma y/o una población celular que comprende la misma, obtenible u obtenido directamente usando un procedimiento que comprende: (a) disociar, preferiblemente mediante un procedimiento con colagenasa de dos etapas, hígado humano o una parte del mismo a partir de un sujeto, preferiblemente un sujeto vertebrado, mamífero y preferiblemente humano, formando una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte de mismo; (b) sembrar la población de células primarias sobre sustrato recubierto con colágeno de tipo I en medio E de Williams que comprende preferiblemente 10% (v/v) de suero de ternera fetal, EGF preferiblemente 25 ng/ml, insulina preferiblemente 10 μ g/ml y dexametasona preferiblemente 1 μ M; (c) permitir la adherencia de las células de la población de células primarias a dicho sustrato durante 24 horas e cambiar después de ello el medio por medio reciente que tiene la composición de (b); (d) cultivar las células en dicho medio de (c) durante dos semanas (preferiblemente 15 días); (e) cambiar el medio por DMEM rico en glucosa y que comprende preferiblemente 10% de FCS, y cultivar adicionalmente las células, con lo que las células progenitoras o células madre de la invención emergen y proliferan; (f) opcional y preferiblemente, permitir a las células volverse aproximadamente un 70% confluentes y someter a pase las células al menos una vez y preferiblemente al menos dos veces, en el que las células se siembran sobre el sustrato como en (b) y se cultivan en un medio como en (e).

La etapa (a) puede incluir preferiblemente la disociación de las células primarias mediante pase de las células a

través de al menos un tamiz que tiene un tamaño de poro de 0,25 mm, y preferiblemente a través de una sucesión de tamices que tienen tamaños de poro gradualmente menores hasta 0,25 mm, como en el ejemplo 1.

En un aspecto, la invención se refiere también a los procedimientos anteriores.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula progenitora o célula madre hepática aislada, una línea celular de la misma y/o una población celular que comprende la misma, obtenible u obtenido directamente siguiendo el protocolo indicado en el ejemplo 1.

En un aspecto adicional, los presentes inventores han establecido una población celular (línea celular) de células progenitoras o células madre hepáticas humanas adultas usando los procedimientos de la invención, en particular como se documenta en el ejemplo 1, y han depositado dicha línea celular aislada el 20 de febrero de 2006 según el Tratado de Budapest en la Colección Coordinada de Microorganismos Belga (BCCM) con el número de acceso LMBP 6452CB (dado por la autoridad depositaria internacional; referencia de identificación dada por el depositante: ADHLSC). En consecuencia, en un aspecto la presente invención se refiere a una célula aislada, línea celular y población celular depositada en las BCCM con el número de acceso LMBP 6452CB (en la presente memoria, la línea celular "LMBP 6452CB"), a sublíneas de la misma incluyendo sublíneas clonales y a progenie de la misma, incluyendo progenie diferenciada de la misma, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito preparadas a partir de la misma, y a derivados modificados genéticamente o de otro modo de la misma.

Un experto apreciará que las células progenitoras o células madre, líneas celulares de las mismas y poblaciones celulares que comprenden las mismas, obtenibles según los procedimientos de la invención a partir de hígado humano adulto, pueden tener propiedades biológicas, especialmente capacidad de proliferación y diferenciación, morfología celular y/o expresión de marcadores, idénticas o análogas a la línea celular depositada anteriormente, aunque pueden ser genéticamente diferentes (debido a la variación genética normal entre seres humanos). En consecuencia, se describe también en la presente memoria descriptiva una célula progenitora o célula madre humano o población celular, especialmente derivado de hígado, que tiene propiedades biológicas idénticas o similares a la población celular depositada.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una población celular que comprende las células progenitoras o células madre hepáticas humanas aisladas de las características anteriores, y opcionalmente modificados adicionalmente, por ejemplo modificados genéticamente. En una realización, dicha población celular puede comprender aproximadamente un 5% o más, por ejemplo aproximadamente un 10% o más de dichas células progenitoras o células madre, aproximadamente un 20% o más, aproximadamente un 30% o más, aproximadamente un 40% o más, aproximadamente un 50% o más, aproximadamente un 60% o más, aproximadamente un 70% o más, aproximadamente un 80% o más o aproximadamente un 90% o más de las células progenitoras o células madre, o es una población sustancialmente homogénea u homogénea de dichas células progenitoras o células madre.

En una realización adicional, la invención proporciona una línea celular establecida mediante propagación de las células progenitoras o células madre derivadas de hígado de la invención, opcionalmente modificados adicionalmente, por ejemplo modificados genéticamente. Dicha propagación puede partir de una célula progenitora o célula madre (una línea celular clonal) o de más de una célula.

En un aspecto adicional más, la invención proporciona una célula progenitora o célula madre hepática adulta aislada, una línea celular de la misma y/o una población celular que comprende la misma, obtenible o directamente obtenido usando los procedimientos anteriormente descritos de la invención, incluyendo realizaciones preferidas de los mismos.

En una realización particular, la presente invención proporciona por tanto un procedimiento para aislar una población de células madre de tipo mesenquimal progenitores viables a partir de hígado adulto normal (humano) (figura 1). Las células madre eran capaces de proliferar en un medio de cultivo, y expresaban marcadores de varios tipos de célula hepática tales como, por ejemplo, albúmina (hepatocitos), vimentina (células estrelladas), α -actina de músculo liso (ASMA) (figura 2A). No tienen fenotipo biliar, como se muestra por la inmunotinción negativa y los ensayos de PCR-TI de citoqueratina 19 (figura 2B). Cuando se ensayaron usando citometría de flujo, las ADHLSC eran negativas de CD45, CD34 y CD117, indicando su no contaminación por linaje linfohematopoyético. En contraposición, las ADHLSC eran positivas de CD90, CD29 y CD44, marcadores de linaje mesenquimal.

En una realización, las células son capaces de retener su capacidad de proliferación después del tratamiento con

tripsina/EDTA. La incubación en un medio definido permitía a estas células diferenciarse específicamente en hepatocitos (figura 3). Como criterios de especificidad adicionales, no eran capaces de transdiferenciarse en osteocitos o adipocitos, como se habría observado usando células de médula ósea mesenquimales humanas multipotentes. Su capacidad de proliferación y su especificidad hepática conducen a una eficacia y seguridad aumentadas para el trasplante de células hepáticas. Además, debido a su origen adulto, estas células madre obvian los problemas inmunitarios, éticos y carcinogénicos asociados a las células embrionarias.

Diferenciación de las células progenitoras o células madre de la invención

Además de detectar los marcadores celulares, el estudio de la diferenciación celular *in vitro* y/o *in vivo* puede ser informativo.

Los presentes inventores advirtieron adicionalmente de que las células progenitoras o células madre derivadas de hígado obtenidos usando los procedimientos anteriores pueden poseer una capacidad de diferenciación específica. En particular, las células pueden diferenciarse en hepatocitos o células de tipo hepatocito. En una realización adicional más, las células no se diferencian en tipos de célula mesodérmicos (mesenquimales) tales como, por ejemplo, osteocitos, condrocitos, miocitos, células de tejido conectivo, tendinocitos, adipocitos o células estromales.

La célula progenitora o célula madre hepática aislada de la invención, líneas celulares de la misma o poblaciones celulares que comprenden la misma (mencionando específicamente, pero por supuesto sin limitación, la línea LMBP 6452CB), o progenie del mismo, puede inducirse ventajosamente a diferenciarse en células de linaje de hepatocito, en particular hepatocitos o células de tipo hepatocito. Dicha diferenciación puede ocurrir *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En consecuencia, la presente memoria descriptiva describe adicionalmente un procedimiento para la generación de hepatocitos o células de tipo hepatocito a partir de la célula progenitora o célula madre aislada de la invención, y los hepatocitos o células de tipo hepatocito resultantes.

En una realización particular, la célula progenitora o célula madre derivada de hígado de la invención se caracteriza por tanto por su capacidad de diferenciarse en hepatocitos o células de tipo hepatocito y por la falta de diferenciación hacia tipos de célula mesodérmicos tales como, por ejemplo, osteocitos y adipocitos.

Como se entenderá por los expertos en la técnica, la capacidad de diferenciarse en un tipo de célula específico o la falta de dicha capacidad puede observarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. A modo de ejemplo, la diferenciación *in vitro* o *ex vivo* puede valorarse exponiendo la célula a medios inductores de la diferenciación específicos como es conocido en general en la técnica. De otro modo, la diferenciación puede valorarse *in vivo* siguiendo el destino de una célula introducida (por ejemplo, transplantada, inyectada o administrada de otro modo). Un experto es capaz de reconocer la diferenciación en tipos de célula particulares valorando criterios fenotípicos que incluyen, pero sin limitación, morfología celular, expresión de proteína marcadora y/o actividad de rutas metabólicas u otras fisiológicas específicas.

La diferenciación en células de linaje de hepatocito puede efectuarse ventajosamente en presencia de citocinas y factores de crecimiento, que pueden ser específicos de hígado. A modo de ilustración, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), o factor de difusión, es una citocina bien conocida que promueve la diferenciación en un fenotipo de hepatocito. De forma similar, una lista no limitante de citocinas adicionales incluye factor de crecimiento epidérmico (EGF), FGF básico, insulina, nicotinamida, oncostatina M, dexametasona, inhibidores de HDAC (por ejemplo, butirato de sodio), DMSO, vitamina A o componentes de matriz tales como sulfato de heparano, que se han implicado también en la diferenciación en hepatocitos. Los protocolos para inducir la diferenciación en hepatocitos son conocidos en general en la técnica y pueden optimizarse adicionalmente por un experto.

La identificación y posterior aislamiento de células diferenciadas a partir de sus contrapartidas indiferenciadas pueden llevarse a cabo mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células que se han inducido a diferenciarse pueden identificarse cultivando selectivamente las células en condiciones en que las células diferenciadas superen a las células indiferenciadas. De forma similar, las células diferenciadas pueden identificarse por cambios morfológicos y características que no están presentes en sus contrapartidas indiferenciadas, tales como el tamaño celular, forma o complejidad de la distribución de orgánulos intracelulares. Se contemplan también procedimientos de identificación de células por su expresión de proteínas marcadoras específicas, tales como marcadores de superficie celular. La detección y aislamiento de estas células puede conseguirse, por ejemplo, mediante citometría de flujo, ELISA y/o perlas magnéticas. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (PCR-TI) puede usarse también para controlar los cambios en la expresión génica en respuesta a la diferenciación. Además, puede usarse el análisis de genoma completo usando tecnología de micromatrices para

identificar las células diferenciadas.

