

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 028**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2010** **PCT/US2010/054450**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011** **WO11053690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010** **E 10827464 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020** **EP 2494033**

54 Título: **Células madre multipotentes del árbol biliar extrahepático y métodos para su aislamiento**

30 Prioridad:

30.10.2009 US 256846 P

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

14.04.2021

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (50.0%)**

**Office of Commercialization and Economic
Development, 109 Church St.**

Chapel Hill, NC 27516, US y

SAPIENZA UNIVERSITA DI ROMA (50.0%)

72 Inventor/es:

REID, LOLA, M.;

WANG, YUNFANG;

CARDINALE, VINCENZO;

GAUDIO, EUGENIO;

CARPINO, GUIDO;

ALVARO, DOMENICO y

CUI, CAI-BIN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 819 028 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre multipotentes del árbol biliar extrahepático y métodos para su aislamiento

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 [0001] La presente invención se refiere generalmente a células progenitoras multipotentes, incluidas células madre multipotentes, y poblaciones celulares que comprenden tales progenitores o células madre, en el árbol biliar, el hígado y el páncreas. Más particularmente, la presente invención se refiere a progenitores o células madre multipotentes y poblaciones celulares que comprenden tales progenitores o células madre derivados de porciones del árbol biliar extrahepático. Incluye composiciones que los comprenden y métodos de identificación, aislamiento, mantenimiento, expansión y diferenciación de tales células y poblaciones celulares *in vitro* e *in vivo*.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

- 15 [0002] Las células muertas, muriéndose o disfuncionales son la causa de muchas enfermedades conocidas, incluidas la diabetes y la enfermedad de Alzheimer. Un método para tratar estas dolencias se ha enfocado en el trasplante de órganos enteros o partes de los mismos de donantes para reemplazar alguna o todas las funciones de las células "enfermas". Aunque a menudo exitoso en la detención o el retraso del curso de algunas enfermedades, el trasplante de órganos va acompañado por una morbilidad/mortalidad considerable, como todas las intervenciones quirúrgicas mayores, y la supervivencia del trasplante depende de la administración crónica de inmunosupresores sistémicos potentes que a menudo causan efectos secundarios indeseables. Independientemente del éxito de estos enfoques, sin embargo, están limitados intrínsecamente por la disponibilidad de donantes.
- 20 [0003] Un enfoque alternativo en la "medicina regenerativa" es el uso de células madre y progenitores para repoblar órganos enteros, partes de los mismos o al menos sus funciones. De hecho, las células madre se pueden inyectar o implantar con procedimientos quirúrgicos relativamente menores, a menudo con una aparición insignificante de sucesos adversos. Debido a que las células madre no son inmunogénicas (o son mínimamente inmunogénicas), requieren relativamente pocos, en caso de requerirlos, inmunosupresores para la siembra inicial de las células.
- 25 [0004] Las células madre son células raras que requieren tecnologías precisas para su aislamiento y condiciones bien definidas para su propagación *in vivo* e *in vitro*. Por lo tanto, hay una necesidad urgente de establecer fuentes alternativas y complementarias de células madre trasplantables funcionales y células progenitoras y tejido para uso clínico.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 30 [0005] Aquí se describe y se proporciona una composición que comprende células madre/progenitoras multipotentes de mamífero capaces de diferenciarse en linajes endodérmicos múltiples (por ejemplo, linaje hepático, un linaje biliar, un linaje pancreático o una combinación de los mismos), donde las células se obtienen de tejido del árbol biliar (por ejemplo, cualquier porción del árbol biliar, incluidos el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común, el conducto hepatopancreático común, la vesícula biliar y las
- 35 glándulas peribiliares o células progenitoras o células madre derivadas de las glándulas peribiliares) de un mamífero, incluidos un mamífero humano, feto, neonato, niño (pediátrico), adulto o una persona fallecida hasta 72 horas *post mortem*. También se proporcionan composiciones que comprenden una población de células que comprenden tales células madre/progenitoras multipotentes de mamífero y/o una población de células de mamífero enriquecidas en tales células madre/progenitoras multipotentes.
- 40 [0006] Las células madre/progenitoras multipotentes pueden expresar: (i) al menos un marcador indicativo de linajes de células de hígado en fase temprana (por ejemplo, HNF6, HES1, CK19, albúmina o AFP); (ii) al menos un marcador indicativo de linajes de células pancreáticas en fase temprana (por ejemplo, PDX1, PROX1, NGN3 o insulina); y al menos un marcador seleccionado de los de las categorías (a)-(c): (a) al menos un marcador de superficie encontrado en células madre/progenitoras (por ejemplo, CD133 (prominina), CD44H (receptor de hialuronano), N-CAM, CXCR4 o EpCAM); (b) al menos un factor de transcripción indicativo de células madre/progenitores endodérmicos (por ejemplo, SOX 9, SOX17 o FOXA2), y (c) expresión débil a moderada de un gen de pluripotencia (por ejemplo, SOX2, NANOG, KLF4, OCT4A u OCT4). En algunos casos, las células madre/progenitoras multipotentes pueden expresar un marcador de cada una de las categorías (i), (ii) y (a)-(c). La expresión se puede determinar por ensayo de RT-PCR cuantitativa y de punto final y/o por inmunohistoquímica de
- 45 tejido *in vivo*, de células recién aisladas o de células cultivadas.
- 50

[0007] Las células multipotentes también pueden expresar al menos uno de los siguientes: (i) expresión nuclear de la proteína telomerasa; (ii) niveles bajos a moderados de expresión de genes de pluripotencia; (iii) expresión nuclear o perinuclear de factores de transcripción endodérmicos clásicos (por ejemplo, SOX17, SOX 9, FOXA2, HES1, HNF6, PROX1, HNF3B (factor nuclear de hepatocitos-3B, FOXA2, SALL4 (proteína similar a Sal 4), PDX 1, NGN3 o combinaciones de los mismos); (iv) expresión de marcadores de superficie de células madre/progenitoras endodérmicas; (v) ausencia de expresión o expresión de niveles bajos y variables de marcadores de linaje de hígado maduro (P450-3A4, transferrina, tirosina-transaminasa (TAT) y altos niveles de albúmina; los marcadores de linaje para el conducto biliar maduro comprenden AE2, CFTR, receptor de secretina, acuaporinas o combinaciones de los mismos), conducto biliar maduro o páncreas endocrino maduro (por ejemplo, insulina, glucagón, somatostatina, amilasa o combinaciones de los mismos); (vi) ausencia de expresión de marcadores de células mesenquimales, células endoteliales o células hematopoyéticas.

[0008] Una forma de realización de la invención es un método de obtención, aislamiento y/o identificación de células madre/progenitoras multipotentes de mamífero capaces de diferenciarse en múltiples linajes endodérmicos y se proporciona, donde las células se obtienen de tejido del árbol biliar (por ejemplo, el tejido del árbol biliar comprende el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común, el conducto hepatopancreático común y la vesícula biliar, o combinaciones de los mismos) de un mamífero, donde el método comprende obtener tejido del árbol biliar y obtener, secuencialmente, y en cualquier orden, o sustancialmente de manera simultánea células que son positivas para: (i) al menos un marcador de superficie de célula madre seleccionado de EpCAM, N-CAM, CXCR4, CD44H o CD133; (ii) al menos un marcador indicativo de fases de linaje celular hepático seleccionado de HNF6, HES1, CK19, albúmina o AFP; y (iii) al menos un marcador indicativo de fases de linaje celular pancreático seleccionado de PDX1, PROX1, NGN3 o insulina. También se describe un método de identificación y aislamiento de una población de células multipotentes de mamífero enriquecidas en las células madre/progenitores multipotentes de mamífero.

[0009] Según el método, el medio basal puede ser cualquier medio basal rico en nutrientes y sin cobre y bajo en calcio (por debajo de 0,5 mM), complementado preferiblemente con insulina, transferrina/Fe, selenio, zinc, ácidos grasos libres unidos a albúmina sérica y, opcionalmente, lipoproteína de alta densidad. Un ejemplo de un medio basal es RPMI 1640. Las células pueden opcionalmente cultivarse en plástico solo o en plástico recubierto con colágeno IV, colágeno III, laminina, hialuronanos, otros componentes de la matriz de tejidos embrionarios, fetales, neonatales o combinaciones de los mismos. Las células se cultivan durante al menos 24 horas y preferiblemente 7-21 días. Según el método, las células aisladas están enriquecidas al 80%, 90%, 95%, 95%, preferiblemente al 100% en las células madre de la presente invención. El aislamiento se puede realizar mediante tecnología de inmunoselección (por ejemplo, *panning*, selección mediante esferas magnéticas, citometría de flujo o combinaciones de las mismas) y/o condiciones de cultivo selectivas.

[0010] También se describe un método de propagación y/o expansión de las células madre/progenitoras multipotentes de mamífero novedosas, o una población que comprende tales células o enriquecida en tales células o una célula asociada de las mismas (por ejemplo, células mesenquimales, angioblastos y precursores de células estrelladas), que comprende: cultivar las células sobre plástico o hialuronanos, u opcionalmente sobre plástico recubierto con colágeno de tipo III o IV o hialuronano u otro componente de la matriz derivado de tejido fetal, neonatal o embrionario y en un medio basal que no contenga cobre, bajo en calcio (<0,5 mM), con insulina, transferrina/Fe, una mezcla de ácidos grasos libres unidos a albúmina sérica, y opcionalmente, lipoproteína de alta densidad.

[0011] Se proporciona un método de restricción de linaje de las células madre/progenitoras multipotentes novedosas a destinos de células de hígado de adulto. El método comprende (a) la obtención de una suspensión celular que comprende células madre/progenitoras multipotentes de mamífero capaces de diferenciarse en múltiples linajes endodérmicos, donde las células se obtienen de tejido del árbol biliar de un mamífero; (b) la inclusión de la suspensión celular en un hidrogel que comprende hialuronano o hialuronano combinado con otros componentes de la matriz (por ejemplo, colágeno de tipo IV, laminina o ambos); y (c) el cultivo de la suspensión celular en medio basal complementado con cobre, calcio ($\geq 0,5$ mM), insulina, transferrina/Fe, bFGF, hidrocortisona, glucagón, galactosa, triyodotiroxina (T3), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), lipoproteína de alta densidad y una mezcla de ácidos grasos libres unidos a albúmina, durante un tiempo suficiente para permitir su diferenciación en células de hígado.

[0012] Se proporciona un método de restricción de linaje de las células madre/progenitoras multipotentes novedosas a destinos de células pancreáticas de adulto. El método comprende (a) la obtención de una suspensión celular que comprende células madre/progenitoras multipotentes de mamífero capaces de diferenciarse en múltiples linajes endodérmicos, donde las células se obtienen de tejido del árbol biliar de un mamífero; (b) la inclusión de la suspensión celular en un hidrogel que comprende hialuronanos o hialuronanos combinados con otros componentes de la matriz; y (c) el cultivo de las células en un medio basal complementado con cobre, calcio ($\geq 0,5$ mM), B27, ácido ascórbico, insulina, transferrina/Fe, bFGF, ciclopamina, ácido retinoico, exendina 4,

lipoproteína de alta densidad y una mezcla de ácidos grasos libres unidos a albúmina; y carente de hidrocortisona durante un tiempo suficiente para permitir su diferenciación en células pancreáticas.

[0013] Se proporciona un método de restricción de linaje de las células madre/progenitoras multipotentes novedosas a destinos de células biliares de adulto. El método comprende (a) la obtención de una suspensión celular que comprende células madre/progenitoras multipotentes de mamífero capaces de diferenciarse en múltiples linajes endodérmicos, donde las células se obtienen de tejido del árbol biliar de un mamífero; (b) la inclusión de la suspensión celular en un hidrogel que comprende hialuronanos o hialuronanos en combinación con otros componentes de la matriz (por ejemplo, colágeno de tipo I); y (c) el cultivo de las células en un medio basal complementado con cobre, calcio ($\geq 0,5$ mM), insulina, transferrina/Fe, hidrocortisona, bFGF, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), lipoproteína de alta densidad y una mezcla de ácidos grasos libres unidos a albúmina, durante un tiempo suficiente para su diferenciación en colangiocitos.

[0014] Se proporciona un método de diferenciación de células *in vivo*, que comprende trasplantar las células madre/progenitoras multipotentes de mamífero, o poblaciones que comprenden tales células o enriquecidas en tales células, *in vivo* como suspensiones celulares o como implantes o injertos, con o sin restricción de linaje previa bajo condiciones de cultivo apropiadas, en el hígado, donde se diferencian en tejido hepático.

[0015] Se proporciona un método de diferenciación de células *in vivo*, que comprende trasplantar las células madre/progenitoras multipotentes de mamífero según la reivindicación 1, o poblaciones que comprenden tales células o enriquecidas en tales células, *in vivo* como suspensiones celulares o como implantes o injertos, con o sin restricción de linaje previa bajo condiciones de cultivo apropiadas, en el conducto biliar, donde se diferencian en tejido del árbol biliar.

[0016] Se proporciona un método de diferenciación de células *in vivo*, que comprende trasplantar las células madre/progenitoras multipotentes de mamífero según la reivindicación 1, poblaciones que comprenden tales células o enriquecidas en tales células, *in vivo* como suspensiones celulares o como implantes o injertos, con o sin restricción de linaje previa bajo condiciones de cultivo apropiadas en el páncreas, bajo la cápsula renal o en las almohadillas adiposas del epidídimo, donde se diferencian en tejido pancreático funcional.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017]

La **figura 1** es un diagrama esquemático que describe una célula madre biliar multipotente de la presente invención con la capacidad de diferenciarse en varios tipos de tejidos endodérmicos. Todas las células expresan factores de transcripción "endodérmicos" (E) (por ejemplo, SOX 9, SOX 17, FOXA2) y otros marcadores de poblaciones de células madre/progenitoras (antígenos de superficie tales como CD133, CD44H, EpCAM, CXCR4, NCAM). La restricción de linaje da como resultado varios destinos adultos, incluidos hígado, páncreas y árbol biliar.

La **figura 2** es un diagrama esquemático del árbol biliar que muestra sus conexiones con el hígado, el páncreas y el duodeno. Los sitios en los cuales se pueden encontrar altos números de glándulas peribiliares, los nichos de células madre del árbol biliar, se indican con una estrella.

La **figura 3** es una mezcla de imágenes de histología e inmunohistoquímica de diferentes regiones del árbol biliar y que se usaron para identificar marcadores y también los números y los tamaños de las glándulas peribiliares en todo el árbol biliar. (a) Distribución y caracterización de las glándulas peribiliares (PBG) en el árbol biliar extrahepático. Las PBG están presentes en las paredes de los conductos del árbol biliar y son sitios para las células madre/progenitores de árbol biliar. Se realizó una encuesta (n = 5 árboles biliares humanos examinados) de los números y los tamaños de las glándulas peribiliares en sitios variables en el árbol biliar, de los perfiles de marcadores de las PBG. La densidad de las PBG, expresada como superficie ocupada por ácidos de PBG/área total evaluada por análisis de imágenes; el número y la circunferencia se analizaron histológicamente en los diferentes sitios del árbol biliar extrahepático humano. La ampolla hepatopancreática mostró la densidad y el número máximos de PBG; se encontraron números aproximadamente iguales en el conducto cístico y el hilio; menos se encontraron en el conducto biliar; y ninguna en la vesícula biliar. *p < 0,01. Aumento original x10. **b:** Inmunohistoquímica de las PBG *in situ*. Las PBG son positivas para CK7, CK19, NCAM, CD133, insulina, EpCAM, SOX9, SOX 17 y PDX1 pero negativas (o niveles muy bajos) para albúmina. Se ve variación en estos marcadores de linaje temprano (por ejemplo, albúmina) entre varias glándulas peribiliares (véase la **figura 7** para evidencias con respecto a la albúmina). Aumento original x 40.

La **figura 4** muestra que las células madre se sitúan principalmente en las glándulas peribiliares (PBG). Nótese que hay variabilidad dentro de una única glándula peribiliar en la expresión de los marcadores de células madre, que en este caso es PDX1. Las flechas rojas indican los núcleos de las células que expresan el factor de transcripción; las flechas negras indican aquellas que no lo expresan.

La **figura 5** muestra SOX17 (A) y PDX1 (B) junto con EpCAM (verde) y núcleos teñidos de azul con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en glándulas peribiliares del conducto cístico.

La **figura 6** proporciona datos de inmunohistoquímica en tejido biliar humano y que muestra la expresión de EpCAM, SOX 9 y SOX17 en glándulas peribiliares del conducto cístico y el hilio.

La **figura 7** proporciona un resumen de las propiedades claves de las células madre del árbol biliar multipotentes. Estas incluyen marcadores de superficie de células madre/progenitores; factores de transcripción típicos de progenitores endodérmicos; expresión variable de marcadores de fase de linaje temprana del hígado, el árbol biliar y el páncreas; y, en la **figura 8**, la expresión débil a moderada de genes de pluripotencia. Los ensayos de RT-PCR representativos para el hilio hepático indican un amplio repertorio de factores de transcripción endodérmicos (SOX 9, SOX 17, FOXA2, PDX1, NGN3, etc.) y marcadores de superficie de células madre/progenitoras clásicos (por ejemplo, EpCAM, NCAM, CXCR4, CD133).

La **figura 8** muestra datos de RT-PCR que indican la expresión de genes de pluripotencia por el tejido del conducto cístico y el hilio. Su expresión débil a moderada proporciona una evidencia adicional de la capacidad de las células madre del árbol biliar para autorreplicarse. Los genes de pluripotencia son aquellos que se encuentran expresados en las células madre embrionarias (ES) y aquellos capaces de producir células madre pluripotentes inducidas (iPS) si se transfectan combinaciones variables de estos genes en células somáticas. Se han identificado al menos 5 genes: OCT 4, SOX2, NANOG, KLF4 y c-MYC. Se producen niveles débiles a moderados de expresión en el tejido del árbol biliar y en las células madre del árbol biliar aisladas para OCT 4, SOX2, NANOG, KLF4, pero no c-MYC.

Figura 9. La vesícula biliar no contiene glándulas peribiliares (como se muestra también en la **figura 3**). Sin embargo, las células que expresan algunos de los factores de transcripción y marcadores de superficie de células madre/progenitoras están presentes en las células de la vesícula biliar. Nótese que la tinción pardusca indicativa de la expresión del marcador evaluado (EpCAM o PDX1) está presente en las células en la superficie de la vesícula biliar.

La **figura 10** muestra datos de inmunohistoquímica sobre el tejido de la vesícula biliar que no tiene glándulas peribiliares. (a, c, d). Las células son positivas para EpCAM (verde) y tienen tinción perinuclear para factores de transcripción endodérmicos (se muestra SOX 17-rojo). (b) Las células también expresan PDX1 (rosa) y son marcadamente proliferativas, como indica la tinción de Ki67 (verde).

Figura 11. Colonias de células madre/progenitoras de tejido del árbol biliar. Las células se aislaron y se cultivaron en medio de Kubota sin suero y sobre plástico de cultivo. Se observaron tres tipos de colonias diferentes, tipos 1-3, bajo estas condiciones que no son permisivas para células maduras, sino que seleccionan células madre/progenitoras endodérmicas. La tinción inmunohistoquímica indica expresión para los genes específicos indicados con texto en el color indicado para el marcador. Todas las secciones están teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que proporciona un color azul que indica núcleos. Agregados de tipo de colonia 1 (a) de células que expresan fuertemente EpCAM, NCAM y ASBT. Las células crecieron lentamente (con divisiones cada 3-4 días o más). Células de tipo de colonia 2 (b) con un fenotipo estrechamente similar al de las hHpSC y donde el 100% de las células expresan EpCAM, NCAM pero ninguna expresa AFP (con divisiones cada 36-40 horas). El tipo de colonia 3 (c) está compuesto de células ondulatorias, arremolinadas con expresión de EpCAM en los bordes pero no en los interiores de las colonias y con altos niveles de expresión de SOX 17, PDX1 o SOX 9 en las células interiores (con divisiones cada 36-40 horas). El aumento para todas las imágenes es 20X. Las imágenes son representativas de los hallazgos de más de 10 experimentos donde las colonias se monitorearon durante 4-8 semanas.

Evidencia de una relación entre las células de los tipos de colonia 2 y 3 se muestra en una imagen con bajo aumento (4X) (d). Se desconoce si una es una precursora de la otra. Los ensayos de RT-PCR (e) indican la expresión de diversos genes en las colonias del conducto cístico frente a las de la vesícula biliar. Los ensayos de RT-PCR de los dos tejidos son bastante similares, pero aquellos del conducto cístico tienen una expresión débil de albúmina e insulina, dos genes no expresados por las células progenitoras que se obtuvieron de la vesícula biliar y cultivadas en medio de Kubota sin suero y sobre plástico.