Modificación genética de las células progenitoras o células madre de la invención

5 Dicha célula progenitora o célula madre hepática adulta puede modificarse adicionalmente, por ejemplo modificarse genéticamente como se describe anteriormente. La memoria descriptiva describe adicionalmente la progenie, incluyendo la progenie diferenciada, de la célula progenitora o célula madre hepática adulta.

10 En una realización, para aumentar la capacidad replicativa de las células progenitoras o células madre obtenidas de la invención, las células pueden telomerizarse como es conocido en general en la técnica. Una célula se describe como "telomerizada" si se ha alterado genéticamente con un ácido nucleico que codifica una telomerasa transcriptasa inversa (TERT) de cualquier especie de tal manera que la TERT se transcriba y traduzca en la célula. El término se aplica también a la progenie de la célula originalmente alterada que ha heredado la capacidad de expresar la región de codificación de TERT a un nivel elevado. La secuencia de codificación de TERT se toma o
15 adapta típicamente a partir de un gen de TERT de mamífero, ejemplificado por TERT humano y de ratón, como se indica a continuación. Las células pueden telomerizarse alterándolas genéticamente con un vector adecuado, de modo que expresen el componente catalítico de telomerasa (TERT) a un nivel elevado. Es particularmente adecuado el componente catalítico de la telomerasa humana (hTERT), proporcionado en el documento WO 1998/14592. Para algunas aplicaciones, pueden usarse otras secuencias de TERT. Se contemplan también otros
20 procedimientos de inmortalización de células, tales como alterar genéticamente las células con ADN que codifica el antígeno T grande de SV40 (documentos US 5.869.243, WO 1997/32972), infectar con virus de Epstein Barr, introducir oncogenes tales como myc y/o ras, introducir genes de replicación vírica tales como E1a adenovírico y fusionar células que tengan el fenotipo deseado con una línea celular inmortalizada. La transfección con oncogenes u productos oncovíricos es habitualmente menos adecuada cuando las células se van a usar con fines terapéuticos.

25 Generalmente, podría preferirse que las presentes células progenitoras o células madre no estén modificados por telomerización u otros modos de inmortalización cuando se contemple el uso en terapia de dichas células o la progenie de las mismas, incluyendo la progenie diferenciada de las mismas, por ejemplo, cuando dichas células se van a introducir en un cuerpo humano o animal, especialmente humano.

30 Como se describe anteriormente, las células progenitoras o células madre derivadas de hígado obtenidos o la progenie de los mismos puede transfectarse o transformarse estable o transitoriamente con un ácido nucleico de interés antes del uso adicional, por ejemplo, en terapia o investigación, esencialmente como es conocido en la técnica. Las secuencias de ácido nucleico de interés pueden incluir, pero sin limitación, aquellas que codifican
35 productos génicos que potencian el crecimiento, diferenciación y/o funcionamiento de tipos de célula útiles en terapia, por ejemplo, tipos de célula derivables de las células progenitoras o células madre de la invención, y particularmente de hepatocitos o células de tipo hepatocito, o que suministran un gen terapéutico a un sitio de administración o implante de dichas células.

40 A modo de ejemplo y no de limitación, las células progenitoras o células madre obtenidas o la progenie de los mismos puede modificarse para sobreexpresar constitutiva o induciblemente un polipéptido expresado normalmente por células hepáticas, especialmente hepatocitos, pero que es defectivo o está ausente en un paciente, siendo este defecto la causa subyacente de un estado patológico del paciente. La administración de las células así modificadas
45 puede restaurar la producción de la proteína y ayudar así a tratar el paciente. Por ejemplo, las células progenitoras o células madre o la progenie de las mismas puede contener ADN heterólogo que codifica una proteína metabólica tal como ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa, arginasa, fosfato de carbamilo sintasa, glutamato de N-acetilo sintasa, glutamina sintetasa, glucógeno sintetasa, glucosa-6- fosfatasa, succinato deshidrogenasa, glucocinasa, piruvato cinasa, acetil CoA carboxilasa, ácido graso sintetasa, alanina aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa, ferritina, receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), enzimas
50 P450 y/o alcohol deshidrogenasa. Como alternativa, las células pueden contener ADN que codifica una proteína plasmática secretada tal como albúmina, transferrina, complemento, componente C3, α 2-macroglobulina, fibrinógeno, factor XIII, factor IX, α 1-antitripsina o similares.

55 El hígado es el centro de producción de muchas proteínas secretoras. Está conectado anatómicamente con el sistema circulatorio de tal modo que permite una liberación eficaz de diversas proteínas a la corriente sanguínea. Por lo tanto, pueden insertarse genes que codifican proteínas que tienen efectos sistémicos en células hepáticas de la presente invención, en contraposición a los tipos de célula específicos que las producen normalmente, especialmente si es difícil integrar genes en estas células. Por ejemplo, puede insertarse una variedad de genes de hormonas o genes de anticuerpos específicos en células hepáticas de la presente invención para la secreción de

sus productos génicos en la circulación.

Se usan procedimientos de transferencia génica convencionales para introducir ácidos nucleicos en células. El procedimiento preciso usado para introducir un gen no es crítico para la invención. Por ejemplo, los procedimientos físicos para la introducción de ADN en células incluyen microinyección y electroporación. Los procedimientos químicos tales como precipitación simultánea con fosfato de calcio e incorporación de ADN a liposomas son también procedimientos estándares de introducción de ADN en células de mamífero. También se contempla la transfección vírica. El ADN se introduce usando vectores estándares tales como los derivados de retrovirus de murino y aviar (véase, por ejemplo, Gluzman y col., "Viral Vectors", Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y., 1988). Los procedimientos de ADN recombinante estándares son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York, 1989), y se han desarrollado y usado clínicamente con éxito vectores víricos para terapia génica (véase, por ejemplo, Rosenberg, y col., N. Engl. J. Med., 323: 370, 1990).

Usos de las células progenitoras o células madre de la invención

Las células progenitoras o células madre originadas en hígado aislados de la invención, las líneas celulares de los mismos o las poblaciones que comprenden los mismos pueden usarse con diferentes fines (ha de entenderse que los usos y aplicaciones a continuación se contemplan ampliamente para cualquier célula progenitora o célula madre hepática adulta como se define anteriormente, en particular para células obtenibles u obtenidas directamente usando los procedimientos anteriormente definidos, células que presentan las características anteriormente definidas, así como para la línea celular LMBP 6452CB, en una realización particular, una línea de células madre derivadas de hígado adulto, preferiblemente una línea de células madre derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC); la progeñie de los mismos o derivados modificados genéticamente de los mismos) incluyendo, pero sin limitación:

- el trasplante de células hepáticas para tratar deficiencias metabólicas hepáticas, enfermedades degenerativas hepáticas o insuficiencia hepática fulminante, usando las células progenitoras o células madre o una población de las mismas según la invención,
- la preparación de dispositivos hepáticos bioartificiales usando las células progenitoras o células madre aisladas o una población de los mismos según la invención,
- la preparación de modelos animales de enfermedades hepáticas humanas gracias al trasplante de células progenitoras o células madre aisladas o una población de los mismos según la invención en animales,
- la preparación de modelos *in vitro* y animales de toxicología y farmacología usando las células progenitoras o células madre aisladas o una población de los mismos según la invención,
- el ensayo de nuevos fármacos sobre las células progenitoras o células madre aisladas o una población de las mismas según la invención, incluyendo fármacos antivíricos para virus de hepatitis humanos.

Por ejemplo, el análisis de los hígados de ratones uPA^{+/+}-SCID y SCID transplantados intraesplénicamente con ADHLSC (línea LMBP 6452CB) demostró que estas células eran capaces de injertarse y diferenciarse en hepatocitos maduros (figuras 4 y 5). Además, se detectó albúmina humana en el suero de estos ratones transplantados 10 semanas después del trasplante, mientras que no se detectaron niveles de α -fetoproteína.

Como se describe en la presente memoria, las células progenitoras o células madre hepáticas (mencionado específicamente, aunque por supuesto sin limitación, la línea LMBP 6452CB) pueden usarse para trasplante en errores congénitos del metabolismo, para trasplante en modelos animales de insuficiencia hepática o para trasplante en modelos animales de hepatitis vírica humana. Las presentes células pueden usarse por lo tanto en el tratamiento de enfermedades asociadas al hígado incluyendo, pero sin limitación, insuficiencia hepática, hepatitis y errores congénitos del metabolismo.

En el ejemplo 1, los inventores demuestran que las células progenitoras o células madre hepáticas humanas de la invención, cuando se administran mediante inyección intraesplénica a un mamífero inmunodeficiente, más preferiblemente un roedor, especialmente un ratón o rata, retienen su capacidad de proliferación e injerto en el hígado hospedador. En consecuencia, la presente memoria descriptiva describe que una población celular que comprende células progenitoras o células madre hepáticas de la invención, preferiblemente de origen humano (mencionando específicamente, aunque por supuesto sin limitación, la línea LMBP6452CB) se introduce, por ejemplo se inyecta, y se permite injertar en un mamífero vuelto inmunodeficiente genética o químicamente, obteniéndose un modelo animal. Preferiblemente, dicha población puede comprender al menos 2×10^6 células de la invención. Un experto apreciará otros modos de administración de la población celular de la invención para inducir el injerto hepático de dichas células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto.

Como se detalla en el ejemplo 1, las células injertadas no sobreproliferaban, recalcando así sus ventajas en el trasplante de células en seres humanos u otros animales, preferiblemente mamíferos.