Figura 12. Las células madre del árbol biliar, especialmente las de las colonias de tipo 2 y 3, se expanden de manera constante durante meses dando como resultado colonias de células con una expresión estable de marcadores de células madre/progenitoras. Esto es una evidencia parcial de la autorreplicación de las células; una evidencia adicional la proporciona la expresión de genes de pluripotencia (**figura 8**). Aquí se muestra una colonia de tipo 3 después de un mes en cultivo con mantenimiento de la expresión de PDX1 (naranja/rojo) en las células que están en el centro de la colonia y donde EpCAM (verde) se expresa solo en los bordes de la colonia, sitios en los cuales hay una ligera diferenciación. La tinción con DAPI (azul) indica los núcleos de las células.

Figura 13. Micrografía de fases de una colonia de células madre del árbol biliar en cultivo durante más de 8 semanas sobre plástico de cultivo y en medio de Kubota sin suero. La colonia se inició a partir de 1-2 células derivadas de tejido del árbol biliar humano adulto. Para estimar el número de células en la colonia, se obtuvieron imágenes aumentadas a partir de múltiples regiones de la colonia (aquellas representativas se indican en las áreas rectangulares demarcadas por contornos coloreados) y estas áreas se visualizaron con el *software* Metamorph y se usaron para obtener números de células. El muestreo de regiones dio como resultado estimaciones de más de 500.000 células en la colonia. Del tejido del árbol biliar fetal, observamos rutinariamente >50 de tales colonias; de tejido del conducto cístico y el hilio de adultos, obtuvimos rutinariamente >100 de tales colonias.

Figura 14. Ubicación de los factores de transcripción (o de la proteína telomerasa) en tejido (*in situ*) o en cultivos de células madre del árbol biliar. La inmunohistoquímica reveló que los factores de transcripción y la proteína telomerasa estaban presentes intranuclearmente en algunas células y perinuclearmente o citoplásmicamente en otras. La importancia de esto no se conoce, aunque hipotetizamos que la localización nuclear implica un factor activo y la ubicación perinuclear o citoplásmica puede ser una forma de almacenamiento. En estas imágenes, SOX 17 se expresa en el núcleo de algunas, pero no todas, de las células de una glándula peribiliar *in vivo* (datos *in situ*) y se expresa en el núcleo de todas las células madre del árbol biliar en cultivo sobre plástico y en medio de Kubota. En las imágenes de los cultivos, los núcleos son azules por la tinción con DAPI; algunas de las células expresan EpCAM (verde); pero todas tienen una localización intranuclear de SOX 17 (rojo). Cuando las imágenes se combinan, los núcleos aparecen de color rosa (colores azul y rojo combinados).

Figura 15. Células madre del árbol biliar de colonias de tipo 3 que presentan tanto localización nuclear como perinuclear del factor de transcripción SOX 17 (rojo/rosa). Las células en el perímetro de la colonia son positivas para EpCAM (verde). Los núcleos están teñidos de azul con DAPI.

Figura 16. Tinción *in situ* de células de la vesícula biliar que presentan tinción solo perinuclear y citoplásmica de SOX 17 (rojo/naranja). Las membranas celulares son positivas para EpCAM (verde) y los núcleos están teñidos azul con DAPI.

Figura 17. Multipotencialidad de las células madre del árbol biliar. Efectos de medios hormonalmente definidos (HDM) solo sobre la diferenciación a un destino hepatocítico o colangiocítico. Las células madre permanecen indefinidamente como células madre/progenitores si se cultivan sobre plástico y en medio de Kubota. Se diferenciarán hacia un destino adulto si el medio se cambia a un medio hormonalmente definido (HDM) adaptado para un destino adulto. Se diferenciarán más rápido y de manera más eficaz a un destino adulto si el HDM se usa en combinación con la siembra de las células sobre o incluyéndolas en formas de matriz extracelular (**figuras 20-22**). En estos estudios se muestran datos representativos que indican el efecto de un HDM específico sobre la diferenciación de las células madre/progenitores del árbol biliar hacia un destino hepatocítico (HDM-L) frente a uno colangiocítico (HDM-C).

Las células madre/progenitores del árbol biliar de colonias mantenidas bajo condiciones de autorreplicación (plástico de cultivo y medio de Kubota sin suero o su equivalente) se transfirieron a HDM adaptado o para hepatocitos (HDM-L), la fila superior de imágenes, o para colangiocitos (HDM-C), el panel inferior de imágenes. **Efectos del HDM-L:** Inmunofluorescencia (a) después de 7 días. Las células fueron positivas de forma difusa para CK18 (rojo) y/o albúmina (verde azulado). Aumento: 20X. Datos semicuantitativos (c) que comparan los números de hepatocitos (células CK18+/albúmina+) bajo condiciones de autorreplicación (puntuación: 0) frente a en HDM-L (puntuación: $2,2 \pm 0,8$), hallazgos que se traducen en >20% de las células con un linaje restringido a un destino hepatocítico. **Efectos del HDM-C:** Inmunofluorescencia (b) después de 7 días. Las células fueron positivas de forma difusa para CK7, receptor de secretina (SR) y CFTR. Coexpresaron CK7/SR y CK7/CFTR. Los aumentos originales son 20X, salvo para c4 y c5, que son 40X. Estimación semicuantitativa (c) del % de células SR+/CFTR+ en las condiciones para la autorreplicación ($0,2 \pm 0,4$; <5% de las células) frente a en el HDM-C ($3 \pm 0,7$, que equivale a más del 30 % de las células con un linaje restringido a colangiocitos).

Figura 18. Multipotencialidad de las células madre del árbol biliar. Efectos del medio hormonalmente definido adaptado a páncreas (HDM-P) solo sobre la diferenciación a un destino pancreático. **Efectos del HDM-P:** Inmunofluorescencia para marcadores pancreáticos después de 7 días de cultivo en HDM-P. En la periferia de las colonias, se produjeron una agregación y una condensación celulares para formar estructuras similares a islotes (**a, d**) que contienen péptido C (**a, b**), PDX-1 (**c**) e insulina (**d**). Se encontraron células indiferenciadas (células EpCAM+) en los centros de las colonias (**e**). Aumentos originales: 20X. El número de estructuras similares a islotes (**f**) encontradas en las condiciones para la autorreplicación ($1 \pm 0,7$; <10% de las células) fue muy inferior que en el HDM-P ($3,8 \pm 1,3$; ~40% de las células). Los niveles de péptido C (**g**) en ng/μg de proteína bajo concentraciones de glucosa encontradas en todas las formulaciones de RPMI 1640 (11,1 mM) para una incubación de 2 horas en las condiciones para la autorreplicación fueron $4,5 \pm 2,25$ frente a $12,3 \pm 1,9$ ng/μg en el HDM-P. Los datos se expresan como medias $\pm$ error típico, N = 4; *p < 0,05. (**h**) Se observó la secreción de péptido C estimulada por glucosa en los controles de HDM-P, con los niveles del péptido C en el medio, en μg/l, a $1,10 \pm 0,32$ μg/l en niveles bajos de glucosa (5,5 mM) hasta $1,92 \pm 0,43$ μg/l en alto contenido de glucosa (22 mM) n = 7; *p < 0,01.

Figura 19. Multipotencialidad de las células madre del árbol biliar. Análisis de RT-PCR cuantitativa (q) para los efectos del medio solo. Los ensayos se realizaron en cultivos de células madre del árbol biliar mantenidos bajo condiciones de autorreplicación (plástico de cultivo y medio de Kubota) frente a en un medio hormonalmente definido sin suero (HDM-L o HDM-C o HDM-P) solo adaptado para hepatocitos, colangiocitos frente a células pancreáticas. Los niveles de expresión de ARNm relativos se calcularon clasificando los valores ΔC_t normalizados contra la media geométrica de los tres genes de mantenimiento más estables. Los datos se indican más o menos ($\pm$) la desviación típica. Los niveles de significación para cada uno de estos fueron *p<0,05. n = el número de experimentos realizados.

Figura 20. Multipotencialidad de las células madre del árbol biliar. Efectos tanto de un HDM como de componentes de la matriz extracelular sobre la diferenciación de las células madre del árbol biliar. Las células madre biliares se cultivaron sobre plástico y en medio de Kubota o su equivalente (condiciones de autorreplicación) durante más de un mes, dando como resultado colonias tales como la que aparece en (a). Tal colonia representativa fue dispersada, y las células se transfirieron a una de 3 condiciones de

diferenciación, presentadas en un formato tridimensional (3-D) y compuestas de un HDM + componentes de la matriz adaptados para el destino adulto deseado: una para colangiocitos (b), hepatocitos (c) o para células β pancreáticas (d). Se mantuvieron durante hasta 9 días en cultivo y luego se evaluaron los destinos específicos tisulares, lo que indicó que se puede restringir el linaje de estas células madre del árbol biliar a múltiples destinos adultos (aquí se proporcionan los ejemplos de colangiocitos, hepatocitos o células β pancreáticas) dependiendo de las condiciones de cultivo. Fila 3 = tinción con ditizona (DTZ) (indicación de células α y β pancreáticas). D = días en cultivo; Glu = glucagón; C-P = péptido C, indicativo de secreción de insulina.

Figura 21. Microscopía electrónica de transmisión de células madre del árbol biliar bajo condiciones de autorreplicación (a-b) frente a aquellas en las condiciones de diferenciación 3-D para producir células de hígado maduras (c-d). Había presencia de células grandes y poligonales y los núcleos celulares muestran uno o más nucléolos. (c) Las células adyacentes forman canalículos de bilis bien definidos (*flechas*). Los canalículos de bilis están cerrados por complejos de unión (*puntas de flecha*). Pocas microvellosidades están presentes en el lumen. (d). Así, las células fueron capaces de madurar a hepatocitos y colangiocitos intrahepáticos adultos. Barra = 2 μ m.

Figura 22. Prueba de la multipotencialidad de las células madre/progenitores del árbol biliar proporcionada por análisis de RT-PCR cuantitativa (q) en cultivos bajo condiciones de autorreplicación frente a condiciones de diferenciación 3-D. **a.** Las células madre/progenitores del árbol biliar se cultivaron en medio de Kubota y sobre plástico durante 2 meses (condiciones de autorreplicación). Las colonias o se mantuvieron en esas condiciones y por tanto produciendo células madre/progenitoras biliares (BP) o se transfirieron a las condiciones de diferenciación 3-D para hepatocitos (B-L), colangiocitos (B-C) o islotes pancreáticos (B-P), y todas se cultivaron durante 2 semanas adicionales. Los cultivos se prepararon luego para el análisis de qRT-PCR de genes relevantes para cada uno de los destinos adultos. Los datos se prepararon como histogramas en los que a los niveles de expresión de los genes en las condiciones de autorreplicación (BP) se les dio el valor de 1,0, y el valor de cada gen en las células después de la diferenciación a un destino adulto se dio como el factor de cambio relativo al de las BP. El asterisco en algunos de los histogramas indica aquellos de significación estadística ($p < 0,01$ o $p < 0,001$). N = 2, cada experimento con muestras por triplicado. **BP** = células madre/progenitores biliares; **B-C** = células con el linaje restringido al conducto biliar (colangiocitos); **B-L** = células con el linaje restringido al hígado (hepatocitos); **B-P** = células con el linaje restringido al páncreas (islotes). Los genes evaluados fueron **GGT1** = gamma glutamil transpeptidasa-1; **AE2** = intercambiador aniónico 2; **CFTR** = regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística; **HNF4a** = factor nuclear de hepatocitos 4A; **AFP** = alfa-fetoproteína; **ALB** = albúmina; **TF** = transferrina; **TAT** = tirosina-transaminasa; **CYP3A4** = citocromo P450 3A4; **pdx1** = caja homeótica pancreática y duodenal 1; **ISL-1** = caja homeótica LIM ISL 1; **NGN3** = neurogenina 3; **INS** = insulina; **GCG** = glucagón.

Figura 23. Multipotencialidad de las células madre del árbol biliar indicada por los estudios *in vivo*: destino hepático. Se mantuvieron las células madre del árbol biliar en cultivo bajo condiciones de autorreplicación (medio de Kubota o su equivalente y plástico de cultivo) y luego se inyectaron en los hígados de ratones inmunocomprometidos adultos con hígados estables (es decir, no se indujo ninguna lesión en el hígado). Las secciones de hígado obtenidas de los ratones se analizaron luego por inmunohistoquímica para marcadores específicos humanos indicativos de hepatocitos. En esta imagen, la sección se tiñó para el anti Hepar-1 humano de Dako. Las secciones revelaron que se puede identificar el $6,52 \pm 2,5\%$ del área total ocupada por hepatocitos humanos positivos para el Hepar-1 humano, un marcador de hepatocitos clásico.

Figura 24. Multipotencialidad de las células madre del árbol biliar indicada por trasplante *in vivo*: destino de árbol biliar. Las células madre del árbol biliar se mantuvieron en cultivo bajo condiciones de autorreplicación (medio de Kubota o su equivalente y plástico de cultivo) y luego se inyectaron en los hígados de ratones inmunocomprometidos adultos con hígados estables (es decir, no se indujo ninguna lesión en el hígado). Las secciones de hígado obtenidas de los ratones se analizaron luego por inmunohistoquímica para marcadores específicos humanos indicativos de colangiocitos. El anti-CK7 humano de Dako, un marcador de colangiocitos, se encontró por término medio en el $12,7 \pm 5,5\%$ de todos los colangiocitos. Comparando la evidencia para los colangiocitos humanos en conductos de bilis pequeños frente a grandes, se descubrió que $\sim 14,92 \pm 5,9\%$ células en los conductos de bilis grandes y $\sim 5,02 \pm 1,95\%$ de las células en los conductos de bilis pequeños fueron positivas para CK7 humano.

Figura 25. Multipotencialidad de las células madre del árbol biliar indicada por trasplante *in vivo*: destino pancreático. Las células madre del árbol biliar se mantuvieron en cultivo bajo condiciones de autorreplicación (medio de Kubota o su equivalente y plástico de cultivo) y luego se inyectaron en las almohadillas adiposas del epidídimo (EFP) de ratones macho Balb/C Rag2^{-/-}/Il2rg^d. Cada ratón fue inyectado con 200-400 neoislotes, agregados celulares de células madre del árbol biliar con el linaje restringido durante 7-14 días hacia un destino de islote pancreático en las condiciones de diferenciación 3-D de un HDM-P más un hidrogel que contiene hialuronano, colágeno de tipo IV y laminina. Cada neoislote estaba comprendido por más de 1000 células. Los ratones de control fueron trasplantados con Matrigel sin células. Los niveles de glucosa de los ratones se monitorearon a diario y fueron hiperglucémicos (600-750 mg/dl) durante aproximadamente 3 meses. A los 3 meses, los niveles de glucosa en los ratones trasplantados habían caído a niveles que eran menos de la mitad que en los controles. Las pruebas de tolerancia a la glucosa se realizaron el día postoperatorio 68 y 91 y mostraron niveles de sangre significativos de péptido C humano en los ratones experimentales, y estos niveles eran regulables por glucosa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0018] La presentes invención surge del descubrimiento inesperado hasta la fecha de una célula madre o progenitora multipotente, y poblaciones celulares que comprenden tales células madre o progenitoras multipotentes, encontradas en el árbol biliar y con la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes endodérmicos, incluidos hígado, páncreas y árbol biliar (**figura 1**). En interés de la claridad para esta solicitud, el término "células madre del árbol biliar" se usará en la presente para referirse a la célula madre o progenitora multipotente de mamífero descrita, las poblaciones celulares que comprenden tales células y las poblaciones celulares enriquecidas en tales células.

[0019] Las células madre del árbol biliar multipotentes se pueden aislar de cualquier porción de tejido del árbol biliar, pero se encuentran especialmente en altos números en las glándulas peribiliares y en los puntos de ramificación del árbol, que se indican con estrellas en la imagen esquemática de la **figura 2**. Las estrellas encontradas en los terminales de ramificación más pequeños en el hígado se refieren a los canales de Hering, el nicho de células madre para células madre hepáticas intrahepáticas. Las células madre del árbol biliar son precursoras de las células madre hepáticas intrahepáticas.

Abastecimiento de células-árbol biliar

[0020] El árbol biliar o sistema de árbol biliar extrahepático está compuesto de una serie de conductos que conectan el duodeno al hígado y al páncreas y que incluye la vesícula biliar (véase el dibujo esquemático de la **figura 2**). En todo el árbol biliar, en las paredes de los conductos, hay glándulas peribiliares (**figuras 3-11**), que se pueden encontrar en números particularmente altos en los sitios de ramificación tales como el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común, el conducto hepatopancreático común y la vesícula biliar. Los fluidos del hígado o del páncreas ventral se vacían en el duodeno a través de la papila de Vater. Todo este grupo de estructuras, incluida la vesícula biliar, se denomina en la presente el árbol biliar.

[0021] Todo el árbol biliar (por ejemplo, el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común, el conducto hepatopancreático común y la vesícula biliar) tiene paredes compuestas por tejido conjuntivo fibroso denso y un lumen revestido con una capa de epitelio biliar altamente columnar soportado por una membrana basal convencional. Las células de músculo liso están dispersas a lo largo de los conductos, particularmente cerca de la papila de Vater. Ocasionalmente se encuentran vasos sanguíneos, fibras nerviosas y algunas células linfoides en las paredes de los conductos. Las glándulas peribiliares se encuentran a lo largo de toda la longitud del árbol biliar y en números especialmente altos en el conducto hepatopancreático común y el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común y la vesícula biliar. **Figuras 3-7.**

[0022] La vesícula biliar tiene diferentes características (**figuras 9, 10**). El lumen está revestido por epitelios columnares, una capa de músculo apropiada y tejido conjuntivo subseroso. No hay presente ninguna glándula peribiliar en la vesícula biliar (**figuras 3, 9**). Sin embargo, la vesícula biliar sí que tiene células con fenotipos solapados con los de las poblaciones de células madre del árbol biliar encontradas en las glándulas peribiliares, son células de amplificación en tránsito y/o progenitores comprometidos.

[0023] Las células de la divulgación se pueden aislar de tejido del árbol biliar en cualquier fase de desarrollo. Así, la presente invención puede ponerse en práctica con tejido fetal, neonatal, pediátrico o adulto, incluido tejido de individuos recién fallecidos (preferiblemente, dentro de 10 horas, pero las células de la invención permanecen viables para el aislamiento hasta 72 horas *post mortem*). De hecho, el tejido del árbol biliar es único en el hecho de que está disponible fácilmente de donantes fetales, pediátricos y adultos. Además, la presente invención puede ponerse en práctica con tejido de los órganos hígado y páncreas obtenidos para, pero luego rechazados, un trasplante o de tejido de biopsia, de tejido de resección.

[0024] Además, las instrucciones en la presente no están limitadas o son aplicables a cualquier especie de mamífero. De hecho, debe entenderse que los ejemplos proporcionados en la presente son meramente ejemplares y no deben interpretarse como limitantes. De esta manera, la presente invención, no está limitada por su fuente de mamífero para el tejido del árbol biliar. Los mamíferos de los que pueden derivar las células madre del árbol biliar incluyen, pero de forma no limitativa, seres humanos, roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hamsters), conejos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, perros y gatos. Preferiblemente, las células madre del árbol biliar derivan de seres humanos para usar en seres humanos.

[0025] Como se indica, la clase de células madre del árbol biliar se puede diferenciar en múltiples destinos endodérmicos. De hecho, las células madre del árbol biliar se pueden inducir para diferenciarse en los tipos celulares maduros de varios linajes endodérmicos, incluidos hígado, árbol biliar y páncreas. **Figuras 17-25.**

[0026] Las muestras de tejido del árbol biliar se pueden seccionar quirúrgicamente de hígados o páncreas obtenidos y luego rechazados para un trasplante debido a razones tales como una esteatosis; una anomalía anatómica o una enfermedad vascular mayor; o se pueden obtener de material de resección. Pueden ser de vesículas biliares eliminadas por varias razones. El tejido del árbol biliar se puede eliminar del tejido conjuntivo del abdomen. El tejido se divide luego en segmentos y se procesa adicionalmente. Los segmentos que son especialmente ricos en las células madre del árbol biliar incluyen: el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común, el conducto hepatopancreático común y la vesícula biliar. Cada parte se puede seccionar adicionalmente en trozos cortando a lo largo del diámetro longitudinal.