5 La presente memoria descriptiva describe también el uso de las células progenitoras o células madre aisladas o una población de los mismos según la invención (mencionando específicamente, aunque por supuesto sin limitación, la línea LMBP 6452CB), con los siguientes fines:

- 10 – el trasplante de células progenitoras o células madre hepáticas para tratar deficiencias metabólicas congénitas basadas en el hígado: los ejemplos no exhaustivos de dichas enfermedades incluyen fenilcetonuria y otras aminoacidopatías, hemofilia y otras deficiencias de factor de coagulación, hipercolesterolemia familiar y otros trastornos del metabolismo lipídico, trastornos del ciclo de la urea, glucogenosis, galactosemia, fructosemia, tirosinemia, deficiencias del metabolismo de proteínas y carbohidratos, aciduria orgánica, enfermedades mitocondriales, trastornos peroxisómicos y lisosómicos, anormalidades de la síntesis de proteínas, defectos de transportadores de células hepáticas, defecto de glucosilación y similares,
- 15 – el trasplante de células progenitoras o células madre hepáticas según la invención para tratar enfermedades degenerativas hepáticas progresivas adquiridas,
- el uso de células progenitoras o células madre hepáticas según la invención para tratar insuficiencia hepática fulminante e insuficiencia hepática aguda o crónica,
- 20 – el uso de células progenitoras o células madre hepáticas según la invención en dispositivos hepáticos bioartificiales y dispositivos auxiliares hepáticos,
- modelos animales de enfermedades hepáticas humanas gracias al trasplante de células progenitoras o células madre hepáticas según la invención en animales pequeños y grandes,
- 25 – la preparación de modelos animales de infecciones víricas hepatotrópicas (HBV, HAV, HCV, HEV, HDV,...) para estudiar el historial natural, transmisión, resistencia, efectos del tratamiento, uso de fármacos antivíricos o cualquier investigación que use células progenitoras o células madre hepáticas transplantadas según la invención,
- la preparación de modelos animales *in vitro* de toxicología, farmacología y farmacogenética usando las células progenitoras o células madre hepáticas según la invención,
- el ensayo de nuevos fármacos en las células progenitoras o células madre hepáticas según la invención,
- 30 – la terapia génica, mediante la inserción de secuencias víricas en las células progenitoras o células madre hepáticas según la invención, que pueden multiplicarse entonces *in vitro*,
- modelos animales para estudiar el metabolismo de células hepáticas humanas,
- la tolerancia de células alogénicas gracias al uso de células progenitoras o células madre hepáticas según la invención, y/o
- 35 – el uso de células progenitoras o células madre según la invención para evitar, prevenir o tratar el rechazo de aloinjerto de hígado o células hepáticas.

Las presentes células progenitoras o células madre o la progenie de los mismos, incluyendo la progenie diferenciada, puede pretenderse en un aspecto de la invención para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para ingeniería de tejidos y terapia celular.

40 Un experto apreciará que los usos detallados en la presente memoria pueden implicar el uso de las células progenitoras o células madre, líneas celulares de los mismos, poblaciones celulares que comprenden los mismos, así como el uso de la progenie de los mismos, incluyendo la progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, o derivados modificados genéticamente de los mismos.

45 Como se observa anteriormente, las células progenitoras o células madre originadas en hígado de la invención, las líneas celulares de los mismos o las poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, aunque por supuesto sin limitación, la línea LMBP 6452CB), o la progenie de los mismos, opcionalmente modificada genéticamente, pueden usarse en terapias de sustitución celular. Las células pueden administrarse a un tejido de interés en un sujeto para complementar células en funcionamiento o reemplazar células que han perdido la función. Como alternativa, se contemplan también procedimientos para proporcionar células diferenciadas, particularmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, en las que las células progenitoras o células madre se diferencian en presencia de factores de diferenciación, se aíslan y se administran a un sujeto.

55 Los estados patológicos o deficiencias tipificados por la pérdida de masa y/o función hepática, y que podrían beneficiarse de las células progenitoras o células madre de la invención, incluyen aquellos enumerados anteriormente, e incluyen adicionalmente, pero sin limitación, síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica (cirrosis inducida por alcohol), deficiencia de α -1-antitripsina (todos los fenotipos), hiperlipidemias y otros trastornos

del metabolismo lipídico, hepatitis autoinmune síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, colestasis familiar progresiva de tipos I, II y III, cáncer de hígado, enfermedad de Caroli, síndrome de Crigler-Najjar, fructosemia, galactosemia, defectos de glucosilación deficiente de carbohidratos, otros trastornos del metabolismo de carbohidratos, enfermedad de Refsum y otras enfermedades peroxisómicas, enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Wolman y otros trastornos lisosómicos, tirosinemia, triple H, y otros trastornos metabólicos aminoacídicos, síndrome de Dubin-Johnson, esteatosis hepática (esteatohepatitis no alcohólica), síndrome de Gilbert, enfermedad de almacenamiento de glucógeno I y III, hemocromatosis, hepatitis A-G, porfiria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, tirosinemia, deficiencias de factor de coagulación, hemofilia B, fenilcetonuria, enfermedad de Wilson, insuficiencia hepática fulminante, insuficiencia hepática posthepatectomía y enfermedades de la cadena respiratoria mitocondrial. Además, las células pueden usarse también para tratar trastornos hepáticos adquiridos debido a infecciones víricas.

En consecuencia, la memoria descriptiva describe células progenitoras o células madre hepáticas adultas de la invención, líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, pero sin limitación, la línea LMBP 6452CB), opcionalmente modificados genéticamente como se detalla anteriormente, para uso en terapia y/o el uso de los mismos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades hepáticas. Dichas enfermedades pueden incluir trastornos que afectan al tejido hepático; las enfermedades que afectan a la viabilidad y/o función de hepatocitos están contempladas específicamente y pueden representar, por ejemplo, errores congénitos, el efecto de una afección patológica, el efecto de un traumatismo, efectos tóxicos, infecciones víricas, etc. Las enfermedades hepáticas enumeradas en la presente memoria descriptiva se contemplan específicamente. La administración de células según la invención puede conducir a la reconstitución o regeneración de tejido en el sujeto. Las células se administran de manera que las permita injertarse en o migrar al sitio de tejido pretendido y reconstituir o regenerar el área deficiente funcionalmente.

La presente memoria descriptiva describe también un procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad hepática, que comprende la administración de células progenitoras o células madre hepáticas adultas de la invención, líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, aunque sin limitación, la línea LMBP 6452CB), o la progenie de los mismos, incluyendo la progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificados genéticamente, a un sujeto, especialmente un ser humano, necesitado de dicho tratamiento. Dicha administración es típicamente en una cantidad terapéuticamente eficaz, concretamente, en general una cantidad que proporcione un efecto y rendimiento local o sistémico deseado.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las células progenitoras o células madre hepáticas adultas de la invención, líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, aunque sin limitación, la línea LMBP 6452CB), opcionalmente modificados como anteriormente.

A modo de ejemplo y no de limitación, las células progenitoras o células madre hepáticas adultas aisladas de la invención, líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, aunque sin limitación, la línea LMBP 6452CB), o la progenie de los mismos, puede administrarse ventajosamente mediante inyección (englobando también la administración en catéter) o implante, por ejemplo inyección localizada, inyección sistémica, inyección intraesplénica (véase también Gupta y col., Seminars in Liver Disease 12: 321, 1992), inyección en una vena porta, inyección en pulpa hepática, por ejemplo, detrás de la cápsula hepática, administración parenteral o inyección intrauterina en un embrión o feto.

La presente memoria descriptiva describe también que las células progenitoras o células madre originadas en hígado de la invención, las líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, aunque por supuesto sin limitación, la línea LMBP 6452CB), la progenie de los mismos, opcionalmente modificados genéticamente, pueden usarse para ingeniería de tejido y terapia celular mediante trasplante de células hepáticas (TCH). El trasplante de células hepáticas y el trasplante de células madre hepáticas (TCBH) designan la técnica de infusión de hepatocitos maduros o células progenitoras hepáticas, incluyendo las células de la invención, de cualquiera modo que conduzca al acceso e injerto hepático de las células, preferiblemente por la vena porta, pero también mediante inyección hepática directa, o mediante inyección intraesplénica.

Por ejemplo, las células pueden proporcionarse en forma de suspensión celular en cualquier medio de conservación, preferiblemente que contiene albúmina humana, después del procedimiento de aislamiento o después de

descongelar tras la crioconservación.

En una realización, la presente invención contempla usar el propio tejido hepático de un paciente para aislar las células progenitoras o células madre de la invención. Dichas células serían autólogas del paciente y podrían administrarse fácilmente al paciente. Además, si el paciente contuviera un defecto genético subyacente de una afección patológica particular, dicho defecto podría evitarse mediante la manipulación genética de las células obtenidas.

En otra realización, las células progenitoras o células madre de la invención pueden aislarse a partir de tejido que no es propio del paciente. Cuando se contempla la administración de dichas células a un paciente, puede ser preferible que el tejido hepático sometido al procedimiento de la presente invención para obtener las células progenitoras o células madre seleccione de tal modo que se maximice, al menos dentro de los límites conseguibles, la compatibilidad de tejido entre el paciente y las células administradas, reduciendo así la probabilidad de rechazo de las células administradas por el sistema inmunitario del paciente (por ejemplo, rechazo de injerto frente al hospedador).

La capacidad del sistema inmunitario de diferenciar lo propio de lo ajeno está determinada en gran medida por los productos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), cuyos genes están en el cromosoma 6 y pertenecen a la superfamilia génica de las inmunoglobulinas. Los productos de MHC de clase I consisten en HLA-A, HLA-B y HLA-C; estos tienen una amplia distribución y están presentes en la superficie de esencialmente todas las células nucleadas y en plaquetas. Los productos de MHC de clase II consisten en HLA-D, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ; tienen una distribución más limitada, incluyendo linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y linfocitos T activados (pero no en reposo).

Los loci de HLA son en general multialélicos, por ejemplo, usando anticuerpos específicos pueden reconocerse al menos 26 alelos HLA-A, 59 alelos HLA-B, 10 alelos HLA-C, 26 alelos HLA-D, 22 alelos HLA-DR, 9 alelos HLA-DQ y 6 alelos HLA-DP. Debido a que los loci de HLA están estrechamente ligados, los antígenos de HLA pueden estar presentes también como haplotipos conservados.

En un sujeto necesitado de terapia con células de la presente invención, puede cribarse la presencia de anticuerpos anti-HLA y de su genotipo y/o fenotipo de HLA (por ejemplo, en linfocitos, por ejemplo usando procedimientos serológicos o análisis de ADN genético). En las células progenitoras o células madreobtenibles según la presente invención, o el tejido hepático fuente o el donante del mismo, puede ensayarse típicamente su fenotipo y/o genotipo de HLA y seleccionarse los tejidos o células adecuados para la administración, que tienen haplotipos de HLA idénticos al paciente o que tienen la mayoría de alelos antigénicos de HLA comunes con el paciente y ninguno o una minoría de los antígenos de HLA del paciente contienen anticuerpos anti-HLA preexistentes. La probabilidad de que las células transplantadas se acepten exitosamente aumenta con el número de antígenos de HLA idénticos. Un experto entenderá las variaciones adicionales de estas consideraciones.

Se contemplan también otros modos de obtener un perfil de MHC parecido al del paciente, por ejemplo, la manipulación genética de las células progenitoras o células madre obtenidas de la invención o la progenie de los mismos.

Si las células derivan de una fuente heteróloga (concretamente no autóloga), puede administrarse típicamente una terapia de inmunosupresión concomitante, por ejemplo, usando agentes inmunosupresores tales como ciclosporina o tacrolimús (FK506). Como alternativa, las células pueden encapsularse en una membrana que permite el intercambio de fluidos pero previene el contacto célula/célula. Es conocido en la técnica el trasplante de células microencapsuladas, por ejemplo, Balladur y col., 1995, Surgery 117: 189-194; y Dixit y col., 1992, Cell Transplantation 1: 275-279. Preferiblemente, las células pueden ser autólogas o exhibir una coincidencia estrecha de HLA como se explica.

En un ejemplo, el hígado adulto o parte del mismo es de un sujeto animal no humano, preferiblemente un sujeto mamífero no humano. Las células progenitoras o células madre o líneas celulares o progenie de los mismos, derivadas según la invención de hígados de sujetos animales no humanos o mamíferos no humanos, pueden usarse ventajosamente, por ejemplo, en investigación y en la terapia de enfermedades hepáticas en miembros de la misma especie, relacionada u otra animal no humana o de mamífero no humano, o incluso en la terapia de pacientes humanos que padecen enfermedades hepáticas (por ejemplo, xenotrasplante, dispositivos hepáticos bioartificiales que comprenden células animales no humanas o de mamíferos no humanos). A modo de ejemplo y no de limitación, las células de mamífero no humano particularmente adecuadas para uso en terapia humana pueden originarse en

cerdos.

Es un problema referente al uso terapéutico de las células progenitoras o células madre de la invención la cantidad de células necesarias para conseguir un efecto óptimo. Las dosis para administración pueden ser variables, y pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores; y pueden determinarse por el experto dotado de la presente divulgación. Típicamente, la o las dosis administradas proporcionarán una cantidad terapéuticamente eficaz de células, concretamente, una que consiga el efecto y rendimiento local o sistémico deseado.

En estudios humanos actuales de células de médula ósea mononucleares autólogas, se han usado dosis empíricas en el intervalo de 1 a 4×10^7 células con resultados alentadores. Sin embargo, diferentes situaciones pueden requerir la optimización de la cantidad de células administradas. Por tanto, la cantidad de células que se van a administrar variará con el sujeto que se esté tratando. En una realización preferida, pueden administrarse a un sujeto humano entre 10^2 y 10^9 , o entre 10^3 y 10^9 , o entre 10^4 y 10^9 , tal como entre 10^4 y 10^8 , o entre 10^5 y 10^7 , por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 5×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , o aproximadamente 2×10^7 , aproximadamente 3×10^7 , aproximadamente 4×10^7 , aproximadamente 5×10^7 , aproximadamente 6×10^7 , aproximadamente 7×10^7 , aproximadamente 8×10^7 , aproximadamente 9×10^7 , o aproximadamente 1×10^8 células. Sin embargo, la determinación precisa de una dosis terapéuticamente eficaz puede estar basada en factores individuales de cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, tamaño de la lesión de tejido y periodo de tiempo desde que ocurrió la lesión, y puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica a partir de esta divulgación y el conocimiento de la técnica.

Preferiblemente, la pureza de una población celular que comprende las células progenitoras o células madre de la invención para administración puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 55%, de aproximadamente 55 a aproximadamente 60%, y de aproximadamente 65 a aproximadamente 70%. Más preferiblemente, la pureza puede ser de aproximadamente 70 a aproximadamente 75%, de aproximadamente 75 a aproximadamente 80%, de aproximadamente 80 a aproximadamente 85%; y lo más preferiblemente la pureza puede ser de aproximadamente 85 a aproximadamente 90%, de aproximadamente 90 a aproximadamente 95% y de aproximadamente 95 a aproximadamente 100%. La pureza de las células madre puede determinarse, por ejemplo, según el perfil de marcadores de superficie celular en una población celular. Las dosificaciones pueden ajustarse fácilmente por los expertos en la técnica (por ejemplo, una menor pureza puede requerir un aumento de la dosificación).

El experto puede determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos y/o portadores opcionales en las composiciones que se van a administrar en los procedimientos de la invención. Típicamente, puede estar presente cualquier aditivo (además de las células progenitoras o células madre y/o citocinas) en una cantidad de disolución de 0,001 a 50% (p/p o p/v) en disolución salina tamponada con fosfato, y el ingrediente activo puede estar típicamente presente del orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 5% (p/p o p/v), preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1%, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,05%, o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10%, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5%.

Cuando se administra una composición terapéutica de la presente invención, puede formularse en general en una forma de dosificación unitaria inyectable (por ejemplo, disolución, suspensión, dispersión o emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones y dispersiones acuosas estériles. Como se usan en la presente memoria, las disoluciones o dispersiones incluyen un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable en que las células de la invención permanecen viables. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión farmacéuticamente aceptable que contiene, por ejemplo, agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

Adicionalmente, pueden añadirse diversos aditivos que potencian la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. Puede asegurarse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares.

En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos para asegurar la viabilidad de las células, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La isotonicidad deseada de las composiciones de esta invención puede lograrse usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico,

tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio se prefiere particularmente para tampones que contienen iones de sodio.

5 Para aumentar potencialmente la supervivencia celular cuando se introducen las células progenitoras o células madre o la progenie diferenciada de interés de los mismos en un sujeto necesitado de ello, pueden incorporarse dichas células en un biopolímero o polímero sintético. Los ejemplos de biopolímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos. Esto podría realizarse con o sin citocinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación o construcciones de expresión de ácido nucleico, etc., incluidos. Dichos biopolímeros podrían estar, por ejemplo, en suspensión o podrían formar un gel tridimensional con las células embebidas en el mismo. Dichos polímeros pueden ser preferiblemente biodegradables.

10 Puede causarse una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante el uso de agentes que retarden la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, según la presente invención, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendría que ser compatible con las células progenitoras o células madre.

15 Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando las células utilizadas en la práctica de la presente invención en la cantidad necesaria de disolvente apropiado con diversas cantidades de los demás ingredientes, según se desee.

20 Dichas composiciones pueden estar adicionalmente mezclados con un portador, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, disolución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, aditivos potenciadores de la gelificación o viscosidad, conservante, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseadas.

25 Pueden consultarse textos estándares tales como "Remington's Pharmaceutical Science", 17^a edición, 1985, incorporado a la presente memoria como referencia, para preparar preparaciones adecuadas sin experimentación indebida.

30 Puede mantenerse la viscosidad de las composiciones al nivel seleccionado, si se desea, usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere metilcelulosa porque está disponible fácil y económicamente y es fácil de trabajar. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. La concentración preferida de espesante dependerá del agente seleccionado. La cuestión es usar una cantidad que consiga la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas se preparan normalmente a partir de disoluciones mediante la adición de dichos agentes espesantes.

35 Usos adicionales de las células progenitoras o células madre de la invención

40 Se contemplan a continuación los usos adicionales de las células progenitoras o células madre de la invención, de las líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, aunque sin limitación la línea LMBP 6452CB), o la progenie de los mismos incluyendo la progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, opcionalmente modificados genéticamente.

45 Por tanto, las células progenitoras o células madre o derivadas diferenciadas de las mismas, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, pueden usarse para detectar respuestas celulares (por ejemplo toxicidad) ante agentes bioactivos (biológicos o farmacológicos), lo que comprende poner en contacto un cultivo de células, o de los derivados diferenciados de las mismas, con uno o más agentes biológicos o farmacológicos, identificar una o más respuestas celulares ante el uno o más agentes biológicos o farmacológicos y comparar las respuestas celulares de los cultivos celulares con las respuestas celulares de los cultivos de control. Dichas respuestas pueden determinarse controlando las actividades de moléculas tales como, pero sin limitación, fosfatasa alcalina, citocromo P450 y enzimas de la ruta de la urea, entre otras.

50 Además, pueden cribarse citocinas, quimiocinas, composiciones farmacéuticas y factores de crecimiento, por ejemplo, usando las células progenitoras o células madre de la invención o derivados diferenciados de los mismos, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, para elucidar más claramente sus efectos sobre la diferenciación y función de dichas células.

La presente memoria descriptiva describe también un órgano modificado por ingeniería de tejido, o porción o sección específica del mismo, un dispositivo modificado por ingeniería de tejido que comprende un tejido de interés y, opcionalmente, citocinas, factores de crecimiento o factores de diferenciación, en el que las células de la invención se usan para generar tejidos, especialmente tejido hepático, especialmente tejidos que comprenden hepatocitos. Los órganos modificados por ingeniería de tejido pueden usarse con un armazón biocompatible para apoyar el crecimiento celular en una configuración tridimensional, que puede ser biodegradable. Los órganos modificados por ingeniería de tejido generados a partir de las células madre de la presente invención pueden implantarse en un sujeto necesitado de un órgano de reemplazo, una porción o sección específica del mismo. La presente memoria descriptiva describe también el uso de las células madre o células diferenciadas a partir de los mismos como parte de un biorreactor, por ejemplo, un dispositivo auxiliar hepático.

Los órganos, porciones o secciones derivadas de las células madre de la invención pueden implantarse en un hospedador. El trasplante puede ser autólogo, de tal modo que el donante de las células madre de los que deriva el órgano o unidades de órgano es el receptor del tejido modificado por ingeniería. El trasplante puede ser heterólogo, de tal modo que el donante de las células madre de los que deriva el órgano o unidades de órgano no es el receptor del tejido modificado por ingeniería. Una vez transferidos al hospedador, los órganos modificados por ingeniería de tejido pueden reasumir la arquitectura y función del tejido hospedador nativo. Los órganos modificados por ingeniería de tejido beneficiarán a sujetos en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo el tratamiento de cáncer y otras enfermedades dadas a conocer en la presente memoria, defectos congénitos o lesión debida a extirpación quirúrgica.