[0027] Se ha demostrado que las células madre del árbol biliar dan lugar a múltiples destinos endodérmicos, incluidos células de hígado, árbol biliar y páncreas (**figuras 17-25**). Las células madre del árbol biliar expresan la proteína telomerasa; niveles bajos a moderados de genes de pluripotencia (Nanog, SOX2, KLF4 y OCT4 –**Figura 8**); factores de transcripción endodérmicos clásicos (por ejemplo, SOX17, SOX 9, FOXA2, HNF6, PROX1, HNF3B (factor nuclear de hepatocitos 3B (también conocido como FOXA2), SALL4 (proteína similar a Sal 4), PDX 1 y NGN3); marcadores de superficie endodérmicos (por ejemplo, CD326/molécula de adhesión celular epitelial o EpCAM; CD56/molécula de adhesión celular neuronal o NCAM); CXCR4; y varios genes de células madre/progenitores (por ejemplo, CD44H– receptores de hialuronano y CD133, también llamado prominina). **Figuras 7, 8, 9, 13.**

[0028] Además, aparentemente debido a su multipotencia, las células madre del árbol biliar expresan niveles bajos y variables de marcadores de linaje temprano del hígado (por ejemplo, HNF6, HES1, FOXA2 y albúmina variable), el conducto biliar (por ejemplo, citoqueratina 19) y el páncreas endocrino (por ejemplo, PDX1, NGN3, SALL4, insulina). **Figuras 7, 22.**

[0029] Sobre todo, las células madre del árbol biliar expresan los factores de transcripción PDX1 y NGN3 (**figuras 3, 4, 7, 11**), conocidos por ser esenciales para el desarrollo del páncreas y el páncreas endocrino, respectivamente. Sin embargo, las células madre del árbol biliar no expresan o expresan solo débilmente marcadores maduros de los colangiocitos (por ejemplo, receptor de secretina, acuaporinas), los hepatocitos (por ejemplo, albúmina, tirosina-transaminasa o TAT, transferrina, P450 "tardíos" tales como P450-3A4) o células de los islotes (por ejemplo, glucagón, somatostatina, amilasa o altos niveles de insulina) (**figuras 3, 7, 13**). No expresan en absoluto los marcadores de las células mesenquimales (por ejemplo, CD 146, desmina), las células endoteliales (por ejemplo, receptor de VEGF, CD31, factor de von Willebrand) o células hematopoyéticas (por ejemplo, CD45). El patrón de expresión de los antígenos es estable a lo largo de toda la vida de los cultivos siempre y cuando se mantengan bajo condiciones de autorreplicación consistentes en medio de Kubota o su equivalente y con un sustrato de plástico de cultivo o hialuronanos.

[0030] Estos patrones de expresión se pueden determinar usando ensayos de RT-PCR cuantitativa (q) y de punto final y por inmunohistoquímica de tejido *in vivo*, de células recién aisladas o de células cultivadas. La coexpresión en células dentro de la misma glándula peribiliar de múltiples marcadores de células madre/progenitores endodérmicos (por ejemplo, SOX 9, SOX17, PDX1, NGN3, FOXA2) es una característica única y sorprendente que es distintiva de los hallazgos con respecto a las células madre embrionarias (ES) que están experimentando una restricción de linaje a páncreas y en las cuales estos factores de transcripción se observan secuencialmente, pero no todos al mismo tiempo. Además, la expresión de estos factores de transcripción está ausente en las células biliares maduras en la superficie luminal de los conductos de bilis.

[0031] Las células madre del árbol biliar, como se ha explicado anteriormente, son progenitores de tejidos endodérmicos maduros y comparten marcadores con las células de los múltiples tejidos a los que pueden dar lugar, incluido hígado, árbol biliar y páncreas.

[0032] Además de sus relativos niveles de expresión, la localización celular de la telomerasa y de los factores de transcripción (por ejemplo, SOX 17, PDX1) expresados en las células madre del árbol biliar cambia de una localización nuclear a una localización perinuclear/citoplásmica durante la maduración (véase la **figura 7** y también las **figuras 14-16**). Dentro de una glándula peribiliar única, se observan algunas células con una localización nuclear y algunas células con una perinuclear o sin expresión del marcador dado (**figuras 4, 6, 7, 14**). Sin estar sujetos o limitados por la teoría, la localización intranuclear se asocia a células más primitivas que aquellas con una localización perinuclear del/de los factor(es) de transcripción. Se asume que estas últimas células están en transición hacia una fase de linaje posterior. Alternativamente, la localización perinuclear podría indicar que el/los factor(es) está(n) en una forma inactiva de almacenamiento que se puede translocar al núcleo bajo demandas regenerativas apropiadas.

[0033] La presente invención proporciona técnicas para el aislamiento de células madre del árbol biliar. Las poblaciones de células madre de tejido del árbol biliar humano fueron identificadas por tecnologías de selección de cultivos, pero se pueden aislar también por tecnologías de inmunoselección (por ejemplo, citometría de flujo,

panning, aislamiento mediante esferas magnéticas). Alternativamente, o además de la inmunoselección, las células madre del árbol biliar se pueden aislar en virtud de las condiciones de cultivo tisular. Por ejemplo, las suspensiones celulares obtenidas a partir del tejido del árbol biliar se pueden sembrar sobre plástico o hialuronanos. El plástico se recubre opcionalmente con colágeno IV, colágeno III, laminina, hialuronanos, otros componentes de la matriz encontrados en los tejidos embrionarios/fetales o combinaciones de los mismos.

[0034] El medio usado para la selección de cultivos, el medio de Kubota sin suero o su equivalente, es fuertemente selectivo para la supervivencia y la proliferación de las células madre del árbol biliar y sus células mesenquimales, angioblastos y precursores de células estrelladas asociados, pero no es selectivo para las células maduras del árbol biliar. La esencia de este medio es que sea cualquier medio basal que no contenga cobre, bajo en calcio (<0,5 mM), con insulina, transferrina/Fe, ácidos grasos libres unidos a albúmina purificada y, opcionalmente, también lipoproteína de alta densidad.

[0035] El medio de Kubota o su equivalente no tiene suero y contiene solo una mezcla purificada y definida de hormonas, factores de crecimiento y nutrientes. Más específicamente, el medio está compuesto de un medio basal sin suero (por ejemplo, RPMI 1640) que no contiene cobre, bajo en calcio (< 0,5 mM) y complementado con insulina (5 µg/ml), transferrina/Fe (5 µg/ml), lipoproteína de alta densidad (10 µg/ml), selenio (10^{-10} M), zinc (10^{-12} M), nicotinamida (5 µg/ml) y una mezcla de ácidos grasos libres unidos a una forma de albúmina purificada. Los métodos detallados para la preparación de este medio se han publicado en otra parte, por ejemplo, Kubota H, Reid LM, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 2000; 97: 12132-12137.

[0036] Estas condiciones producen colonias de células madre del árbol biliar que crecen rápidamente durante semanas (más de 8 semanas), con velocidades de proliferación estimadas en una división cada 36-40 horas. **Figuras 11-13.** Los cultivos son capaces de permanecer de forma estable como células madre/progenitores durante más de 8 semanas (**figura 13**), evidencia de que están experimentando la autorreplicación. Esta evidencia de autorreplicación está apoyada además por el hallazgo de niveles débiles a moderados de expresión de genes de pluripotencia. **Figura 8.** El número de colonias obtenidas es máximo en los cultivos de las porciones de los árboles biliares que tienen gran número de glándulas peribiliares e intermedio en aquellos de sitios distintos a los puntos de ramificación del árbol biliar o de la vesícula biliar sin glándulas peribiliares.

Restricción de linaje y diferenciación a destinos adultos

[0037] De acuerdo con la multipotencia de las células madre del árbol biliar, si una colonia se mantiene durante semanas (por ejemplo, más de un mes en cultivo) bajo condiciones de autorreplicación y luego el medio se cambia a un medio hormonalmente definido (HDM) sin suero adaptado para un tipo de célula adulta específico, las células se diferenciarán parcialmente hacia el tipo de célula adulta designado (**figuras 17-19**). En un HDM para hígado (HDM-L), 20-30 % de las células adquirieron la expresión de citoqueratina 8 y 18 y albúmina, mientras que, en un HDM para colangiocitos (HDM-C), más de la mitad de ellas maduraron a células con expresión de receptor de secretina y CFTR. **Figura 17.** El nivel de expresión de albúmina humana en los cultivos en HDM-L y la expresión de receptor de secretina en aquellos en HDM-C fueron significativamente superiores a aquellos en medio de Kubota o su equivalente (condiciones de autorreplicación) en ensayos que usan una RT-PCR cuantitativa (**figura 19**).

[0038] Se producía una restricción de linaje parcial de las células hacia un destino de islote pancreático si las células madre del árbol biliar se cultivaban en un HDM para páncreas (HDM-P). **Figura 18.** La diferenciación se producía principalmente en los bordes de las colonias, sitios en los cuales se formaron agregados de células y dentro de los cuales se encontraron péptido C, PDX1 e insulina humanos. Más de la mitad de las colonias de células adquirieron la capacidad de producir péptido C humano (**figuras 18h y 18g**), indicativa de la síntesis de insulina humana, y esta síntesis de péptido C era regulable por los niveles de glucosa (**figura 18h**). El nivel de insulina humana producida fue significativamente mayor en los cultivos en HDM-P en comparación con aquellos restantes como células madre bajo condiciones de autorreplicación. (**Figura 19**).

[0039] La extensión de la multipotencialidad se demostró más drásticamente cuando las células se sembraban en condiciones de diferenciación 3-D distintas compuestas por el HDM específico (HDM-L, HDM-C, HDM-P) en combinación con la inclusión de las células en hidrogeles que contienen componentes de la matriz extracelular específicos adaptados para el tipo de célula adulta de interés (**figura 20**). Las células se diferenciaron rápidamente (por ejemplo, 7-10 días) a tipos de célula adulta específicos –produciendo cordones de células de hígado en HDM-L en combinación con hidrogeles de hialuronanos que contienen colágeno de tipo IV y laminina; conductos de bilis con ramificaciones, es decir, el árbol biliar, en HDM-C en combinación con hidrogeles de hialuronanos que contienen colágeno de tipo I; o neoisloles pancreáticos (páncreas endocrino) en el caso del HDM-P y en hidrogeles que contienen colágeno de tipo IV y laminina.

[0040] Se hallaron evidencias adicionales de la diferenciación bajo las condiciones de cultivo 3-D para las células madre del árbol biliar bajo condiciones de autorreplicación (**figura 21, a y b**) frente a las condiciones adaptadas para los hepatocitos (**figura 21, c y d**) y luego se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión. Microscopía electrónica de transmisión de células madre del árbol biliar bajo condiciones de auto replicación (a-b) frente a hepatocitos (c-d). Bajo las condiciones de diferenciación, había presencia de células grandes y poligonales, y los núcleos celulares presentan uno o más nucléolos. Las células adyacentes forman canalículos de bilis bien definidos (*flechas*). Los canalículos de bilis están cerrados por complejos de unión (*puntas de flecha*). Pocas microvellosidades están presentes en el lumen. La barra en las figuras es igual al 2 µm.

[0041] Se proporciona una prueba de que las condiciones de diferenciación dieron como resultado células adultas funcionales en la **figura 22** que contiene datos de RT-PCR cuantitativa de cultivos bajo condiciones de autorreplicación que producen células madre/progenitores biliares (BP) frente a bajo las condiciones 3-D para hígado (B-L), árbol biliar/colangiocitos (B-C) o páncreas (B-P). La fila superior indica el aumento drástico en la expresión de genes de hígado clásicos ---HNF4, AFP, albúmina, tirosina-transaminasa (TAT), transferrina (TF) y P450-3A4--- en los cultivos bajo condiciones para hígado, pero no bajo aquellas para las células madre/progenitores o para el árbol biliar o el páncreas. En contraste, aquellos sembrados bajo condiciones para páncreas (segunda fila) mostraron aumentos muy drásticos en la expresión génica para PDX-1, ISL-1, NGN3, insulina, glucagón (GCG) bajo las condiciones para páncreas (B-P), pero no aquellas para células madre/progenitores o el hígado o el árbol biliar. Aquellos sembrados bajo condiciones para el árbol biliar mostraron aumentos de la expresión de GGT1, AE2, CFTR. Los cultivos de células madre del árbol biliar transferidas de nuevo bajo las condiciones de autorreplicación mantuvieron altos niveles de EpCAM y bajos niveles de todos los genes específicos de adultos.

[0042] Esta multipotencialidad se demuestra también cuando las células se trasplantan *in vivo* (**figuras 23-25**). Se trasplantaron células madre del árbol biliar humanas en ratones inmunocomprometidos y entonces la presencia de células humanas maduras injertadas se evaluó posteriormente en los tejidos. Incluso en los ratones con hígados estables, es decir, no sometidos a lesiones del hígado, las células fueron capaces de injertarse y madurar en números significativos de hepatocitos (**figura 23**) y colangiocitos (**figura 24**). Además, los ratones trasplantados con las células dirigidas a un destino pancreático fueron sometidos a fármacos que los hacían diabéticos, y las células trasplantadas fueron capaces de rescatarlos de la afección diabética, y estas células demostraron ser sensibles a los niveles de glucosa en cuanto a la producción de péptido C humano (**figura 25**).

[0043] Aunque se han identificado múltiples precursores y se ha demostrado que se diferencian en células de hígado maduro, las células madre del árbol biliar identificadas en la presente solicitud, y presentes en tejidos fetales, neonatales, pediátricos y adultos son las primeras células madre y poblaciones celulares identificadas hasta la fecha que se pueden aislar a partir de tejidos adultos y se ha probado que son capaces de diferenciarse en tipos celulares pancreáticos maduros. Estas células son también las primeras identificadas que se pueden usar inmediatamente en programas clínicos para la diabetes debido a su demostrada capacidad de diferenciarse en células de los islotes pancreáticos, su ausencia de potencial tumorigénico (como sí existe para las células ES o las células que se transfectan con genes críticos para la diferenciación en páncreas) y ausencia de inmunogenicidad.

[0044] Las células madre del árbol biliar son los precursores naturales de páncreas y pueden diferenciarse fácil y rápidamente (dentro de unos pocos días en cultivo) a destinos pancreáticos usando meramente condiciones microambientales específicas. Además, la transición a la clínica está facilitada también por el hecho de que las condiciones microambientales necesarias están disponibles en formas GMP y ahora son parte de terapias clínicas existentes. Por lo tanto, al menos una aplicación clínica es el uso de las células madre del árbol biliar descritas en la presente para la repoblación, el rescate, el soporte, la reparación, la sustitución o la introducción, completos o parciales, de células pancreáticas de tipo beta para el tratamiento de la diabetes (**figura 25**) o para formas de fallo, insuficiencia o degeneración hepáticos (**figuras 23 y 24**).

[0045] Debe ser aparente para una persona experta en la materia, en vista de la divulgación en la presente, que las células madre del árbol biliar tienen numerosas aplicaciones en la terapia y el tratamiento clínicos. La adquisición de las células madre del árbol biliar puede ser un procedimiento relativamente no invasivo y relativamente inocuo para el paciente. La capacidad de propagar estas células madre biliares *in vitro* facilita la capacidad de obtener células suficientes para los programas clínicos (por ejemplo, 10^6 - 10^9 células). La cantidad de células madre necesarias para programas de terapias celulares se genera fácilmente dentro de unas pocas semanas después de procurar, procesar y cultivar las células como se indica en la **figura 13**.

[0046] Las células madre del árbol biliar provistas para terapia se pueden preparar a partir de un donador dado y luego devolverse a la misma persona, lo que constituye una terapia autóloga sin problemas inmunitarios en cuanto a rechazo celular, ya que, preferiblemente, las células y el receptor son genéticamente idénticos. Alternativamente, las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar proporcionadas para la terapia se pueden preparar a partir de un donador dado y luego dárseles a otra persona, lo que constituye una terapia

allogénica, ya que las células madre del árbol biliar son no inmunogénicas o mínimamente inmunogénicas. Finalmente, las células madre del árbol biliar deberían estar relativamente libres de riesgo en la experimentación animal y en los cultivos con respecto al potencial oncogénico. En todos los estudios *in vivo* hasta la fecha, no ha habido evidencia en absoluto de potencial tumorigénico.

[0047] Las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar se usan para la producción *in vitro* de células endodérmicas diana y tejido endodérmico diana (por ejemplo, páncreas, hígado, conducto de bilis). Por consiguiente, se describen los métodos para producir las células "diana" y los tejidos de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar, métodos que comprenden el aislamiento de células madre del árbol biliar, su incubación bajo condiciones que conducen su diferenciación al tejido diana o las células de ese tejido y la introducción de las células en un paciente que las necesita.

[0048] Como se ha indicado anteriormente y se ha demostrado en las **figuras 14-16**, para la diferenciación parcial de las células madre del árbol biliar hacia un destino adulto específico, según la invención, se puede usar un medio definido (llamado también un medio hormonalmente definido o HDM) con una mezcla específica de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento, idealmente sin suero, y adaptado para conducir las células al destino adulto de interés. Los HDM representativos para hepatocitos, colangiocitos frente a islotes pancreáticos se dan a continuación. El HDM solo provoca alguna restricción de linaje hacia el destino adulto deseado, pero no provoca la diferenciación completa. La diferenciación completa ocurre después del trasplante *in vivo* o, si las células son *ex vivo*, requiere además el uso de un HDM específico en combinación con una mezcla de componentes de la matriz extracelular, donde la composición exacta de la mezcla es única para el tipo de célula adulta deseado, y las células deben establecerse en un formato tridimensional como se describe en la presente. **Figuras 17-19.**

[0049] Formas particularmente preferibles de aplicación para la diferenciación *in vivo* de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar son la inyección, la infusión o la implantación por un método de injerto de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar en una área del cuerpo, para permitir que las células madre del árbol biliar se diferencien allí, por contacto directo con células del linaje diana o infusión de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar para permitir que las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar alcancen el tejido diana. Para la inyección o la infusión, las células madre del árbol biliar se pueden administrar en un medio con el cual sean compatibles, tal como el medio de Kubota (o un equivalente) o uno de los HDM, o en un injerto o un implante bajo condiciones compuestas por componentes de la matriz con los que son compatibles.

Aplicaciones terapéuticas

[0050] Para el uso terapéutico de las células diana obtenibles de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar, están disponibles una serie de conceptos (véase Science 287: 1442-1446, 2000). Ejemplos de indicaciones relevantes a este respecto son: errores innatos del metabolismo, fallo hepático, cirrosis del hígado, insuficiencia pancreática y diabetes.

[0051] Las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar de la invención se pueden introducir directamente en o sobre el órgano que se va a reconstituir, renovar o reparar. La introducción se puede llevar a cabo como suspensiones celulares, como injertos compuestos de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar incorporadas en una mezcla de componentes de la matriz extracelular junto con el HDM o como otros tipos de andamios (por ejemplo, microsoportes, poliláctidas) o como infusiones. Los andamios son preferiblemente biodegradables, de modo que "desaparecen" del cuerpo, mientras que las células o poblaciones celulares recién introducidas crecen junto con las células existentes. Las células que pueden ser reconstituídas, rescatadas, soportadas, reparadas, sustituidas o introducidas de esta manera, preferiblemente por trasplante autólogo, incluyen células de los islotes u otras células del páncreas, hepatocitos u otras células del hígado y colangiocitos u otras células del árbol biliar. La reconstitución, el rescate, la reparación, el soporte, la sustitución o la introducción puede ser posterior a una resección quirúrgica parcial de un órgano para la reparación posterior a un traumatismo o para un uso de soporte, por ejemplo, en el caso de ausencia o insuficiencia de la función de un órgano.

[0052] Las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar y las células diana obtenidas de ellas pueden además unirse a materiales implantables, para aumentar la biocompatibilidad. Por lo tanto, también se describen materiales implantables, cuando se recubren con las células madre del árbol biliar. Los materiales implantables también pueden ser materiales de soporte o portadores artificiales y/o biológicos, que contienen las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar y/o las células diana derivadas de las mismas. A este respecto, los materiales portadores o materiales de soporte pueden ser microsoportes, soportes, recipientes o cámaras para la inserción o la implantación en el cuerpo humano.

[0053] Por ejemplo, se puede usar un recipiente con células de los islotes derivadas de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar para la producción de una construcción farmacéutica para el uso como una cámara de acceso de células de los islotes artificial para suministrar insulina *in vivo*. Alternativamente, se puede usar una

infusión o injerto de las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar para la reconstitución, el rescate, la reparación, el soporte, la sustitución o la introducción de islotes o células de los islotes *in vivo*. Se pueden realizar construcciones similares con hepatocitos o colangiocitos derivados de las células madre del árbol biliar.

[0054] Las células o poblaciones celulares diana obtenidas de las células madre del árbol biliar pueden además usarse como cultivos celulares en biorreactores (por ejemplo, externos al cuerpo), por ejemplo para llevar a cabo reacciones de desintoxicación o para producir sustancias generadas *in vivo* normalmente por las células o los tejidos diana. Esta forma de uso es particularmente relevante en el caso de las afecciones agudas, por ejemplo, en el caso de un fallo hepático agudo como un hígado bioartificial o para una diabetes grave como un páncreas endocrino bioartificial.