Como herramienta para el ensayo y desarrollo de fármacos, las células hepáticas y su progenie podrían usarse para valorar cambios en los patrones de expresión génica causados por fármacos en consideración para desarrollo. Los cambios en el patrón de expresión génica de fármacos potenciales podrían compararse con los causados por fármacos conocidos por afectar al hígado. Esto permitiría a una compañía farmacéutica cribar en compuestos su efecto sobre el hígado más temprano en el proceso de desarrollo, ahorrando tiempo y dinero. También podría usarse el linaje completo de las células hepáticas, desde progenitoras a células maduras, para ensayar la toxicidad hepática de fármacos y para estudiar cómo se metaboliza el fármaco. Actualmente, las compañías farmacéuticas tienen dificultades para obtener un suministro consistente de células hepáticas para ensayos de toxicidad. Los procedimientos y células de la presente invención responden a esta necesidad.

Adicionalmente, las células progenitoras o células madre de hígado adulto de la invención, o la progenie de los mismos incluyendo progenie diferenciada, especialmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, son útiles como componentes biológicos de dispositivos de detoxificación tales como dispositivos de perfusión hepática o auxiliares hepáticos.

Un dispositivo auxiliar hepático convencional incluye una cubierta externa de plástico rígido y fibras huecas de membrana semipermeable en que se siembran células madre o hepatocitos diferenciados o derivados de las células madre. Las fibras pueden tratarse con colágeno, lecitina, laminina o fibronectina para la unión de células o dejarse sin tratar. Se perfunde fluido corporal a través del dispositivo para detoxificación según procedimientos bien conocidos y se devuelve entonces al paciente. Se describe un ejemplo de un DAH adecuado para las células de la presente invención en la publicación de patente internacional nº de serie PCT US00/15524.

Las células progenitoras o células madre hepáticas adultas de la invención o la progenie de los mismos pueden diferenciarse *in vitro* y usarse adicionalmente en lugar de hepatocitos maduros en "ADMET" (administración, distribución, metabolismo, eliminación y toxicología) o ensayos de citotoxicidad.

Los hepatocitos o células de tipo hepatocito obtenidas mediante diferenciación de las células progenitoras o células madre hepáticas adultas de la invención, o la progenie de los mismos, pueden proporcionar un modelo *in vitro* para el estudio del desarrollo hepático, el metabolismo de células hepáticas o la biología de células hepáticas; y para cribar moléculas en diferenciación, proliferativas o tóxicas. Contemplada adicionalmente la manipulación genética de dichas células, pueden usarse para estudiar genes implicados en el desarrollo hepático, el metabolismo o la biología de células hepáticas.

55 Ejemplo 1

Procedimiento de aislamiento de células hepáticas

Se obtuvieron células hepáticas humanas a partir de hígado completo o segmentos de hígado originarios de

donantes sanos fallecidos o sin latido cardiaco. Se aislaron las células después de un tiempo de pinzamiento (por ejemplo, después de entre 6 y 12 horas de tiempo de pinzamiento) mientras los hígados se mantenían en hielo en medio de la Universidad de Wisconsin hasta la perfusión. Se aislaron los hepatocitos usando una técnica de perfusión en dos etapas clásica {Seglen, 1976}, {Stephene, 2005}. Se perfundió secuencialmente tejido hepático por los vasos sanguíneos aparentes con una disolución de EGTA (disolución salina equilibrada de Earl sin Ca^{++} y Mg^{++} , EGTA 0,5 mM, Hepes 5 mM, gentamicina 2 mg/l y 100.000 UI/l de penicilina G) y una disolución de enzima de digestión durante 9 a 12 horas, cada una a 37°C. La disolución de digestión (EBSS con Ca^{++} y Mg^{++} , Hepes 5 mM, gentamicina 2 mg/l y 100.000 UI/l de penicilina G) incluía colagenasa P 0,9 mg/ml e inhibidor de tripsina de soja 0,03 mg/ml. Se realizó una incisión de la cápsula hepática y se liberaron los hepatocitos mediante agitación suave. Se detuvo la digestión con medio de lavado enfriado con hielo (medio M199, Hepes 5 mM, gentamicina 2 mg/l y 100.000 UI/l de penicilina G) que contenía inhibidor de tripsina de soja 0,03 mg/ml y plasma humano 100 ml/l. Se filtraron las células y se aclararon a través de 4 tamices metálicos de respectivamente 4,5 mm, 1 mm, 0,5 mm y 0,25 mm de tamaño de poro. Se lavaron las células 3 veces mediante centrifugación a 1200 rpm durante 3 minutos en un medio de lavado M199 frío.

Cultivo de células primarias

Se resuspendieron suspensiones de células únicas en medio E de Williams (Invitrogen) complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10% (Perbio, Hyclone), EGF 25 ng/ml (Peprotech), insulina 10 $\mu\text{g/ml}$, dexametasona 1 μM y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (Invitrogen). Se sembraron las células en matraces o placas recubiertos con colágeno I de cola de rata (BD Biosciences) (por ejemplo placas de 6 pocillos) (Greiner Bio-one) y se cultivaron a 37°C en una atmósfera totalmente humidificada que contenía 5% de CO_2 . Después de 24 horas, se cambió el medio para eliminar las células no adherentes y después de ello se renovó cada tres días. Durante dos semanas, se siguió el cultivo microscópicamente cada día y se analizó el medio de cultivo cada tres días. Se cambió entonces el medio de cultivo a DMEM con concentraciones altas de glucosa (Invitrogen) complementado con 10% de FCS (Perbio, Hyclone) y 1% de P/S (Invitrogen) para acelerar la eliminación de hepatocitos adultos. Emergió entonces espontáneamente un tipo de célula con morfología de tipo mesenquimática, proliferó y rellenó el espacio vacío en la placa de pocillos, como se confirma mediante microscopía de contraste de fases. Estas células aparecieron entre el día 15 y 20 del cultivo y presentaban una forma aplanada, citoplasma amplio y núcleos ovoides con uno o dos nucleolos (figura 1). Al alcanzar un 70% de confluencia, se sacaron las células con 0,25% de tripsina y EDTA 1 mM y se resembraron a la concentración deseada. El análisis de la suspensión celular usando citometría de flujo mostró que la población se volvía homogénea después del pase 2. Para cada pase, se analizó la suspensión celular también usando PCT-TI e inmunofluorescencia.

Caracterización de las células

Para evitar la posible contaminación por otros tipos de célula, se efectuó la inmunohistoquímica para estudiar el fenotipo de estas células. Debido a su origen hepático, se ha analizado la expresión de marcadores específicos tales como albúmina en células fijadas con paraformaldehído. Como se muestra en la figura 2, se detectó albúmina, que se expresa exclusivamente en hepatocitos, usando tanto anticuerpos monoclonales (clon HAS-111 de Sigma) como policlonales (Chemicon). En paralelo, se ha evaluado también la expresión de marcadores de células mesenquimales, demostrando que estas células son inmunopositivas de vimentina y α -actina de músculo liso (figura 2). Hasta ahora, las características fenotípicas se han estudiado durante 7 pases con gran estabilidad.

Diferenciación celular

Se sembraron células a una densidad de $0,5 - 1 \times 10^4/\text{cm}^2$ en placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I de cola de rata en DMEM complementado con FCS y P/S. Se cambió el medio de cultivo 24 horas después por medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Invitrogen). Para la inducción, se incubaron las células durante 2 semanas con medio de inducción que contenía IMDM complementado con HGF 20 ng/ml (Biosource), bFGF 10 ng/ml (Peprotech) y nicotinamida 0,61 g/l (Sigma). Después de ello, se incubaron las células con medio de maduración que contenía IMDM complementado con oncostatina M 20 ng/ml M (Sigma), dexametasona 1 μM (Sigma) e ITS (insulina, transferrina, selenio) 50 mg/ml (Invitrogen). Para las etapas de inducción y maduración, se cambió el medio y se analizó cada 3 días. Después de la exposición a estos cócteles, las células empezaron a perder sus bordes marcados, se encogieron progresivamente y perdieron su morfología inicial adoptando una forma poligonal (figura 3).

Citometría de flujo

5 Se recogieron células después de centrifugación a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron a una concentración de 500 a 1000/μl en PBS. Se incubaron entonces las células durante 30 minutos a 4°C con anticuerpos. Se usaron los isotipos de control correspondientes para la evaluación de la unión no específica de anticuerpos monoclonales. Se lavaron entonces las células y se resuspendieron en Isoton® (Beckham Coulter) para lectura con un citómetro de flujo Beckham Coulter.

RT-PCR

10 Se extrajo el ARN total de células cultivadas en placas de 6 pocillos usando el reactivo de aislamiento TriPure (Roche) y se generó ADNc usando el kit de transcripción inversa según las instrucciones del fabricante. Se efectuaron las amplificaciones por PCR usando polimerasa elongasa en un volumen final de 25 μl y cebadores apropiados. Se sometieron después de ello las muestras a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron los ácidos nucleicos mediante tinción con bromuro de etidio.

15 **Inmunofluorescencia**

Para inmunotinción, se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) durante 15 min a temperatura ambiente las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm recubiertos con colágeno I de cola de rata, y después de ello se permeabilizaron con Triton X100 al 1% (v/v) en TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) durante 15 min. Se evitó la inmunotinción no específica mediante una incubación de 1 h en una disolución de TBS que contenía leche desecada desnatada al 3% a 37°C. Se incubaron entonces sucesivamente las células en la misma disolución durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos primarios, se aclararon 5 veces con TBS, y durante 1 hora con anticuerpos secundarios (1/500). Se tiñeron los núcleos durante 30 min con el tinte nuclear DAPI (1/5.000). Después de 3 aclarados, se montaron las preparaciones en medio Fluoprep (BioMerieux, Bruselas, Bélgica) y se examinaron usando un microscopio invertido Olympus IX70 acoplado con una cámara CCD (T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Alemania). Se obtuvo la luz de excitación (552, 488 y 372 nm para Cy-3, FITC y DAPI, respectivamente) con una lámpara de xenón acoplada con un monocromador (T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Alemania). Se adquirieron imágenes digitales usando filtros apropiados y se combinaron usando el software TILLvision.