[0055] Finalmente, las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar multipotentes se pueden aplicar en términos generales en la modificación y la terapia transgénicas. Las células madre del árbol biliar, o células o tejido diferenciados a partir de las mismas, se pueden transfectar con uno o más genes. De esta manera, uno o más genes, que se requieren para mantener el metabolismo de ciertos órganos, tales como, por ejemplo, el hígado o el páncreas, son restaurados y/o soportados o reintroducidos. Por ejemplo, se pueden transfectar células madre o hepatocitos con el gen de la FAH (fumarilacetoacetato hidrolasa). En un modelo de ratón deficiente en FAH, la inyección intraesplénica de 1000 hepatocitos de donantes positivos para la FAH es suficiente para reconstituir completamente el hígado y compensar completamente el defecto metabólico que conduce a la cirrosis del hígado. Overturf, K., M. Al-Dhalimy, C.-N. Ou, M. Finegold y M. Grompe. American Journal of Pathology 151: 1273-1280 (1997). Alternativamente, las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar se pueden obtener de un donante dado y administrar a otra persona, lo que constituye una terapia alogénica, para restaurar, soportar o introducir en el receptor uno o más genes requeridos para mantener el metabolismo de determinados órganos, tales como, por ejemplo, el hígado o el páncreas.

[0056] Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la invención, pero la invención no está de ninguna manera limitada a estos ejemplos específicos. No obstante, una persona experta en la materia encontrará en estos ejemplos un medio para implementar la presente invención. Además, aunque los presentes ejemplos han sido presentados en el contexto de no humanos por conveniencia experimental, los métodos y los reactivos descritos en la presente pueden trasladarse fácilmente a una aplicación/aplicaciones en seres humanos por una persona experta en la materia a partir de las instrucciones descritas a continuación.

EJEMPLOS

EJEMPLO I - Preparación celular

[0057] La disociación enzimática se puede realizar en presencia de proteasa(s), tales como colagenasa(s) y/o nucleasa(s), tal como una DNasa. Métodos de disociación enzimática de células de hígado se describen y se ponen en práctica en la técnica. A modo de ejemplo, se han descrito métodos para el aislamiento y la identificación de los progenitores hepáticos en, por ejemplo, la USP n.º 6,069,005 y las solicitudes USP n.ºs 09/487,318; 10/135,700; y 10/387,547. De hecho, existen varios procedimientos para la preparación de suspensiones celulares. Debe entenderse, por lo tanto, que el alcance de la presente invención no es limitarse a un método específico de procurar tejido completo o preparar suspensiones celulares de los mismos.

EJEMPLO II - Condiciones de cultivo 3D

[0058] Los geles tridimensionales (3-D) se pueden formar mezclando los componentes de la matriz, las hormonas, las citocinas, los factores de crecimiento, los nutrientes y el medio basal con hialuronanos que son líquidos cuando no están reticulados y se gelifican cuando se reticulan. Los detalles de la preparación de estos se publican en otra parte, por ejemplo, W. S. Turner, E. Schmelzer, R. McClelland et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater 82B (1), 156 (2006); y W. S. Turner, C. Seagle, J. A. Galanko et al., Stem Cells 26 (6), 1547 (2008). Los cultivos se mantienen típicamente durante 2-4 semanas o más y luego se analizan por histología, ensayos de expresión génica tales como RT-PCR cuantitativa y de punto final, ensayos de inmunofluorescencia y expresión de proteínas, tal como las transferencias Western, y obtención de huellas metabólicas.

[0059] Los componentes principales de los complejos de gel son las formas de hialuronanos modificados químicamente. El Carbylan-S (o CMHA-S) es un derivado de hialuronano carboximetilado que se ha modificado con múltiples tioles para la reticulación. Todos los materiales están comercialmente disponibles de, al menos, Glycosan Biosciences (Salt Lake City, Utah).

[0060] Brevemente, en una forma de realización, las matrices de hialuronano se preparan disolviendo hialuronano como un reactivo seco en medio de Kubota para dar una solución al 2,0% (peso/volumen). Luego puede añadirse

laminina (Sigma, St. Louis, Mo) en una concentración de 1,5 mg/ml y colágeno de tipo IV (Becton Dickenson, Bedford, Ma) en una concentración de 6 mg/ml. La reticulación ocurre en horas a temperatura ambiente y con exposición al oxígeno del aire o en minutos si se expone a un reactivo reticulante, por ejemplo, PEGDA (polietilenglicol diacrilato). Así, la solución debería mantenerse fría a 4 °C y evitar el contacto con el oxígeno y/o con el PEGDA, si no se desea la reticulación.

[0061] Tras la finalización de los experimentos, las células se pueden recuperar digiriendo los hidrogeles primero con una mezcla de hialuronidasa (1 mg/ml), DNasa (0,5 mg/ml) y ditiotritol (40 mg/ml) preparada en medio de Kubota (sin transferrina), seguido de liberasa (0,5 mg/ml) preparada en medio de Kubota sin insulina ni transferrina. Las células que se obtienen de esta manera son adecuadas para la caracterización por citometría de flujo, RT-PCR o inmunohistoquímica.

EJEMPLO III - Evidencia de multipotencia

[0062] Después de 7-30 días o más de cultivo de poblaciones celulares o células madre del árbol biliar bajo condiciones de autorreplicación (medio de Kubota, o un equivalente, en combinación con plástico de cultivo o hialuronanos), se transfieren cultivos en monocapa de las células restantes (es decir, células madre del árbol biliar) a un medio de diferenciación, donde las células madre experimentan cambios de forma rápidos y cambios en la expresión génica en 48 horas. Todos los medios de diferenciación consisten en modificaciones del medio usado para la autorreplicación (por ejemplo, medio de Kubota o un equivalente) de modo que el medio hormonalmente definido contendrá los componentes del medio de autorreplicación más complementación con calcio ($\geq 0,5$ mM), cobre, bFGF; esto se denomina "medio modificado". Para conseguir un tipo de célula adulta específico, se requiere lo siguiente:

[0063] Hígado: se puede conseguir la restricción de linaje a destinos de hígado (por ejemplo, hepatocitos) mediante la inclusión de las células madre del árbol biliar en hidrogeles de hialuronanos en los que se mezcla colágeno de tipo IV y laminina y con el "medio modificado" complementado además con glucagón, galactosa, triyodotiroxina, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). En una forma de realización, las cantidades de ingredientes son las siguientes: MKM complementado con 7 μ g/l de glucagón, 2 g/l de galactosa, 10^{-9} M de triyodotiroxina 3, 10 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de HGF.

[0064] Tejido pancreático: se puede conseguir la restricción de linaje a destinos pancreáticos (por ejemplo, islotes) mediante la inclusión de las células madre del árbol biliar en un hidrogel de hialuronanos que contiene colágeno de tipo IV y laminina y con el "medio modificado" cambiado adicionalmente para eliminar la hidrocortisona y para que contenga B27, ácido ascórbico, ciclopamina, ácido retinoico y exendina 4. En una forma de realización, las cantidades de ingredientes son las siguientes: MKM modificado para eliminar la hidrocortisona y que contenga B27 al 2%, 0,1 mM de ácido ascórbico, 0,25 μ M de ciclopamina, 0,5 μ M de ácido retinoico y 50 ng/ml de exendina 4.

[0065] Árbol biliar/colangiocitos: de forma similar, se puede restringir el linaje de las células madre del árbol biliar a destinos biliares (por ejemplo, colangiocitos) incluyendo las células madre en hialuronanos mezclados con colágeno de tipo I y en el "medio modificado" complementado además con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) 165 y HGF. En una forma de realización, las cantidades de ingredientes son las siguientes: MKM complementado además con 20 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) 165 y 10 ng/ml de HGF.

EJEMPLO IV - Trasplante

[0066] El trasplante de células de órganos sólidos mediante protocolos de injerto es preferible a la inyección o la infusión para muchas aplicaciones, aunque cualquier modo de administración es factible. Se ha descubierto que los cultivos de hidrogel descritos anteriormente proporcionan buenas condiciones para el injerto. Las células se pueden suspender en los hialuronanos no reticulados, mezclados con otros componentes de la matriz en un medio que comprende medio basal más hormonas, factores de crecimiento y otras señales solubles adaptadas para la expansión y/o la diferenciación.

[0067] Las poblaciones celulares usadas para el trasplante comprenden preferiblemente poblaciones celulares o células madre del árbol biliar que se trasplantan junto con (o sin) sus socios mesenquimales nativos (por ejemplo, angioblastos, células estrelladas), derivados del tejido diana (u otra fuente) para el trasplante, y en proporciones que son comparables a las encontradas *in vivo*. Sin estar sujetos o limitados por la teoría, se cree que esta combinación de las células madre y las células mesenquimales asociadas proporciona el microambiente apropiado para la maduración completa de los tejidos que son vascularizados y capaces de funcionar fisiológicamente.

[0068] En una forma de realización, para injertos, implantes o inyecciones pancreáticos, los componentes celulares del injerto pueden consistir en las poblaciones celulares o células madre del árbol biliar sembradas conjuntamente

en el injerto con angioblastos derivados de tejido fetal o neonatal humano (células VEGFR⁺, CD117⁺) y células estrelladas (células CD146⁺) en una proporción estimada de las poblaciones celulares encontradas *in vivo* en el tejido. Las poblaciones de células madre se pueden obtener a partir de la expansión de células en cultivo como se describe en la presente. Los angioblastos y las células estrelladas se pueden inmunoseleccionar con un sistema de selección celular magnéticamente activada (MACS) o selecciones por citometría de flujo de suspensiones celulares recién preparadas de tejido de páncreas fetal o neonatal humano.

[0069] Todas las poblaciones de células madre del árbol biliar se pueden inmunoseleccionar para células positivas para un marcador de superficie celular común de células madre/progenitores (por ejemplo, CD133, CD44H, EpCAM, NCAM). En una forma de realización, las células se incuban a 4 °C durante 20 minutos con una concentración de 50 µl para 50 x 10⁶ células totales en 500 µl de suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contiene albúmina de suero bovino al 0,5% y 2 mM de EDTA con anticuerpos primarios conjugados con FITC. Las células así marcadas se hacen reaccionar con esferas magnéticas usando anticuerpos anti-FITC y luego se seleccionan mediante columnas Midi- o MiniMACS y unidades de separación. Todos los pasos de incubación y selección deben realizarse en hielo con adición de ACCUTASE al 10% (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) para evitar la agregación de las células. Alternativamente, las células pueden marcarse con un anticuerpo marcado con una sonda fluorescente y las células inmunoseleccionarse usando un citómetro de flujo.

EJEMPLO V - Medios

[0070] Todos los medios se esterilizaron por filtración (filtro de 0,22 µm) y se mantuvieron a oscuras a 4°C antes de usar. El medio de Kubota (KM) consiste en cualquier medio basal (por ejemplo, RPMI 1640) sin cobre, bajo en calcio (<0,5 mM), 10⁻⁹ M de selenio, 4,5 mM de nicotinamida, 0,1 nM de sulfato de zinc, 10⁻⁸ M de hidrocortisona, 5 µg/ml de transferrina/Fe, 5 µg/ml de insulina, una mezcla de ácidos grasos libres que se añaden unidos a albúmina sérica (0,1%) y, opcionalmente, 10 µg/ml de lipoproteína de alta densidad.

EJEMPLO VI - Condiciones de diferenciación

[0071] Se establecieron cultivos tridimensionales con hidrogeles que contenían hialuronanos, otras moléculas de la matriz, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, todo preparado en un medio. Todos los hidrogeles se prepararon usando medio de Kubota (o un equivalente) modificado que se complementó con calcio para conseguir una concentración de 0,6 mM, 10⁻¹² M de cobre y 10 µm de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (denominado KM modificado o MKM):

[0072] Células de hígado: MKM-L con 7 µg/l de glucagón, 2 g/l de galactosa, 10⁻⁹ M de triyodotiroxina 3, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 20 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Los andamios de matriz consistían en colágeno de tipo IV y laminina al 60% y hialuronanos al 40%.

[0073] Árbol biliar/colangiocitos: MKM-C complementado con 20 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) 165 y 10 ng/ml de HGF. Los andamios de matriz consistían en colágeno de tipo I al 60% y hialuronanos al 40%.

[0074] Páncreas, islotes: MKM-P (sin hidrocortisona) complementado además con B27 al 2%, 0,1 mM de ácido ascórbico, 0,25 µM de ciclopamina, 0,5 µM de RA y 50 ng/ml de exendina-4. Los andamios de matriz consistían en colágeno de tipo IV y laminina al 60% y hialuronanos al 40%.

EJEMPLO VII - Aislamiento celular y fenotipado

[0075] Se obtuvieron tejidos biliares humanos de hígados y páncreas obtenidos y luego rechazados para el trasplante en un paciente. Se procesaron suspensiones celulares de tejidos biliares humanos usando RPMI 1640 complementado con albúmina de suero bovino al 0,1%, 1 nM de selenio y antibióticos. El tampón de procesamiento enzimático contenía 300U/ml de colagenasa de tipo IV y 0,3 mg/ml de desoxirribonucleasa a 32 °C con agitación frecuente durante 15-20 min. Las suspensiones enriquecidas se prensaron a través de una malla de calibre 75 y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min antes de la resuspensión. La viabilidad celular estimada por exclusión del azul de tripano fue rutinariamente mayor al 95%.

[0076] Aproximadamente 3x10⁵ células se sembraron sobre una placa de cultivo tisular de 10 cm y en medio de Kubota sin suero, que se sustituyó cada 3 días. Las colonias se formaron dentro de 5-7 días y se observaron durante hasta 3 meses. Las colonias se escogieron a mano en tiempos variables usando un microscopio invertido.

[0077] Las células madre del árbol biliar multipotentes fueron aisladas también por inmunoselección de suspensiones celulares recién preparadas en función de la expresión positiva de uno o más marcadores de

- superficie celular comunes a células madre/progenitores (CD133, CD44H, NCAM, EpCAM-- CD326) usando tecnologías de inmunoselección de esferas magnéticas con el sistema Miltenyi Biotech MACS (Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células disociadas se incubaron con un anticuerpo EpCAM unido a microesferas magnéticas durante 30 min a 4 °C y se separaron usando el sistema de separación de columna magnética de Miltenyi siguiendo los procedimientos recomendados del fabricante. El medio se sustituyó a diario y el medio recogido se almacenó a -20 °C para análisis posteriores.
- [0078] Para la tinción fluorescente, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min a temperatura ambiente, se enjuagaron con HBSS, se bloquearon con suero de cabra al 10% en HBSS durante 2 h y se enjuagaron. Las células fijadas se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante toda la noche, se lavaron, se incubaron durante 1h con anticuerpos secundarios específicos de isotipo marcados, se lavaron, se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la visualización de los núcleos celulares.
- [0079] Para la inmunohistoquímica, los tejidos se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante toda la noche, se almacenaron en etanol al 70% y se incluyeron posteriormente en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y los antígenos se recuperaron. Las peroxidasas endógenas se bloquearon por incubación durante 30 min en solución de H₂O₂ al 0,3%. Después de bloquear con suero de caballo al 10%, se aplicó el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche; se realizaron tinciones con el anticuerpo secundario y ABC usando el kit RTU Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se usó el Vector Nova RED como sustrato. Las secciones se deshidrataron, se fijaron y se incluyeron en Eukitt Mounting Media (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), y se analizaron usando un microscopio invertido.
- [0080] Para el análisis de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) cuantitativa, se lisaron tejido o células del árbol biliar de cultivo y se extrajo el ARN total usando el RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Valencia CA) según las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se llevó a cabo con el sistema SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usó el HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) para la PCR.
- [0081] Las células se analizaron y se clasificaron por un clasificador celular FACStar Plus (BD Biosciences) equipado con láseres duales Coherent 1-90. Los anticuerpos conjugados con fluorescencia se excitaron a 488 nm y se detectó su emisión de fluorescencia mediante filtros estándar.
- [0082] **Abreviaturas:** **AE2**, intercambiador aniónico 2; **AFP**, fetoproteína α; **ALB**, albúmina; **ASMA**, actina alfa de músculo liso; **ASBT**, transportador apical de ácido biliar dependiente del sodio; **bFGF**, factor de crecimiento de fibroblastos básico; **CD**, determinante común; **CD133**, prominina; **CD146**, Mel-CAM; **CD31**, PECAM; **CD44H**, receptor de hialuronano; **CD45**, antígeno leucocitario común; **CFTR**, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística; **CK**, citoqueratina; **CXCR4**, receptor de quimiocinas CXC 4; **CYP450**, citocromo P450; **EGF**, factor de crecimiento epidérmico; **EpCAM**, molécula de adhesión celular epitelial; **FOXA2**, caja forkhead a2; **GGT**, gamma glutamil transpeptidasa; **HDM**, medio hormonalmente definido, uno adaptado para un tipo celular específico; **HDM-L**, medio hormonalmente definido para hígado; **HDM-C**, medio hormonalmente definido para colangiocitos (árbol biliar); **HDM-P**, medio hormonalmente definido para páncreas; **HGF**, factor de crecimiento de hepatocitos; **HNF**, factor nuclear de hepatocitos; **KM**, medio de Kubota, un medio sin suero diseñado para células madre/progenitores; **NCAM**, molécula de adhesión celular neural; **NGN3**, neurogenina 3; **PDX1**, caja homeótica pancreática y duodenal 1; **PROX1**, proteína de caja homeótica Prospero 1; **SALL4**, proteína similar a Sal 4; **SOX**, caja HMG relacionada con Sry; **SR**, receptor de secretina; **VEGF**, factor de crecimiento endotelial vascular.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de células madre/progenitoras multipotentes de mamífero capaces de diferenciarse en linajes endodérmicos múltiples, donde las células se obtienen de tejido del árbol biliar de un mamífero, donde el método comprende obtener tejido del árbol biliar y obtener secuencialmente, y en cualquier orden, o
5 sustancialmente de manera simultánea células que son positivas para:
 - (i) al menos un marcador de superficie de células madre seleccionado de EpCAM, N-CAM, CXCR4, CD44H o CD133;
 - (ii) al menos un marcador indicativo de fases de linaje de células de hígado seleccionado de HNF6, HES1, CK19, albúmina o AFP; y
 - (iii) al menos un marcador indicativo de fases de linaje de células pancreáticas seleccionado de PDX1, PROX1, NGN3 o insulina.
2. Método según la reivindicación 1, donde las células madre/progenitoras multipotentes de mamíferos se obtienen mediante tecnología de inmunoselección y/o condiciones de cultivo selectivas, preferiblemente mediante tecnología de inmunoselección que comprende *panning*, selección mediante esferas magnéticas, citometría de flujo o combinaciones de las mismas, más preferiblemente mediante citometría de flujo.
15
3. Método según la reivindicación 2, donde la condición de cultivo selectiva comprende sembrar las células sobre plástico, sobre hialuronanos o sobre plástico recubierto opcionalmente con colágeno IV, colágeno III, laminina, hialuronanos, otros componentes de la matriz de tejidos embrionarios, fetales, neonatales o combinaciones de los mismos.
4. Método según la reivindicación 2, que comprende además incubar las células en medio sin suero que comprende un medio basal bajo en calcio, sin cobre y complementado con insulina, transferrina/Fe, selenio, zinc, ácidos grasos libres unidos a albúmina sérica y, opcionalmente, lipoproteína de alta densidad.
20
5. Método según la reivindicación 4, donde el medio basal comprende RPMI 1640.
6. Método según la reivindicación 4, donde el medio basal comprende menos de 0,5 mM de calcio.
7. Método según la reivindicación 2, donde las células se cultivan durante 7-21 días o más.
25
8. Método según la reivindicación 1, donde el tejido del árbol biliar comprende el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común, el conducto hepatopancreático común y la vesícula biliar, o combinaciones de los mismos.
9. Método según la reivindicación 1, donde el tejido del árbol biliar deriva de sitios en los cuales el árbol biliar se ramifica o contiene altos números de glándulas peribiliares.
30

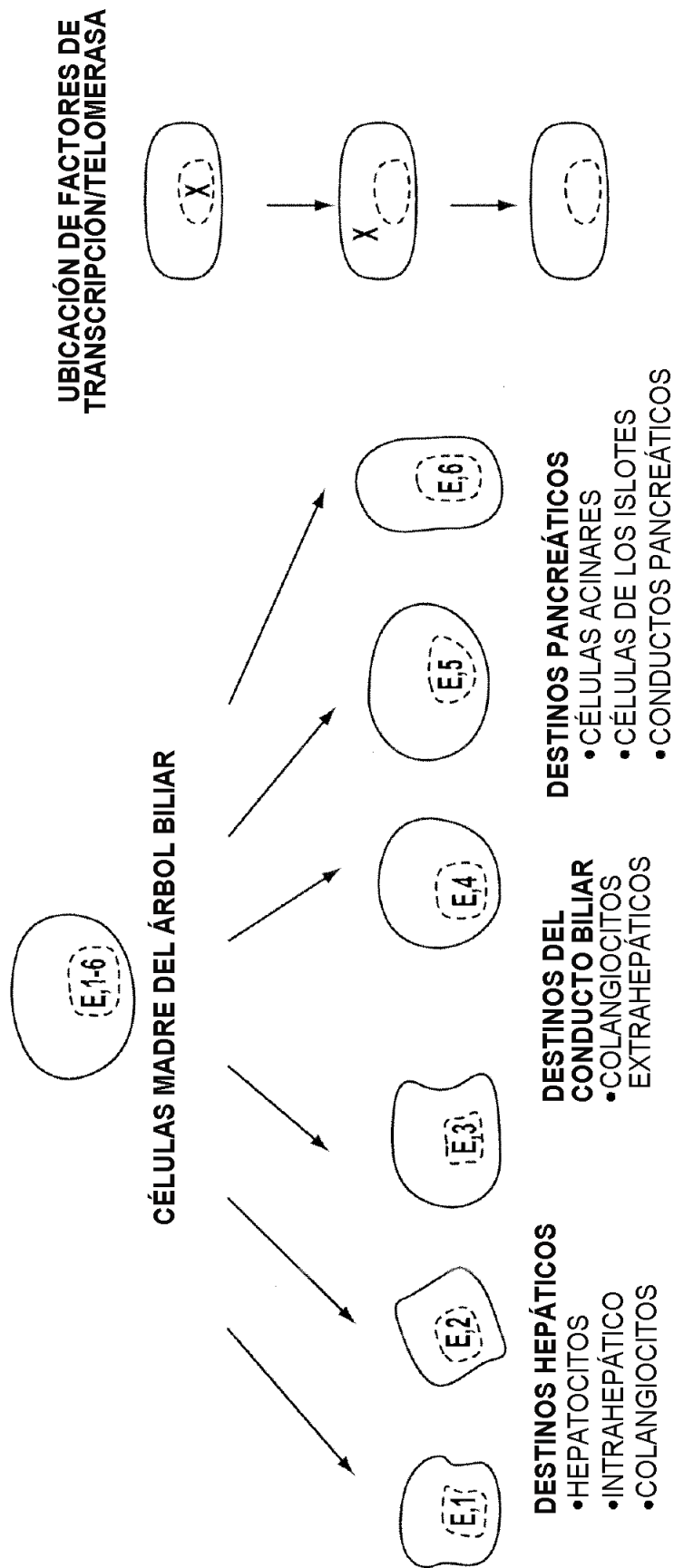


FIG. 1

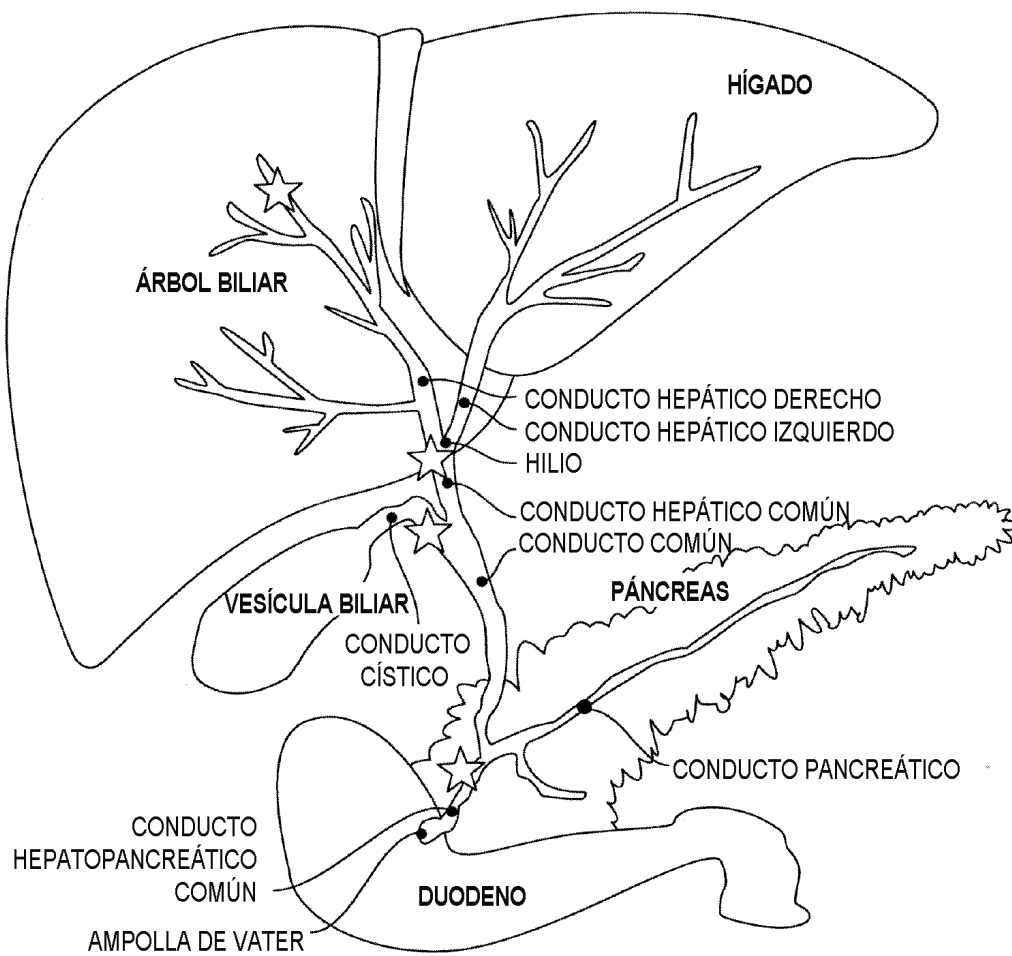


FIG. 2

ÁRBOL BILIAR EXTRAHEPÁTICO (N = 5)	VESÍCULA BILIAR	CONDUCTO CÍSTICO	HILIO HEPÁTICO (CONDUCTO HEPÁTICO COMÚN)	CONDUCTO BILIAR	AMPOLLA HEPATOPANCREÁTICA
SUPERFICIE OCUPADA POR LAS PBC (%)	/	3.22 ± 0.87 (0.39)	3.68 ± 0.79 (0.35)	1.29 ± 0.37 (0.16)*	7.47 ± 2.20 (0.98)*
NÚMERO MEDIO DE PBG/CAMPO (20X)	/	8.15 ± 2.03 (0.91)	10.25 ± 2.27 (1.01)	4.37 ± 1.15 (0.51)*	27.83 ± 3.16 (1.41)*
CIRCUNFERENCIA MEDIA DE LAS PBG (µm)	/	115.07 ± 9.11 (4.07)	106.44 ± 19.79 (8.95)	101.01 ± 10.44 (4.67)	130.95 ± 14.22 (6.36)*