30 **Moléculas detectadas en las células progenitoras o células madre de la invención**

Usando los enfoques anteriores, se ha establecido el siguiente perfil de expresión de una serie de marcadores celulares en un experimento para las células establecidas en este ejemplo (ADHLSC):

35 Positivos para CD90. La CD90, o Thy-1, es una proteína de superficie celular que se considera que es indicativa del linaje mesenquimal.

Positivos para CD44. La CD44 es una molécula de adhesión celular y se usa para identificar al menos algunos tipos de células madre mesenquimales (CBM).

40 Positivos para vimentina. La vimentina es un filamento intermedio de tipo III detectado comúnmente en células mesenquimales y fibroblastos.

Positivos para albúmina. La albúmina es una proteína plasmática producida y secretada por el hígado. En los hepatocitos, la albúmina se encuentra habitualmente como proteína citoplasmática.

45 Positivos para CD29. La CD29, también conocida como integrina β-1, es una glucoproteína transmembrana, también presente en tejido hepático, que se cree que forma con la integrina α un complejo receptor funcional implicado en la interacción con la matriz extracelular.

50 Positivos para CD73. La CD73 es una ecto-5'-nucleotidasa que se considera que es un marcador mesenquimal.

Positivos para CD49b. La CD49b se denomina también integrina α-2 o receptor de colágeno y está implicada en la interacción celular con la matriz extracelular.

55 Positivos para HLA-ABC. Los HLA-ABC (antígenos de leucocitos humanos A, B y C) son antígenos de clase I de complejo principal de histocompatibilidad que forman heterodímeros de membrana.

Alfa-fetoproteína: bajos niveles de expresión. La α-fetoproteína es una proteína expresada durante el desarrollo del endodermo primitivo, y a lo largo de la maduración refleja el linaje endodérmico. Altos niveles de expresión de α-

fetoproteína revelan habitualmente una desviación tumorigénica.

Positivos para α -1-antitripsina. La α -1-antitripsina es una proteína plasmática sintetizada por el hígado.

- 5 Positivos para glucosa 6-fosfatasa (G6P). La G6P es una enzima hepática que hidroliza glucosa 6-fosfato a glucosa y fosfato inorgánico, permitiendo a la glucosa del hígado entrar en la sangre.

10 Positivos para citocromo P450 1B1 (CYP1B1). El CYP1B1 es un citocromo inducible por dioxina responsable del metabolismo de fase I de un amplio intervalo de sustratos estructuralmente distintos.

10 Positivos para citocromo P450 3A4 (CYP3A4). La CYP3A4 es una enzima crucial implicada en el metabolismo de xenobióticos.

15 Positivos para factor nuclear de hepatocitos 4 (HNF-4). El HNF4, un receptor nuclear, es un factor de transcripción implicado en la regulación del metabolismo de la energía.

Positivas de triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). La TDO es la primera enzima implicada en la oxidación de triptófano en el hígado.

20 Positivos para tirosina aminotransferasa (TAT). La TAT es una enzima específica de hígado mitocondrial implicada en el metabolismo de aminoácidos y la gluconeogénesis.

Positivos para glutamina sintasa (GS). La GS es una enzima clave para la asimilación de amonio.

25 Positivos para gamma-glutamil transpeptidasa (GGT). La GGT es una enzima implicada en el metabolismo del glutatión.

Positivos para citoqueratina 8 (CK8). La CK8 es un filamento intermedio específico de células epiteliales.

30 Positivos para proteína multirresistente a fármacos 2 (MRP2). La MRP2 es un transportador de aniones orgánicos responsable de la exportación de aniones orgánicos intracelulares desde los hepatocitos al árbol biliar.

Positivos para transportador de glutamato 2 (EAAT2).

35 La presencia de muchas de las moléculas anteriores que pueden particular en la función y el metabolismo hepático es indicativa del estrecho ligamiento de la línea celular ADHLSC con fenotipos hepáticos.

40 Negativos para CD117. La CD117, también denominada c-kit, es un receptor de superficie celular en tipos de célula de médula ósea que identifica HSC y MSC y por lo tanto caracteriza células madre bastante indiferenciados.

40 Negativos para CD34. La CD34 es una proteína de superficie celular en células de médula ósea, indicativa de HSC y progenitor endotelial.

45 Negativos para CD45. La CD45, también denominada antígeno de leucocitos, es una tirosina fosfatasa expresada en células de linaje hematopoyético, incluyendo células madre hematopoyéticas.

Negativos para CD105. La CD105, también denominada SH2 o endoglina, es una molécula de adhesión. Se considera también que es un marcador de células madre mesenquimales.

50 Negativos para CD133. La CD133 es un marcador de células madre hematopoyéticas.

Negativos para HLA-DR. Estos antígenos de clase II de complejo principal de histocompatibilidad son heterodímeros de membrana expresados restrictivamente en células presentadoras de antígeno.

55 Negativos para Oct-4. El Oct-4 es un factor de transcripción expresado solo por células madre pluripotentes y esencial para el mantenimiento del estado indiferenciado.

Negativos para citoqueratina 19 (CK19). La CK19 se usa ampliamente como marcador de células biliares, concretamente colangiocitos.

Negativos para citocromo P 2B6 (CYP2B6). El CYP2B6 está implicado en el metabolismo de endo- y xenobióticos.

CD54: Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), una glucoproteína de membrana.

Sin pretender limitar en modo alguno, los presentes inventores, basándose en su conocimiento de los marcadores celulares, plantearon una posible interpretación de los datos anteriores: Esta combinación de marcadores define una línea celular original que expresa marcadores del linaje mesenquimal (CD90, CD73, vimentina, CD44) así como marcadores característicos de la ruta de diferenciación hepática (CD29 y albúmina, α -1-antitripsina, HNF4, transportador MRP2). La presencia de albúmina detectada tanto por inmunofluorescencia como por PCR-TI aboga fuertemente en contra de una posible contaminación con células estrelladas. La ADHLSCL no parece ser células madre mesenquimales indiferenciados pluripotentes (negativa de CD45, negativa de CD34, negativa de CD117, negativa de Oct-4), ni células estrelladas hepáticas (positiva para albúmina). La línea ADHLSCL parece asignada al linaje hepático (positiva para CD29, que expresa albúmina y α -1-antitripsina), pero no expresa el marcador biliar típico (negativa para CK19 y 7). Por tanto, las células y líneas celulares de la invención pueden denotarse, en un modo no limitante, como una línea de mesenquimales células madre mesenquimales con características de progenitor de hepatocito.

Transplante, histología e inmunohistoquímica de ratones uPA-SCID

Se inyectaron un millón de ADHLSCL ($\geq 90\%$ de viabilidad) en el bazo de ratones uPA^{+/+}-SCID de 6-14 días de edad. Antes del transplante, los ratones mostraron una albúmina sérica indetectable. La inmunohistoquímica en muestras de hígado de ratón se efectuó en secciones de hígado de 4 μ m de grosor que se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para evaluación histopatológica global. Para la inmunotinción, se incubaron cortes de hígado durante una noche con anticuerpos primarios a temperatura ambiente. Se efectuó la detección después de incubar los cortes con polímero marcado con peroxidasa y sustrato cromogénico (Envision-DAB System, Dako, Carpintería, CA). Se efectuó la contratinción usando hematoxilina.

El modelo de ratón transgénico utilizado con este fin combina una patología hepática (uPA) con inmunodeficiencia (SCID). Después del transplante intraesplénico de la suspensión de ADHLSCL, se dejaron recuperaron los ratones uPA^{+/+}-SCID durante 10 semanas. El análisis de los hígados de los ratones uPA/SCID transplantados con ADHLSCL demostró que estas células eran capaces de injertarse (figura 4) y de diferenciarse en hepatocitos maduros (figura 5). Además, se detectó albúmina humana en el suero de estos ratones transplantados 10 semanas después del transplante, mientras que el nivel de α -fetoproteína expresada, un marcador del desarrollo tumoral, permanecía indetectable.

Las células transplantadas no sobreproliferaron como se muestra por observación microscópica, indicando la ausencia de colonias tumorigénicas y un nivel normal de expresión de los marcadores tumorigénicos α -fetoproteína y Ki67. El nivel normal de expresión corresponde esencialmente con el nivel de expresión medido en hepatocitos normales, y es menor que el nivel de expresión medido en una línea celular de hígado humano modificada tumorigénica, por ejemplo, HepG2.

Ejemplo 2

Un tratamiento ejemplar con las células progenitoras o células madre originadas en hígado de la invención, las líneas celulares de los mismos o poblaciones celulares que comprenden los mismos (mencionando específicamente, aunque por supuesto sin limitación, la línea LMBP 6452C), o la progenie de los mismos, opcionalmente modificados genéticamente, puede ser el siguiente.

Se infunden células en inyecciones en serie, preferiblemente no superando las 25 a 50 x 10⁶ células/kg, preferiblemente separadas 4 horas, o separadas 8 horas, o más de 8 horas hasta una semana, o más de una semana. Se infunden una cantidad total de células de 250 x 10⁸ células/kg, o 500 x 10⁶ células/kg durante unos días, preferiblemente una o preferiblemente dos semanas. Las infusiones en serie pueden repetirse según sea necesario, cada mes o cada seis meses o cada año o más.

El acceso a la vena porta es mediante punción directa con guía radiológica o ultrasónica, mediante una aguja de punción o mediante un catéter percutáneo, o mediante un dispositivo Port-a-cath®, o mediante un dispositivo Broviac® insertado quirúrgicamente en cualquier vaso que drene la vena porta, preferiblemente la vena mesentérica inferior o una vena colónica. El catéter puede dejarse durante varias horas, preferiblemente varios días,

preferiblemente varias semanas o preferiblemente varios meses hasta dos años, o preferiblemente más, para infusiones repetidas siempre que sea necesario.