FIG. 3a

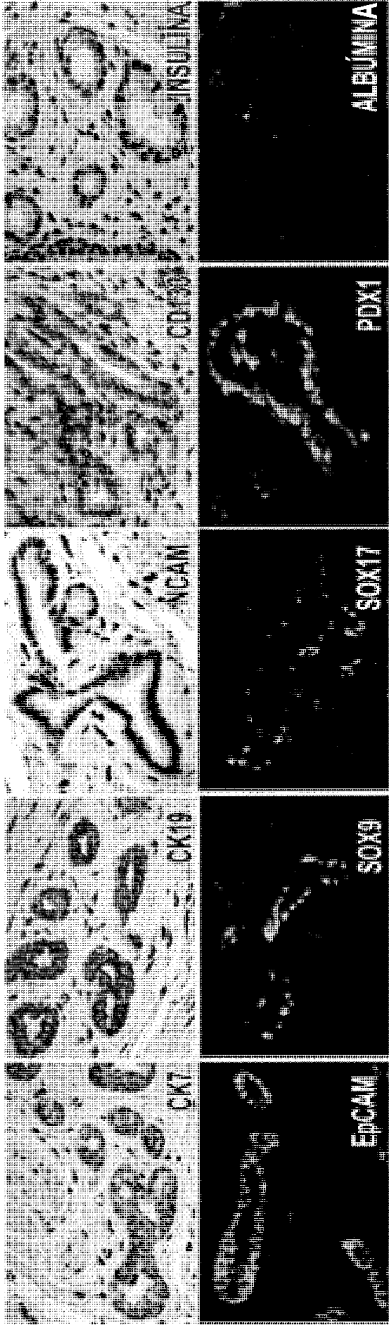


FIG. 3b

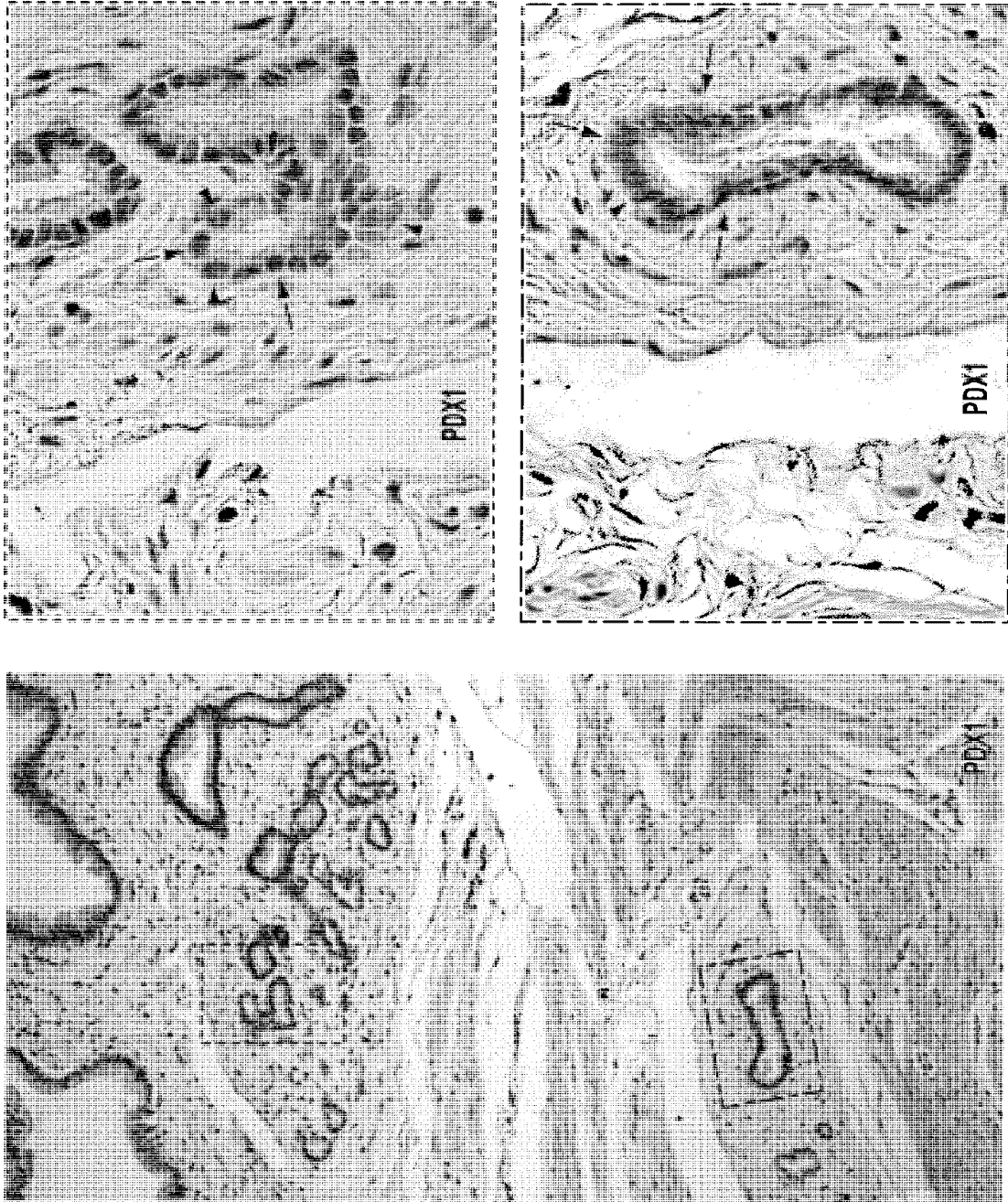


FIG. 4

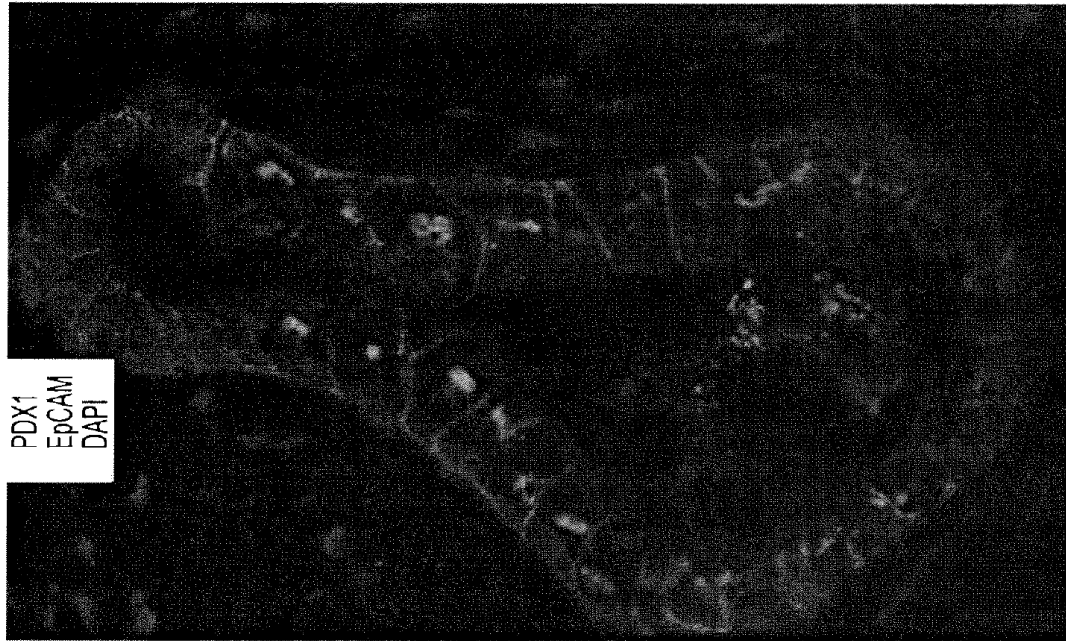


FIG. 5b

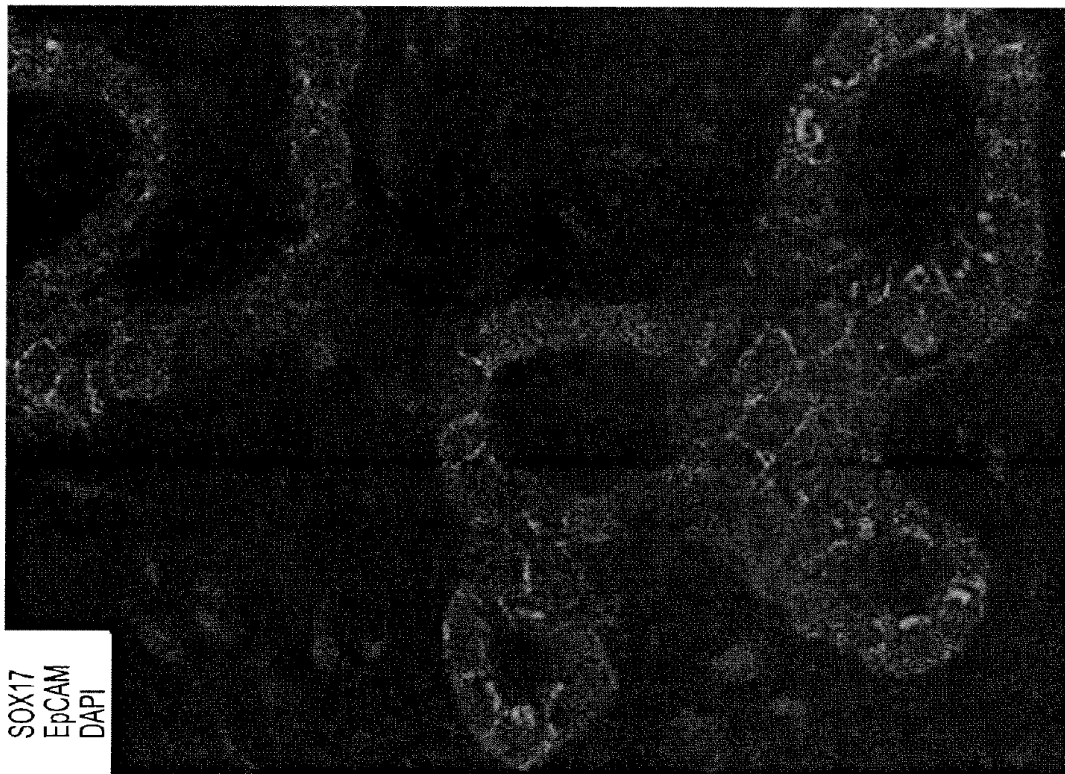


FIG. 5a

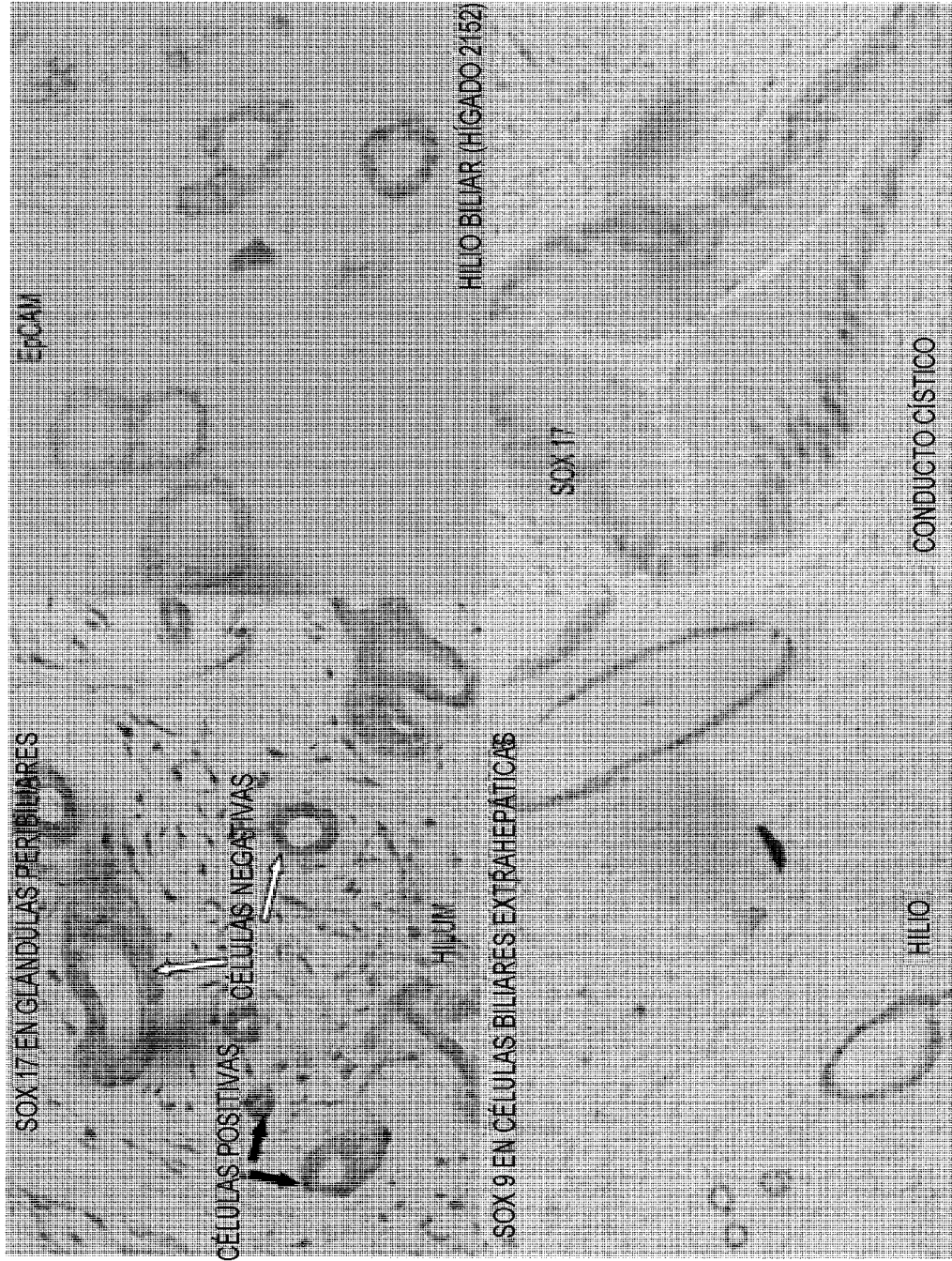
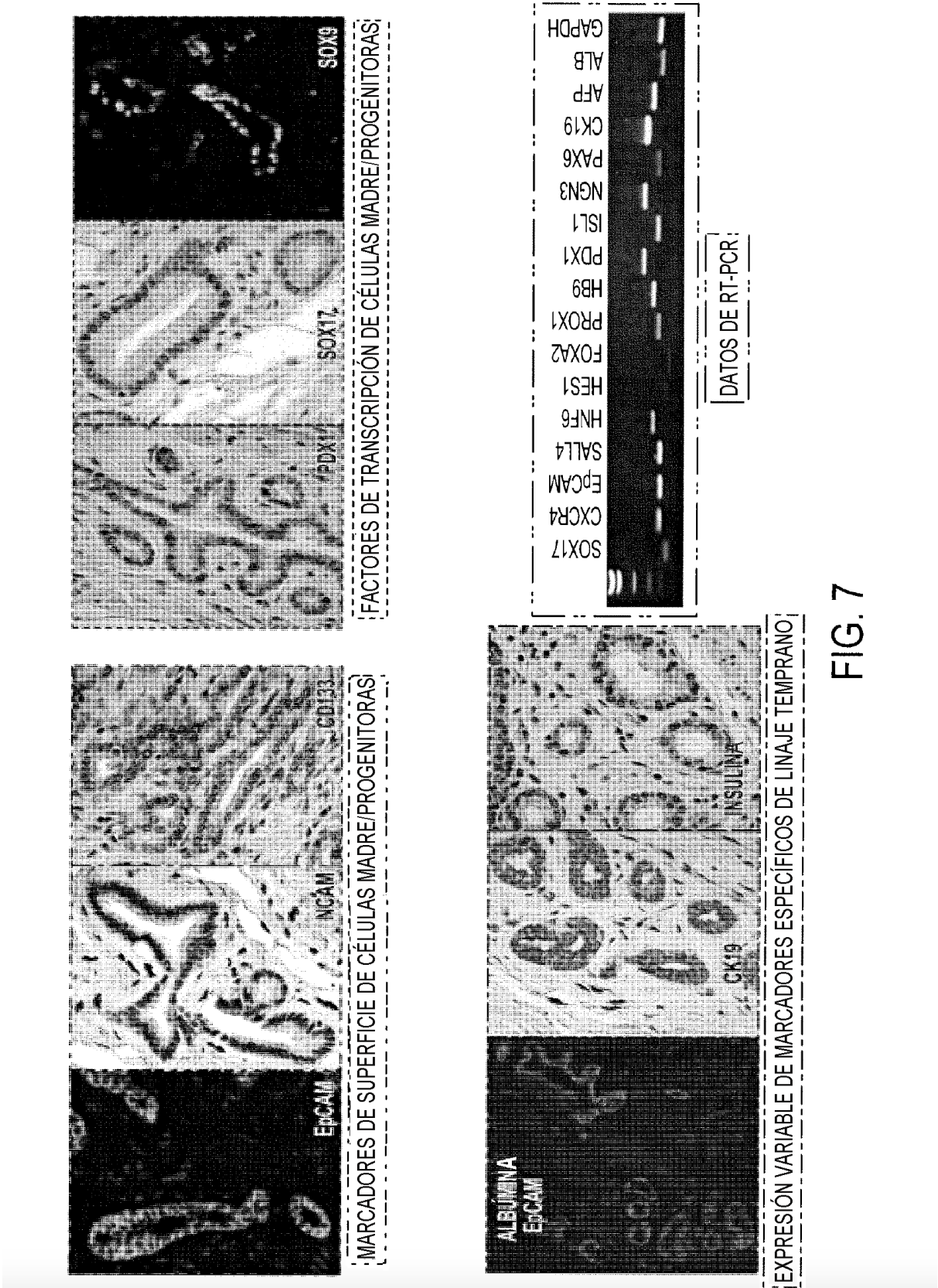


FIG. 6



ALBUMINA
EpCAM

CK19
INSULINA

EXPRESIÓN VARIABLE DE MARCADORES ESPECÍFICOS DE LINAJE TEMPRANO

DATOS DE RT-PCR

Gene	Band
SOX17	+
CXCR4	+
EpCAM	+
SALL4	+
HNF6	+
HES1	+
FOXA2	+
PROX1	+
HB9	+
PDX1	+
ISL1	+
NGN3	+
PAX6	+
CK19	+
AFP	+
ALB	+
GAPDH	+

FIG. 7

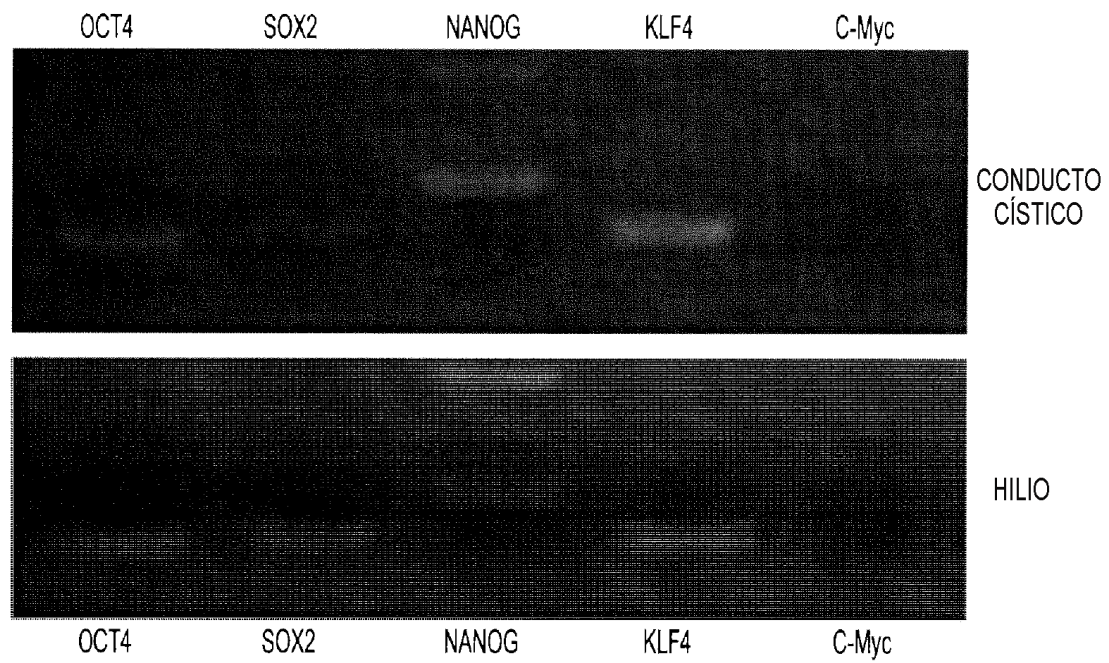


FIG. 8

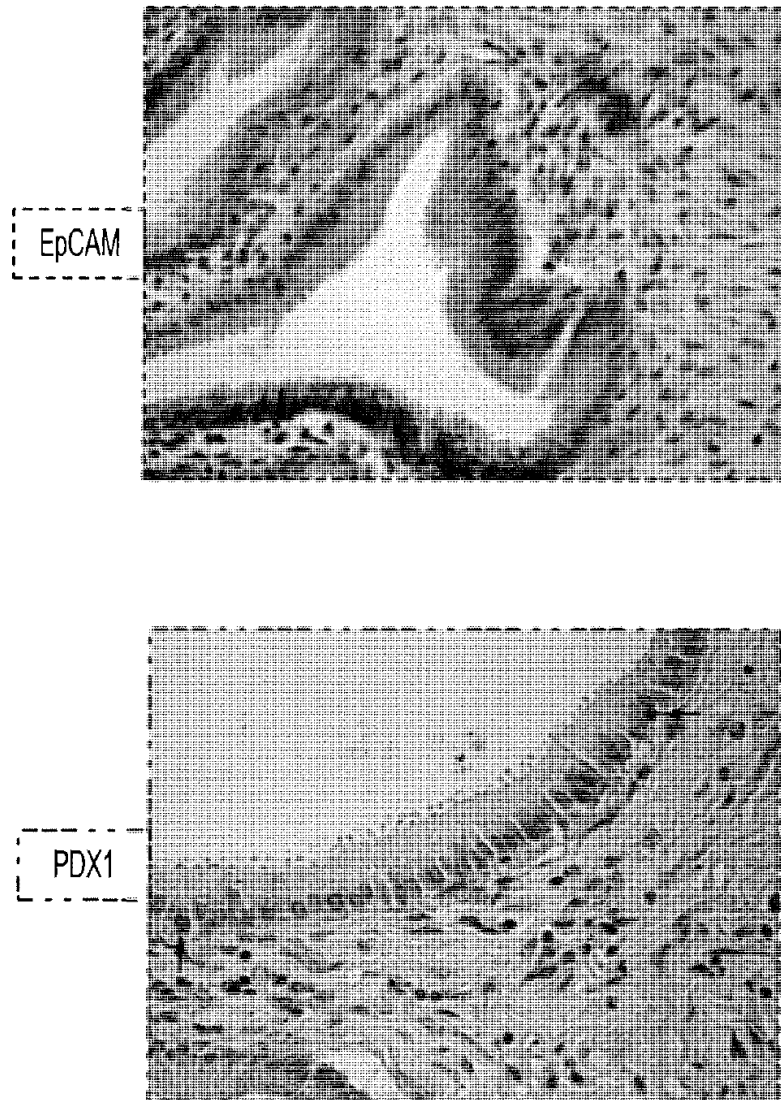


FIG. 9

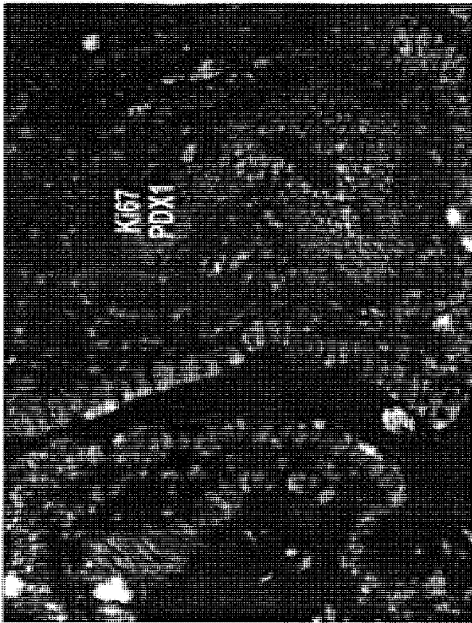


FIG. 10b



FIG. 10d

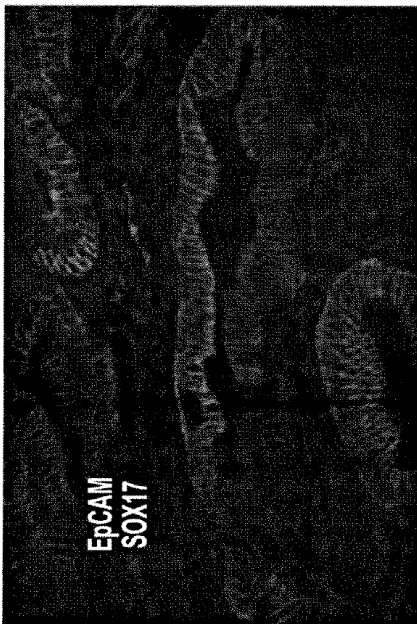


FIG. 10a

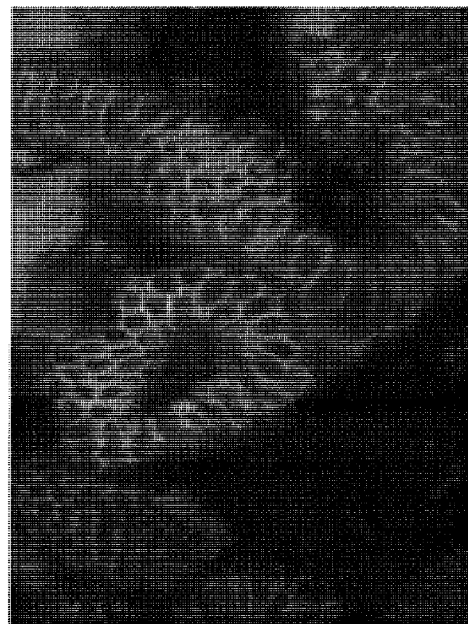
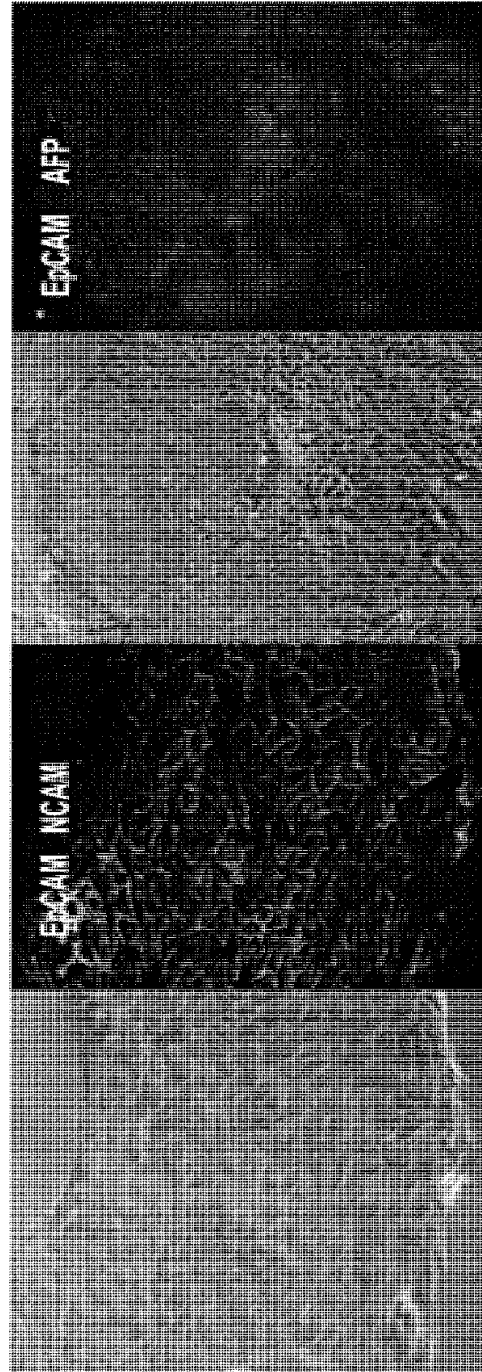
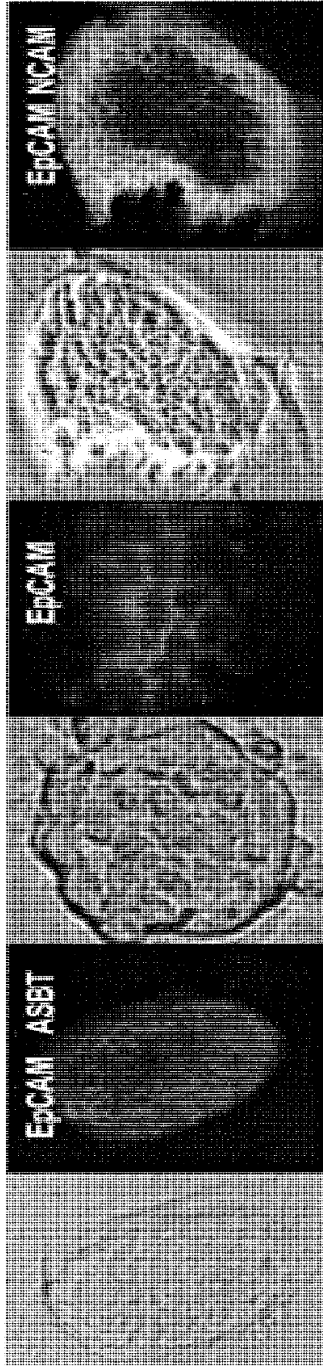


FIG. 10c



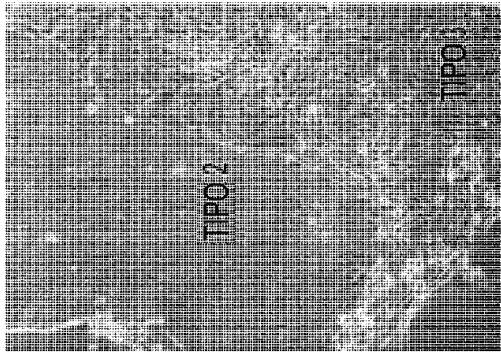


FIG. 11d



FIG. 11c

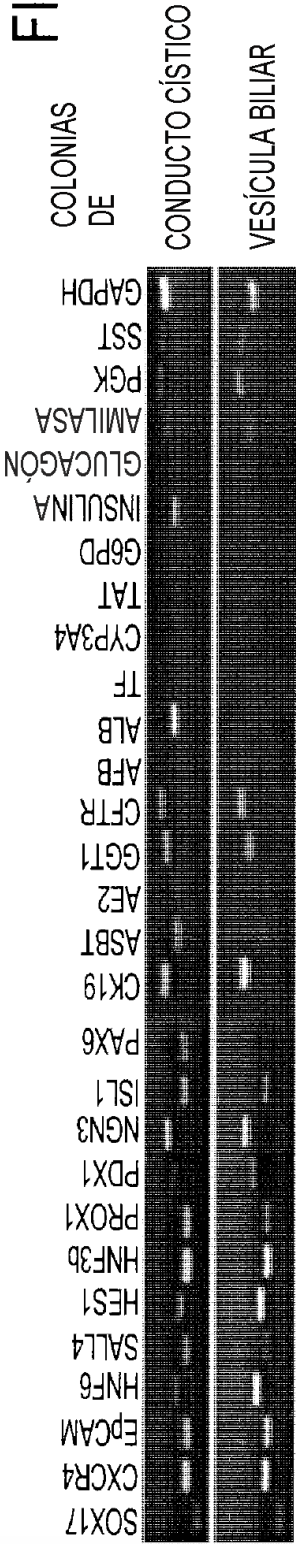


FIG. 11e

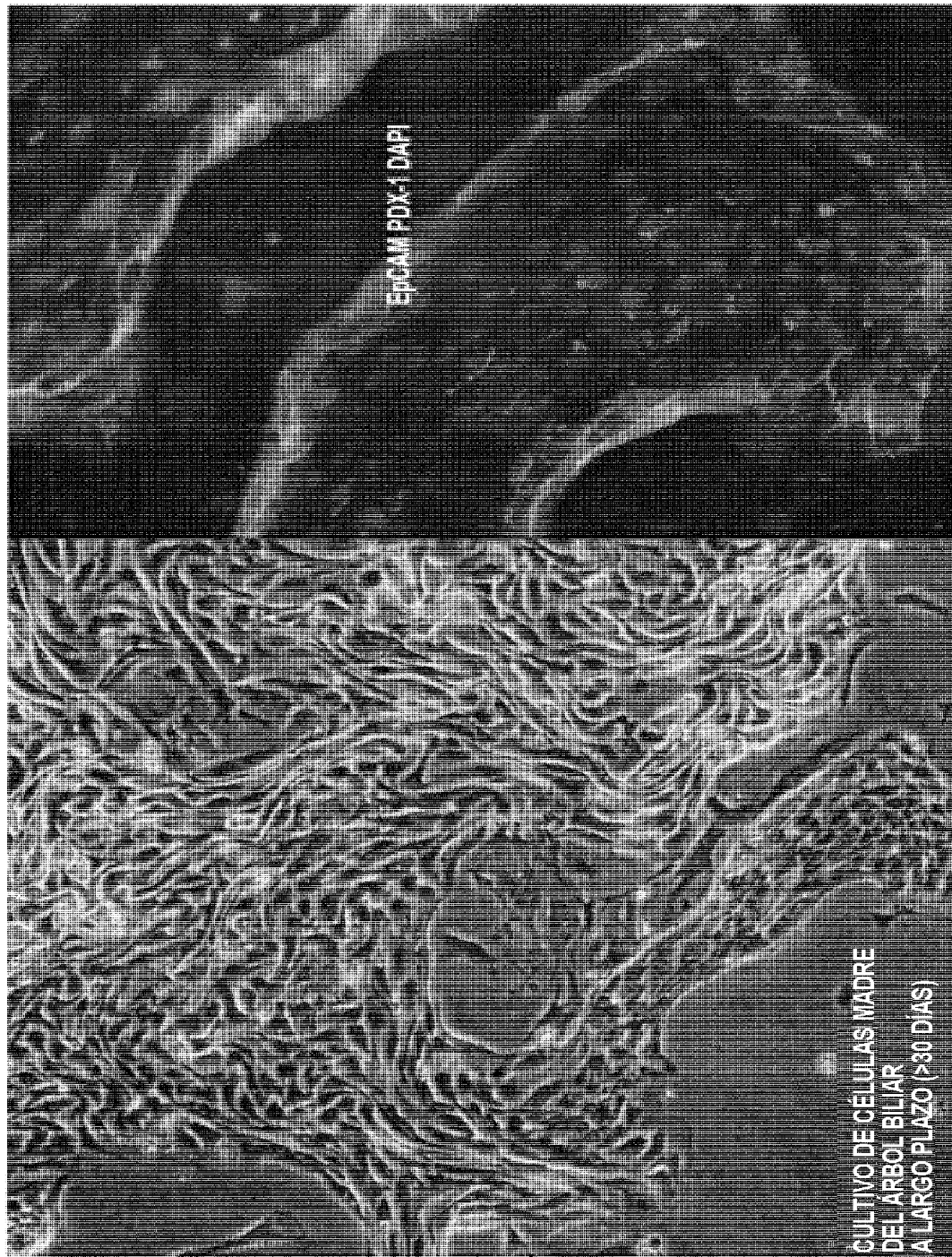


FIG. 12

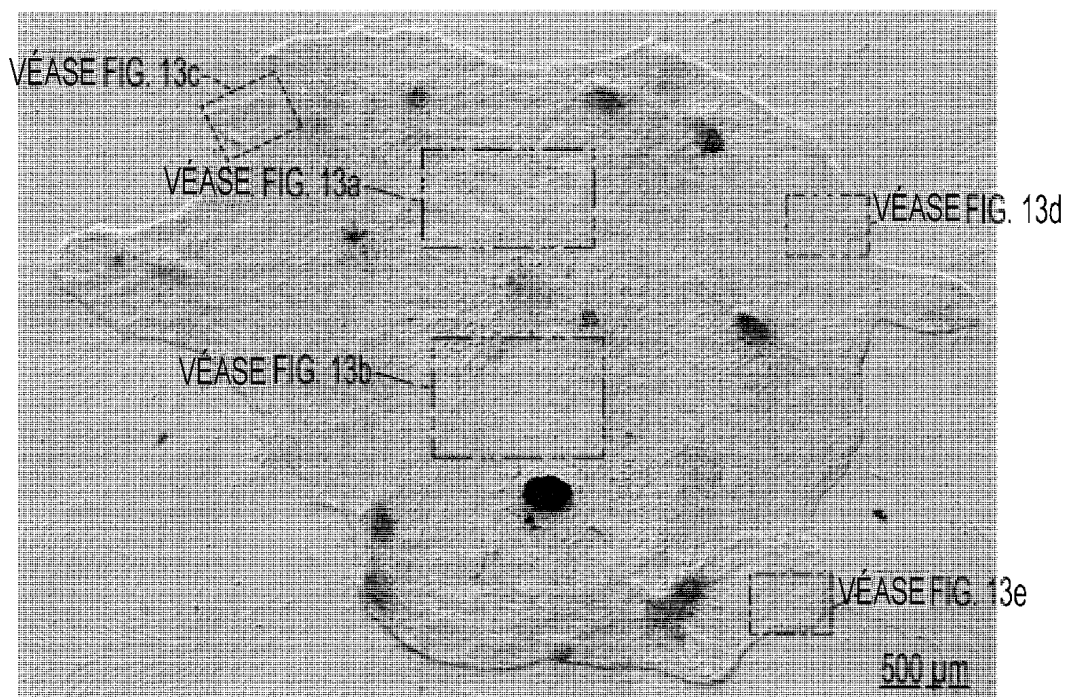


FIG. 13

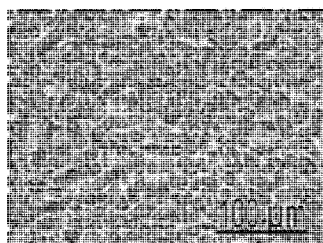


FIG. 13a

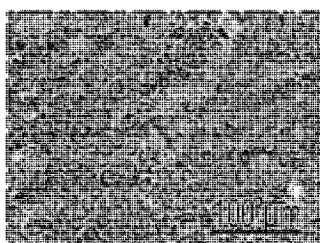


FIG. 13b

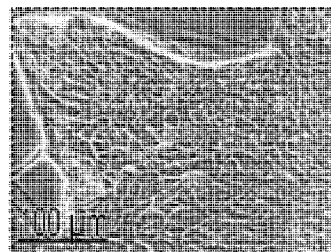


FIG. 13c

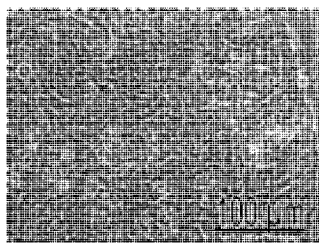


FIG. 13d

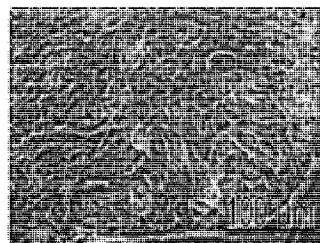
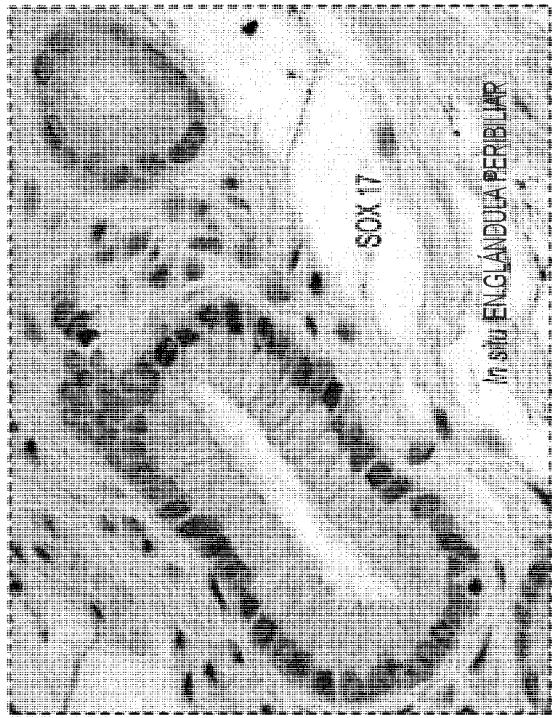


FIG. 13e



CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DEL ÁRBOL BILIAR



FIG. 14

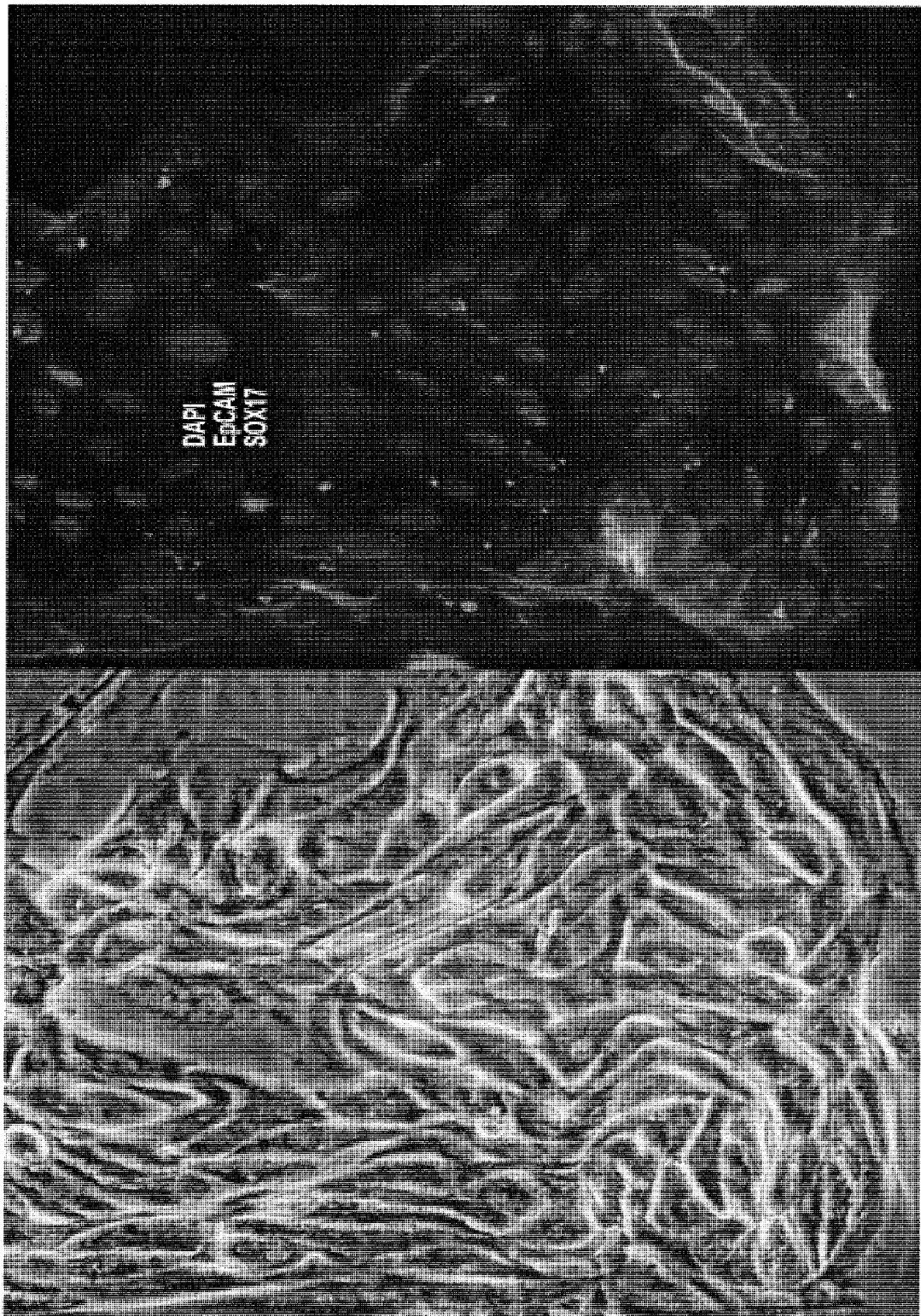


FIG. 15

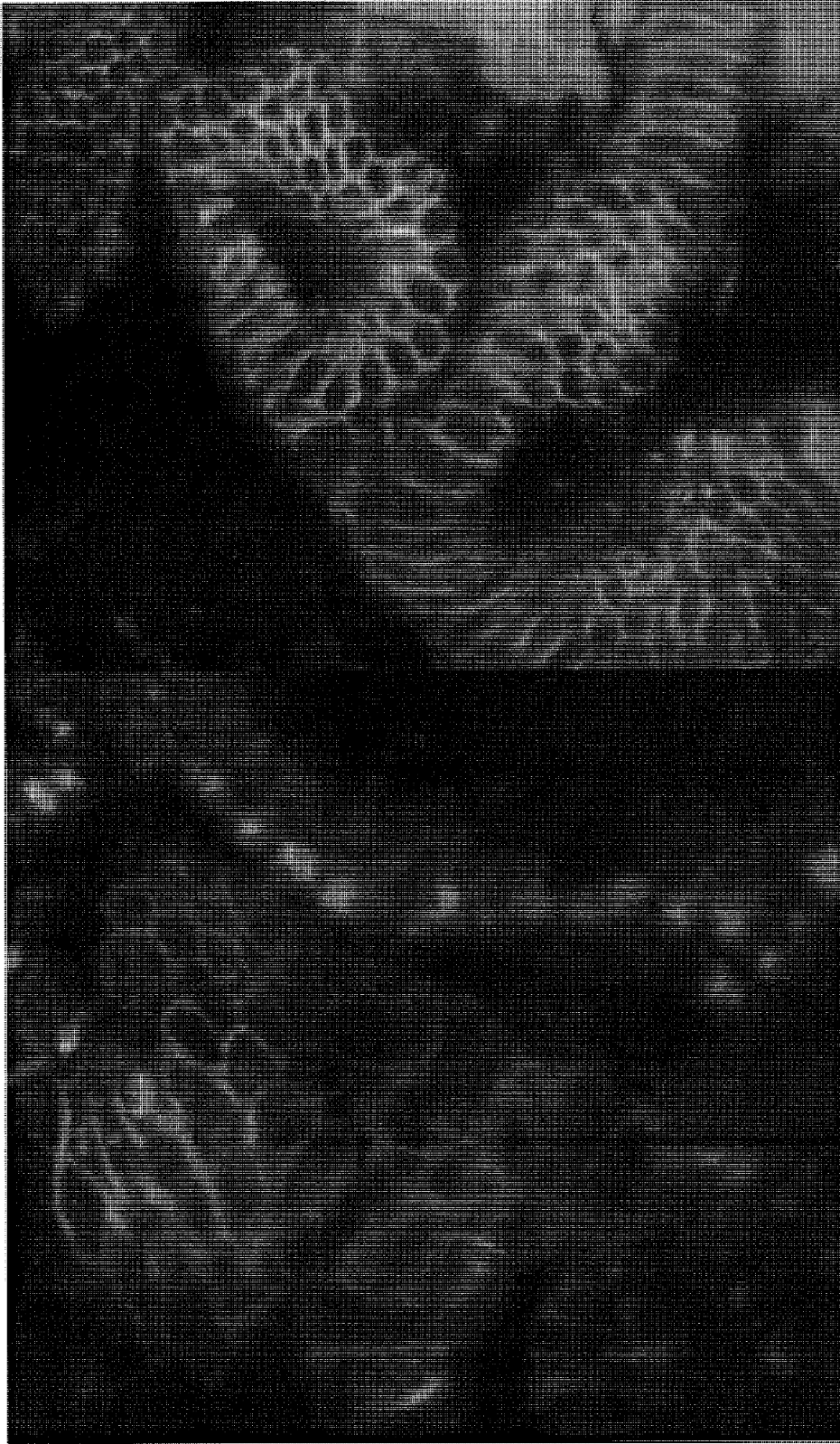


FIG. 16

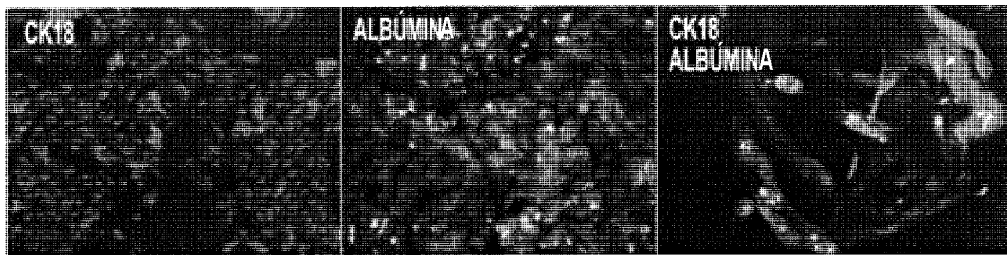


FIG. 17a

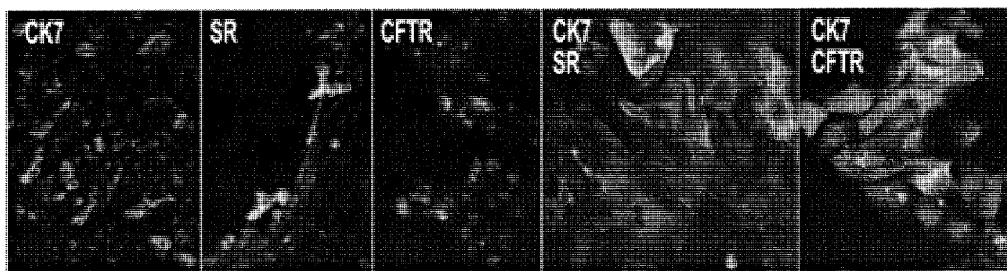


FIG. 17b

CONDICIÓN DE CONTROL	PUNTUACIÓN: ESTIMACIÓN SEMICUANTITATIVA DE COLANGIOCITOS O HEPATOCITOS	
	CÉLULAS SR+/CFTR+	CÉLULAS ALB+/CK18+
CONTROLES DE CÉLULAS MADRE	0.2 ± 0.4	0
CONTROLES DE HDM	3 ± 0.7*	2.2 ± 0.8*