- 5 La inmunosupresión se inicia el día de infusión, preferiblemente el día antes, preferiblemente con tacrolimús (FK506) y esteroides. El nivel sanguíneo continuo de tacrolimús es preferiblemente de 8 ng/ml inicialmente, de 6 ng/ml después de tres meses, de 4 ng/ml después de 6 meses y se mantiene entonces aproximadamente a 4 ng/ml. Los esteroides se administran preferiblemente en forma de prednisona o prednisolona, inicialmente a 5 mg/kg el día 1, 4 mg/kg el día 2, 3 mg/kg el día 3, 2 mg/kg el día 4, 1 mg/kg el día 5, y entonces se reducen progresivamente para alcanzar 0,25 mg/kg a los 3 meses, y se termina a los 6 meses. La inmunosupresión alternativa puede incluir, solos
- 10 o en combinación, ciclosporina A, anticuerpos anti-receptor de IL-2, globulinas anti-timocito o cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal anti-linfocito humano, micofenolato de mofetilo o azatioprina o cualquier agente antimetabólico, ciclosporina, rapamune o cualquier otro inhibidor de calcineurina.

REIVINDICACIONES

1. Una célula progenitora o célula madre humana aislada originada a partir de hígado adulto humano, caracterizada porque:
- 5 (a) expresa el marcador mesenquimal α -actina de músculo liso (ASMA),
(b) expresa el marcador de hepatocito albúmina (ALB), y
(c) es negativo para citoqueratina 19 (CK-19).
2. La célula progenitora o célula madre humana aislada según la reivindicación 1, caracterizada porque:
- 10 (a) expresa los marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina y ASMA,
(b) expresa ALB, y
(c) es negativo para CK-19.
3. La célula progenitora o célula madre humana aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que expresa adicionalmente CYP3A4.
4. La célula progenitora o célula madre humana aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que expresa adicionalmente uno o más marcadores hepáticos o de hepatocitos elegidos de CD29, α -fetoproteína (AFP), α -1-antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2.
- 20 5. La célula progenitora o célula madre humana aislada según la reivindicación 4, que expresa CD29, AFP, α -1-antitripsina y transportador MRP2.
6. La célula progenitora o célula madre humana aislada según la reivindicación 1, que es positiva para CD90, CD29 y CD44, y que es positiva para albúmina, positiva para vimentina y positiva para α -actina de músculo liso (ASMA), y que es negativa para CD45, CD34, CD117 y CK-19.
- 25 7. La célula progenitora o célula madre humana aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha célula tiene morfología de tipo mesenquimal, que implica cualquiera o todos de crecimiento en monocapas, forma aplanada, citoplasma amplio y núcleos ovoides con uno o dos nucleolos.
- 30 8. La célula progenitora o célula madre humana aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha célula puede diferenciarse en hepatocitos o células de tipo hepatocito y no se diferencia en tipos celulares mesodérmicos.
- 35 9. Una línea celular o una población celular que comprende la célula progenitora o célula madre hepática humana aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 40 10. Una célula progenitora o célula madre hepática adulta humana aislada y una línea celular, depositada el 20 de febrero de 2006 según el Tratado de Budapest en la Colección Coordinada de Microorganismos Belga (BCCM) con número de acceso LMBP 6452CB, y las sublíneas del mismo incluyendo las sublíneas clonales.
- 45 11. Un procedimiento para la obtención de una célula progenitora o célula madre humana aislada o una población celular que comprende dicha célula progenitora o célula madre, comprendiendo el procedimiento: (a) disociar, preferiblemente mediante un procedimiento de colagenasa en dos etapas, un hígado adulto o una parte del mismo de un sujeto humano, para formar una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo; (b) sembrar la población de células primarias sobre sustrato recubierto con colágeno de tipo I en medio E de Williams que comprende suero fetal de ternera preferiblemente 10% (v/v) , EGF preferiblemente 25 ng/ml, insulina preferiblemente 10 μ g/ml y dexametasona preferiblemente 1 μ M; (c) permitir la adherencia de las células de la población celular primaria a dicho sustrato durante 24 horas y después de ello cambiar el medio por medio fresco que tiene la composición de (b); (d) cultivar las células en dicho medio de (c) durante 2 semanas, preferiblemente 15 días; (e) cambiar el medio por DMEM rico en glucosa que comprende FCS preferiblemente 10%, y cultivar adicionalmente las células, con lo que las células progenitoras o células madre de la invención surgen y proliferan; (f) permitir a las células volverse aproximadamente un 70% confluentes y hacer pases de las células al menos una vez y preferiblemente al menos dos veces, sembrándose las células sobre el sustrato como en (b) y cultivándose en un medio como en (e).
- 50 55 12. Una célula progenitora o célula madre hepática adulta humana aislada según la reivindicación 1, una línea celular del mismo y/o una población celular que comprende el mismo, obtenible u obtenido directamente usando el

procedimiento de la reivindicación 11.

5 13. Una composición que comprende la célula progenitora o célula madre hepática humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12, o la línea celular o población celular de cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12, opcionalmente en la que dicha composición es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

10 14. Las células progenitoras o células madre hepáticas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12 o la línea celular o población celular de cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12 para uso en terapia, preferiblemente para uso en el tratamiento de enfermedad hepática, más preferiblemente para uso en el tratamiento de enfermedad hepática incluyendo fenilcetonuria y otras aminoacidopatías, hemofilia y otras deficiencias de factor de coagulación, hipercolesterolemia familiar y otros trastornos del metabolismo lipídico, trastornos del ciclo de la urea, glucogenosis, galactosemia, fructosemia, tirosinemia, deficiencias del metabolismo de proteínas y carbohidratos, aciduria orgánica, enfermedades mitocondriales, trastornos peroxisómicos y lisosómicos, 15 anomalidades de la síntesis de proteínas, defectos de transportadores de células hepáticas, defecto de glucosilación, hepatitis, cirrosis, errores congénitos del metabolismo, insuficiencia hepática aguda, infecciones hepáticas agudas, toxicidad química aguda, insuficiencia hepática crónica, insuficiencia hepática fulminante, colangitis, cirrosis biliar, síndrome de Alagille, deficiencia de α -1-antitripsina, hepatitis autoinmune, atresia biliar, 20 cáncer de hígado, enfermedad quística del hígado, esteatosis hepática, galactosemia, cálculos biliares, síndrome de Gilbert, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y otras infecciones víricas de hepatitis, porfiria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, tirosinemia, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo 1 o enfermedad de Wilson.

25 15. Un procedimiento de realización de un ensayo de toxicidad *in vitro* que comprende: exponer la célula progenitora o célula madre hepática humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12 o una línea celular o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12 a un agente de ensayo, y observar al menos un efecto, si lo hubiera, del agente de ensayo sobre la población de células hepáticas, preferiblemente en el que el al menos un efecto incluye un efecto sobre la viabilidad celular, la función celular o ambas.

30 16. Un procedimiento de realización de estudios de metabolismo de fármacos *in vitro* que comprende: (i) exponer la célula progenitora o célula madre hepática humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12 o la línea celular o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12 a un agente de ensayo, y (ii) observar al menos un cambio, si lo hubiera, que implique al agente de ensayo después de un periodo de ensayo predeterminado, preferiblemente en el que al menos un cambio incluye un cambio en la estructura, concentración o 35 ambas del agente de ensayo.

40 17. Un dispositivo auxiliar hepático que comprende una carcasa que alberga las células progenitoras o células madre hepáticas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12 o la línea celular o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12.

45 18. La célula progenitora o célula madre hepática humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12, o la línea celular o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12, en los que se ha introducido una copia funcional de un gen, o una composición que comprende dicha célula progenitora o célula madre hepática humana, línea celular o población celular, opcionalmente en los que dicha composición es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, para tratar errores de la expresión génica.

50 19. La célula progenitora o célula madre hepática humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12 o la línea celular o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12 para uso en la potenciación de la regeneración de un hígado lesionado o enfermo.

55 20. Un procedimiento de realización de ensayos de agentes eficaces para tratar infecciones hepáticas que comprende (i) infectar con un agente infeccioso de interés las células progenitoras o células madre hepáticas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12, o una línea celular o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12, proporcionando una población infectada, (ii) exponer la población infectada a una cantidad predeterminada de agente de ensayo y (iii) observar los efectos, si los hubiera, de la exposición sobre la población infectada.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en que el agente infeccioso incluye un microorganismo,

preferiblemente en el que el agente infeccioso incluye uno o más virus, bacterias, hongos o combinaciones de los mismos, más preferiblemente en el que el agente infeccioso vírico incluye un virus de la hepatitis.

5 22. El procedimiento de la reivindicación 20, en que los efectos observados incluyen efectos sobre la replicación vírica de un agente infeccioso vírico.

10 23. Un procedimiento de producción de una proteína de interés que comprende introducir en la célula progenitora o célula madre hepática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12, o la línea celular o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12, un gen funcional que codifique una proteína de interés, incubar la población de células hepáticas en condiciones eficaces para que tenga lugar la transcripción, traducción y opcionalmente modificación postraduccional y recoger la proteína de interés.

15 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en que la proteína de interés comprende un antígeno de vacuna.

20 25. El uso de las células progenitoras o células madre hepáticas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12, o de la línea celular o población celular de cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12, para la diferenciación *in vitro* o *ex vivo* de dichas células en células de linaje de hepatocito, particularmente hepatocitos o células de tipo hepatocito.