FIG. 17c

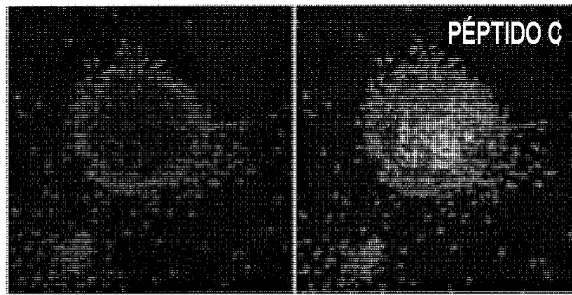


FIG. 18a

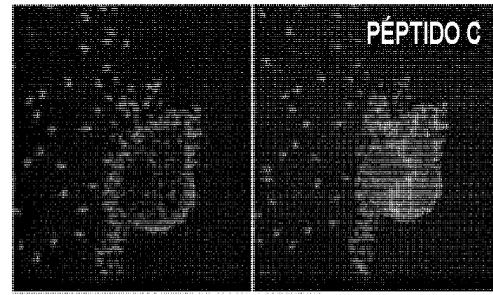


FIG. 18b

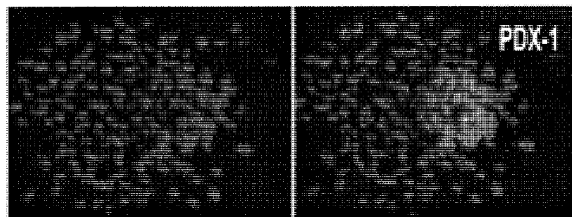


FIG. 18c

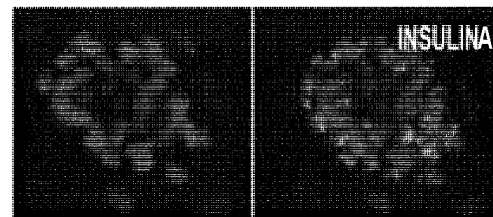


FIG. 18d

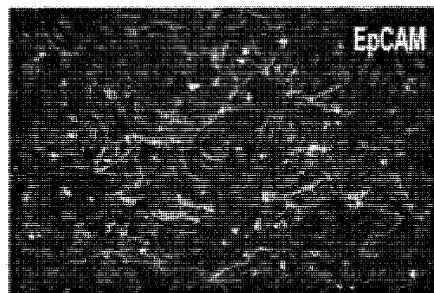


FIG. 18e

ESTRUCTURAS SIMILARES A ISLOTES (pép. c+)	
CONTROLES DE CÉLULAS MADRE	1 ± 0.7
CONTROLES DE HDM-P	$3.8 \pm 1.3^*$

FIG. 18f

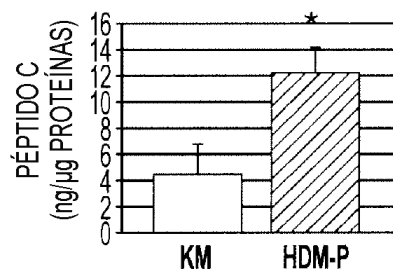


FIG. 18g

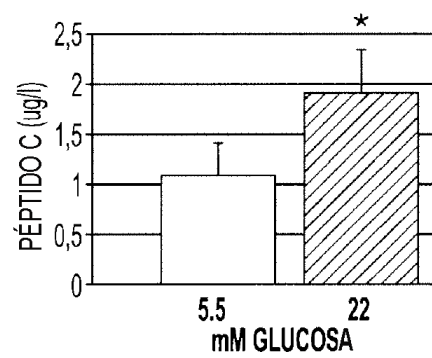


FIG. 18h

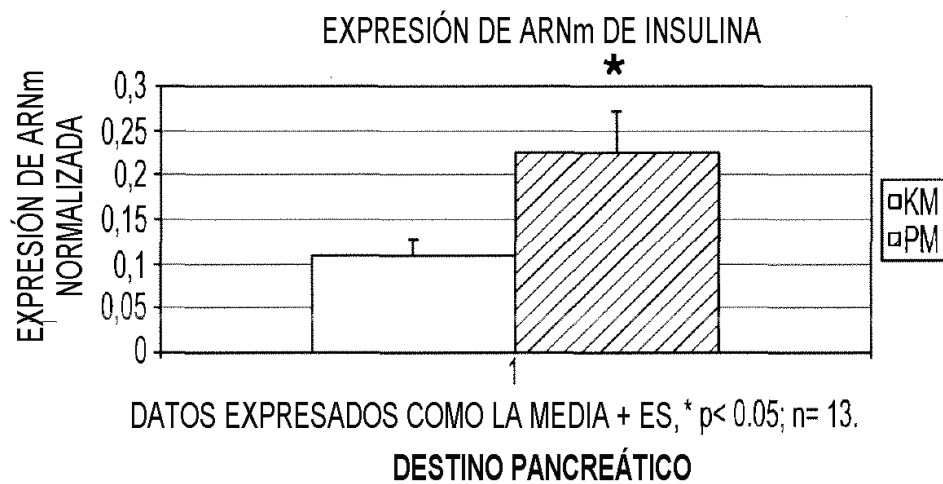
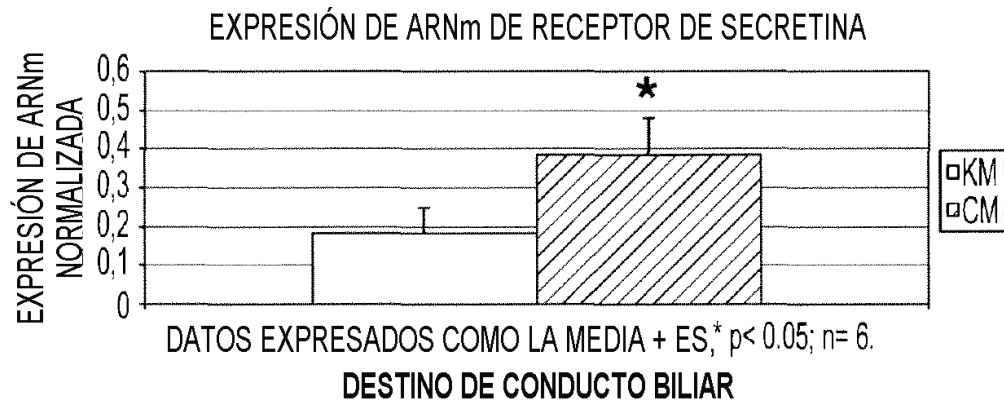
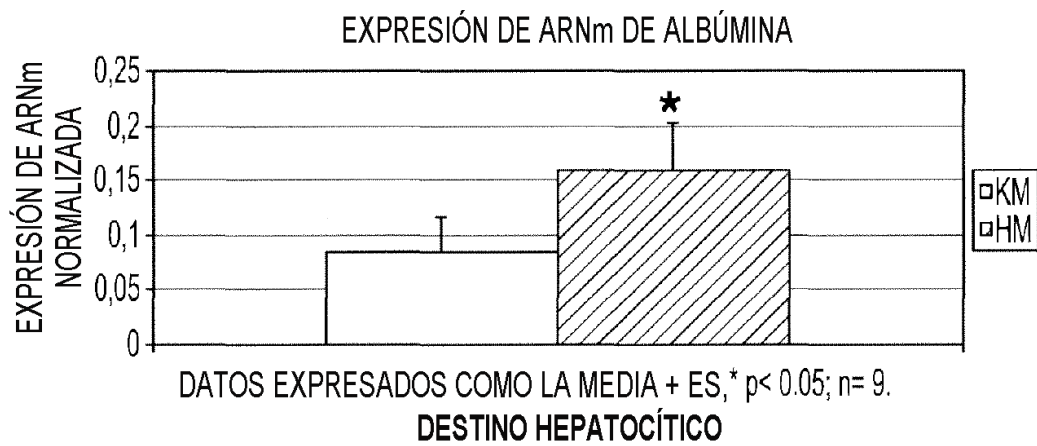


FIG. 19

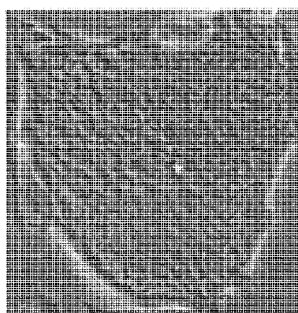


FIG. 20a

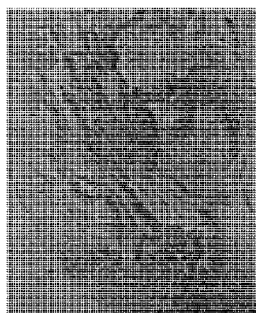


FIG. 20b

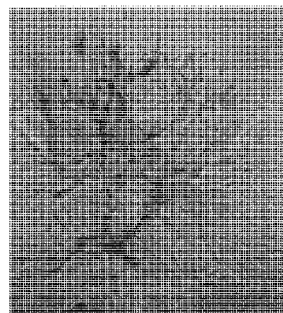


FIG. 20c

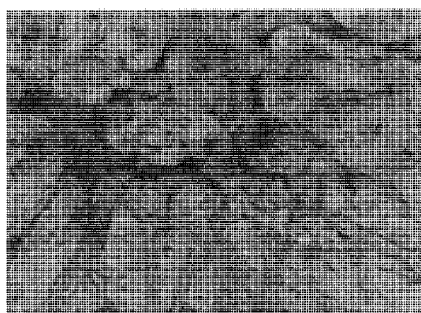


FIG. 20d

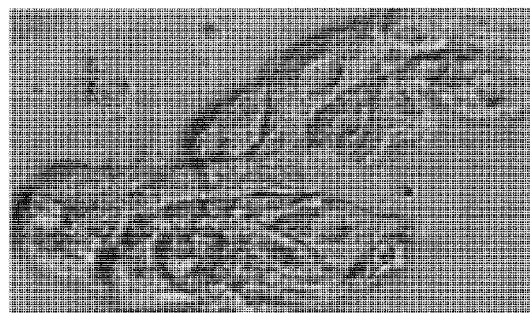


FIG. 20e

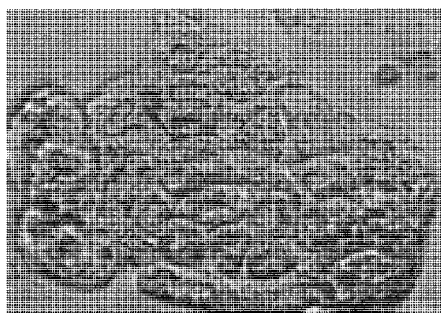


FIG. 20f

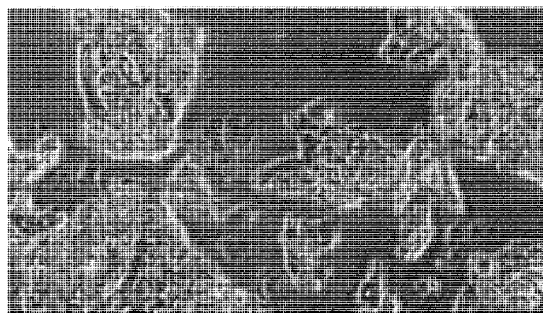


FIG. 20g

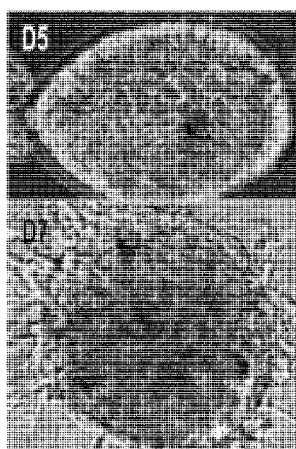


FIG. 20h

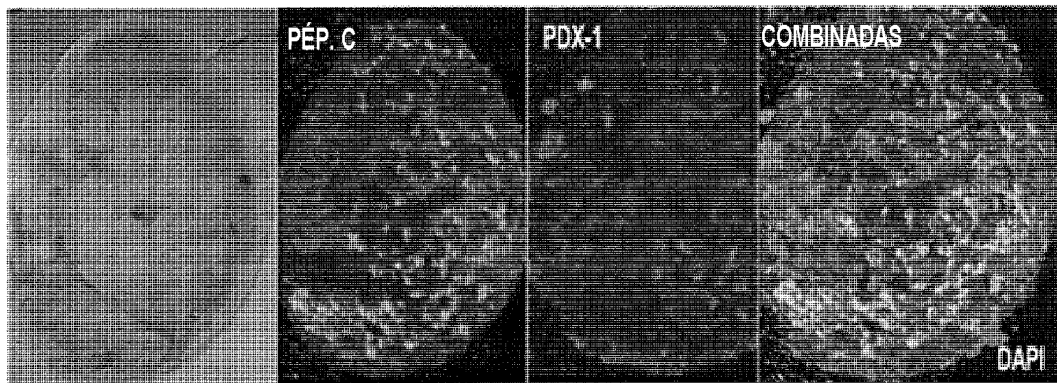


FIG. 20i



FIG. 21b

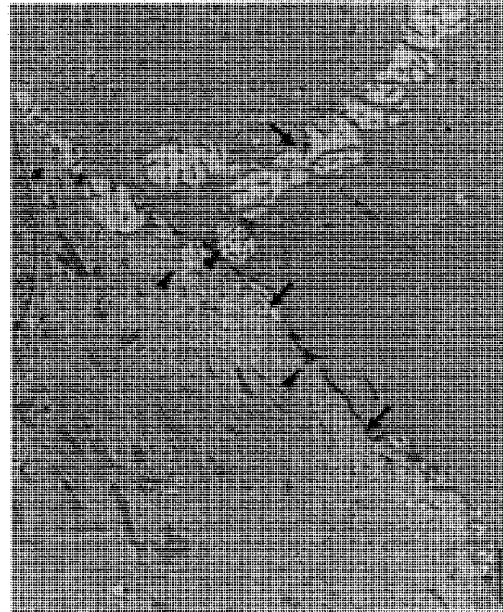


FIG. 21d



FIG. 21a



FIG. 21c

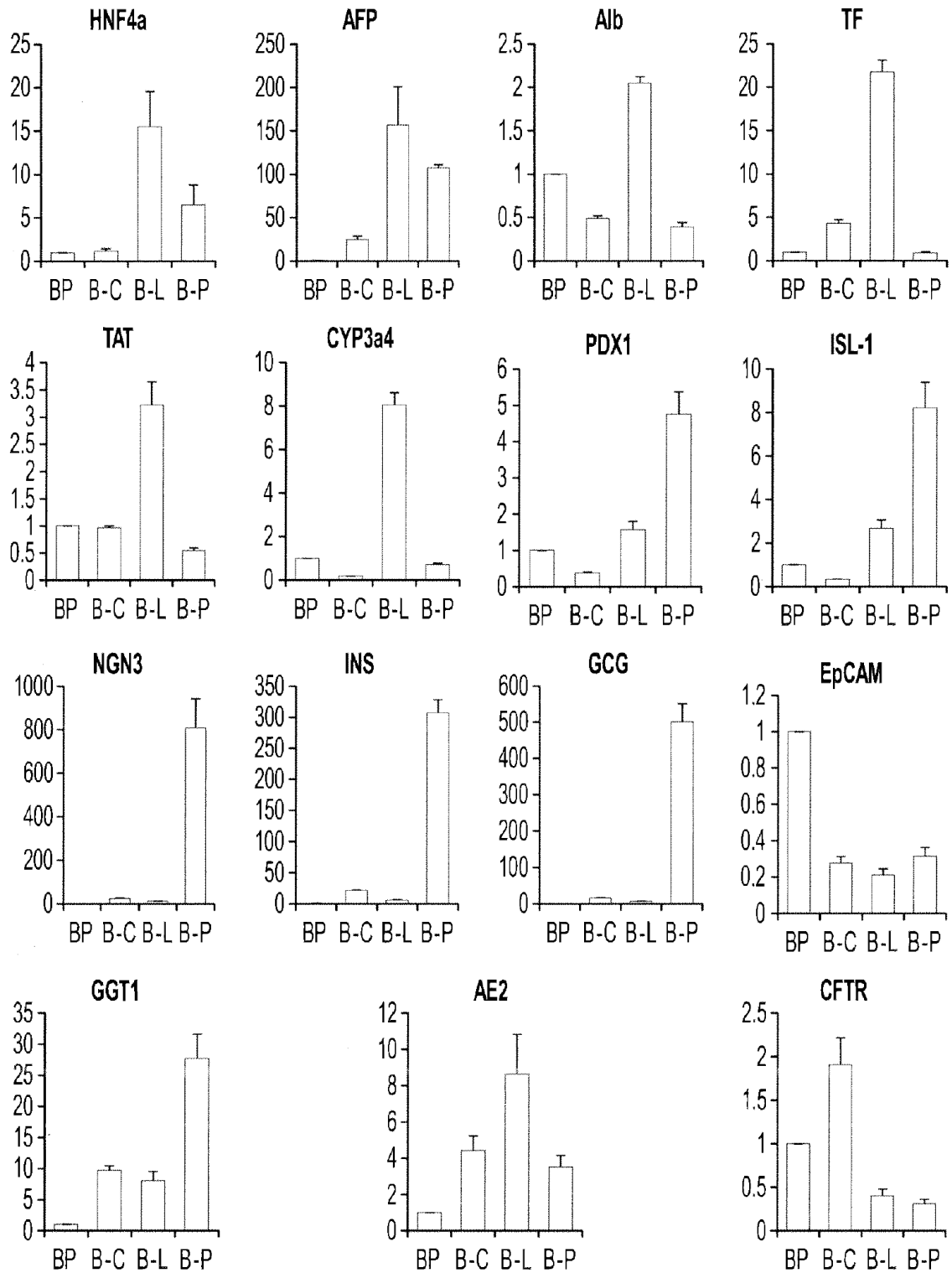


FIG. 22

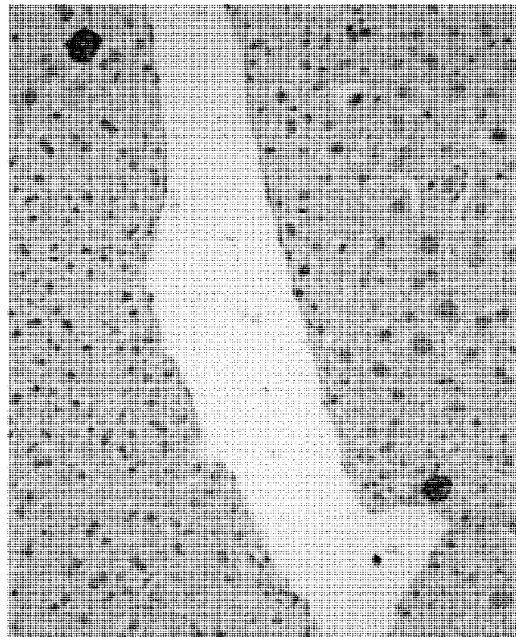
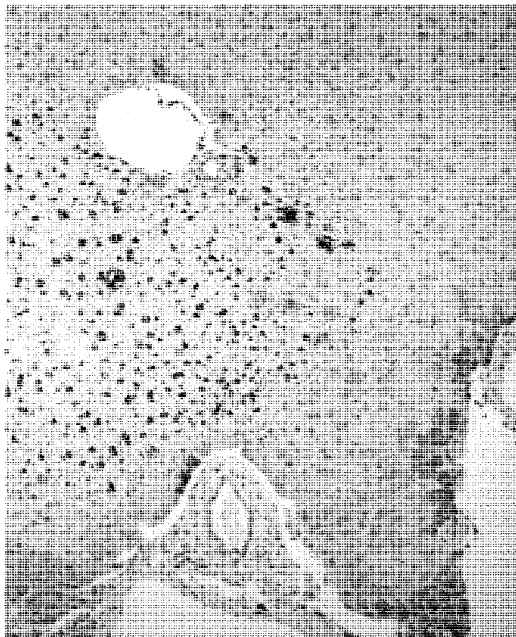


FIG. 23

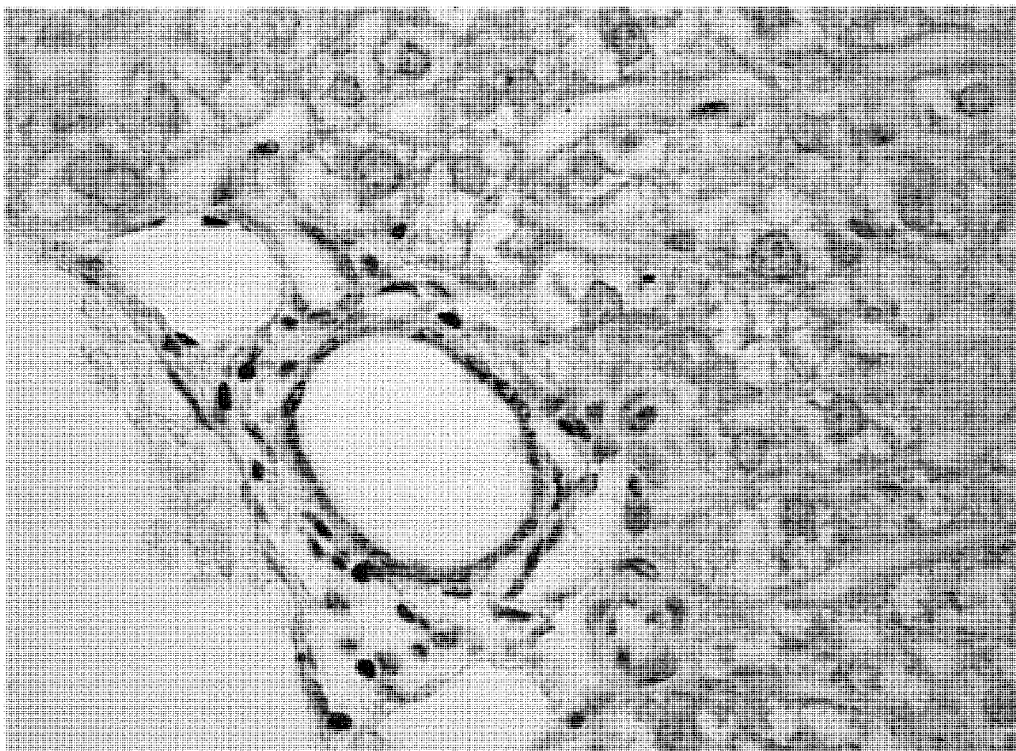


FIG. 24

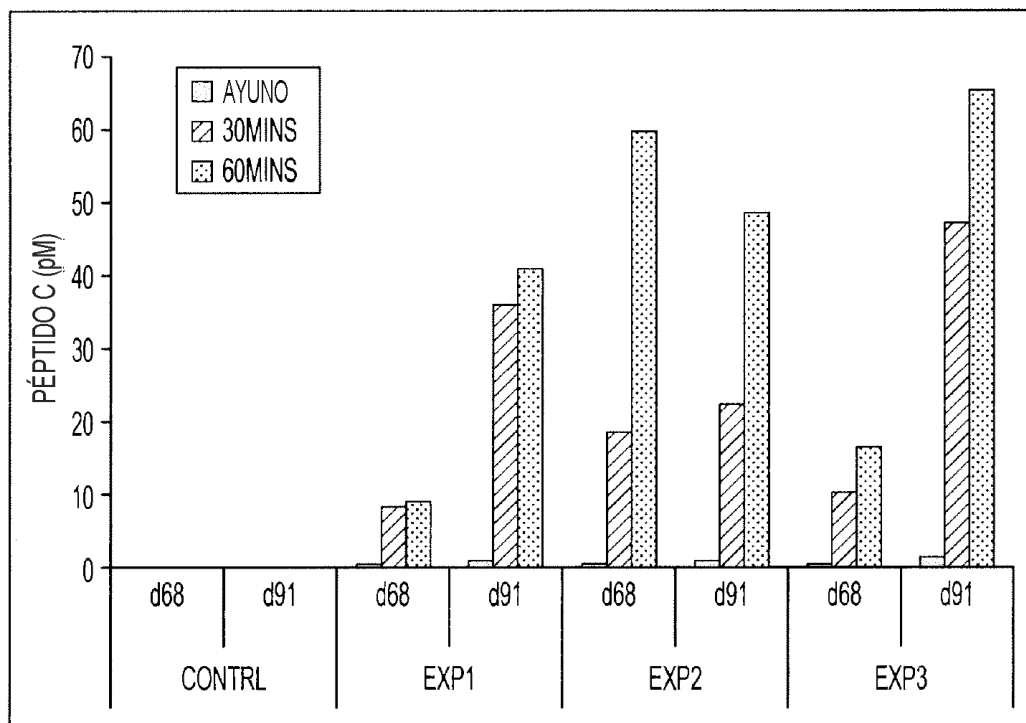


FIG. 25