25 26. Un procedimiento para la diferenciación de células progenitoras o células madre hepáticas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 o 12, o de la línea celular o población celular de cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 o 12, en células de linaje de hepatocito, particularmente hepatocitos o células de tipo hepatocito, que comprende exponer las células progenitoras o células madre, línea celular o población celular, a medio inductor de la diferenciación hepática.
30

FIG. 1

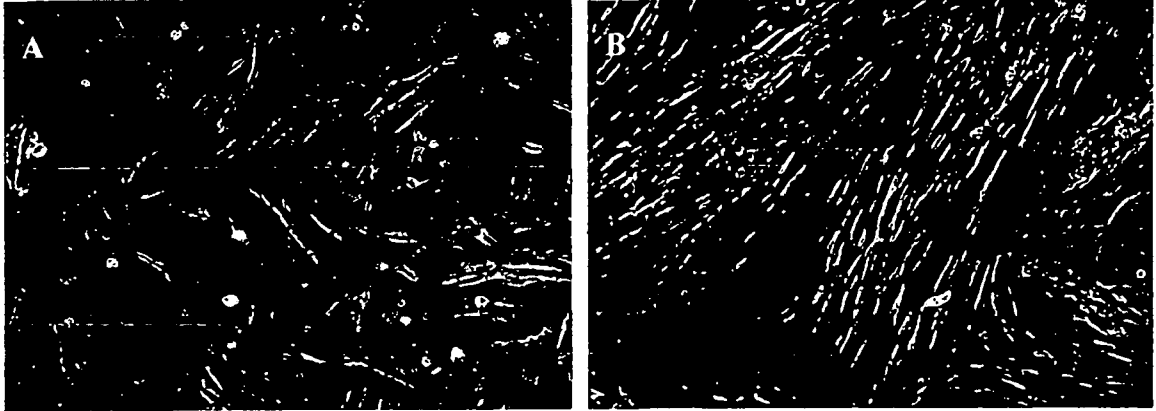


FIG. 2A

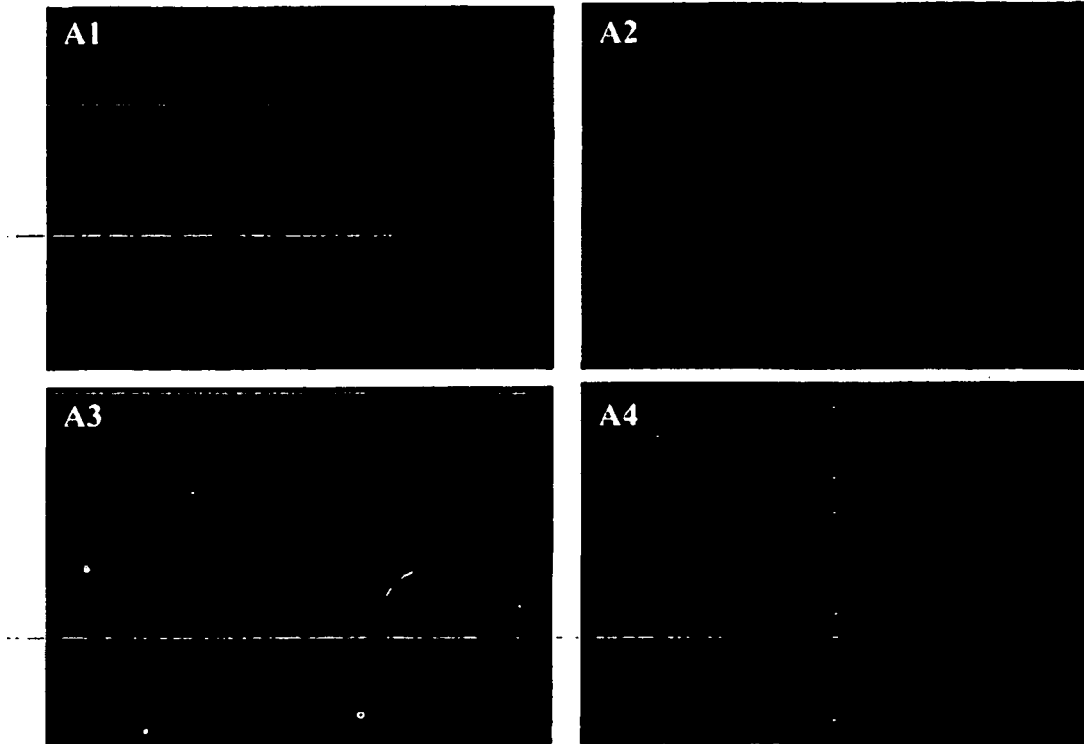


FIG. 2B

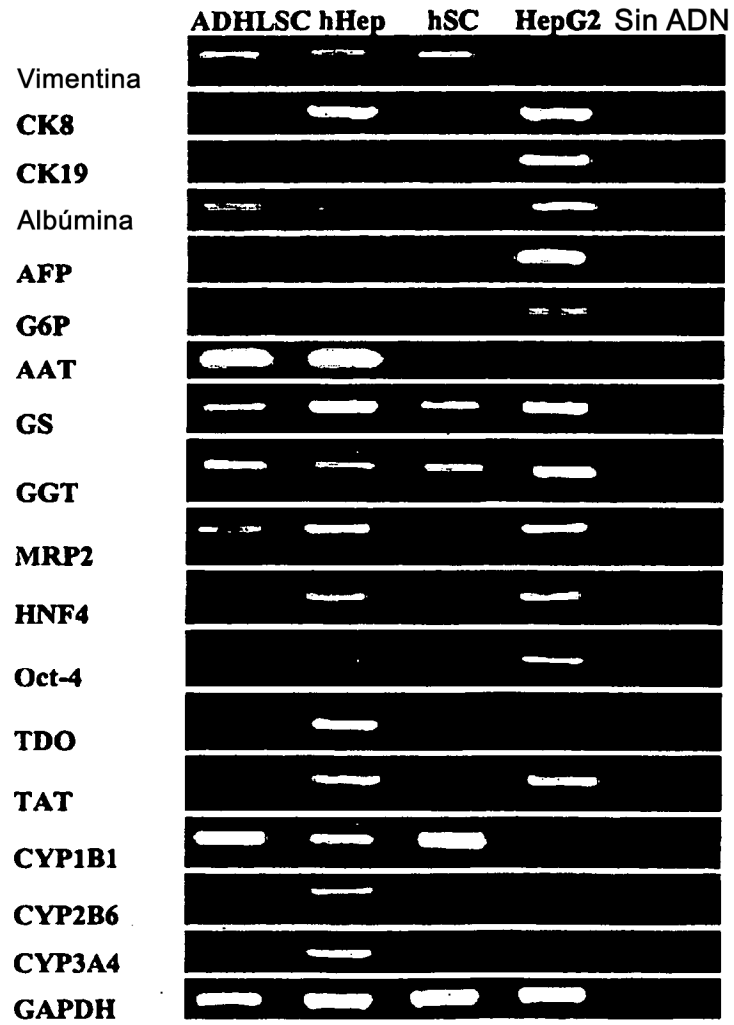


FIG. 3

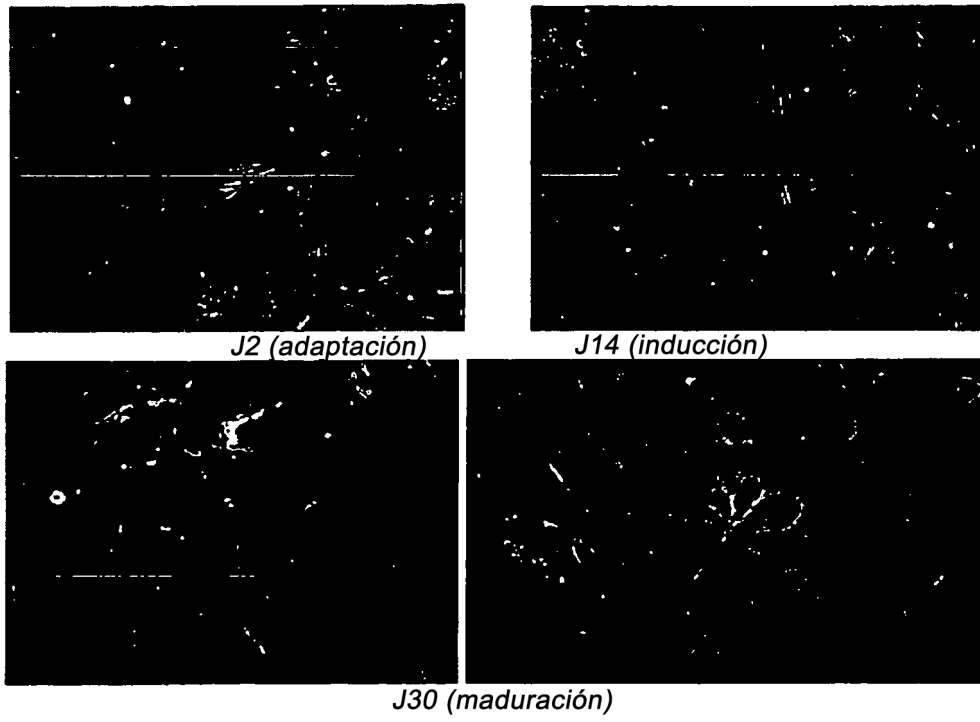


FIG. 4

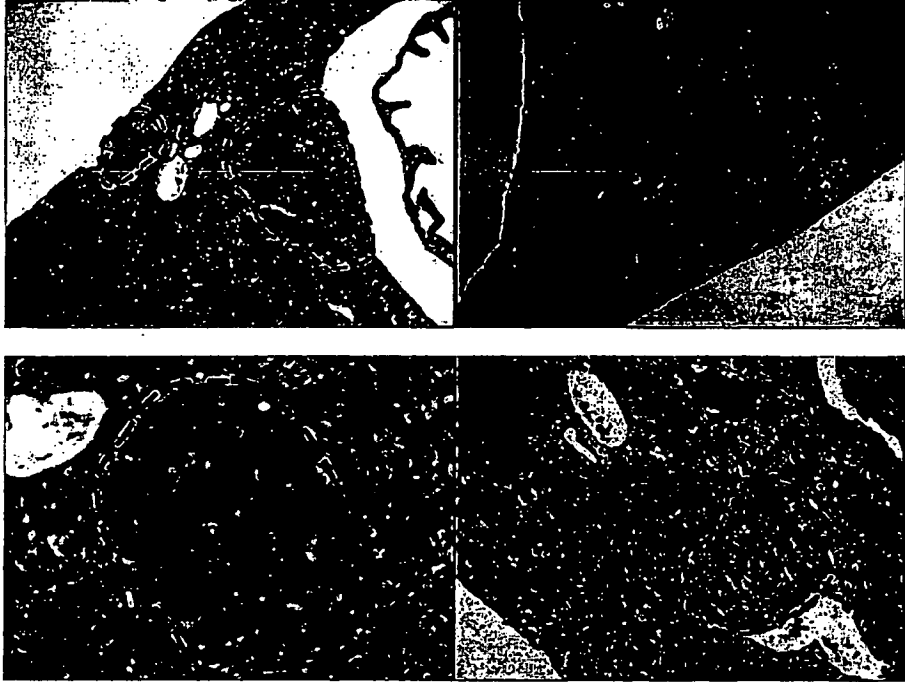


FIG. 5

