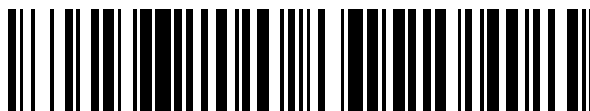


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 630**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2009 E 09761761 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2296672**

54 Título: **Medio condicionado para células progenitoras de hígado**

30 Prioridad:

11.06.2008 EP 08010651

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

19.01.2016

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND
GMBH (100.0%)**

**Else-Kröner-Strasse 1
61352 Bad Homburg , DE**

72 Inventor/es:

**HERRERA SANCHEZ, MARIA BEATRIZ;
FONSATO, VALENTINA;
TETTA, CIRO y
CAMUSSI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 556 630 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

Medio condicionado para células progenitoras de hígado

La presente invención se desarrolla en el campo de las preparaciones farmacéuticas biológicas y medicina regenerativa.

5 Las preparaciones de células madre demostraron ejercer un efecto regenerativo en los tejidos humanos o animales. Las pruebas clínicas que prueban la eficacia de soporte de hígado bioartificial en el tratamiento de fallo hepático fulminante (FHF) han demostrado algunos resultados prometedores, si bien la generación actual de dispositivos no ha demostrado suficiente eficacia y confiabilidad para uso de rutina, principalmente debido a la carencia de una fuente de hepatocitos humanos funcionalmente estables (Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka N. Cell choice for
10 bioartificial livers. Keio J Med. 2003;52(3):151-7.). Las células madre de hígado, o incluso células madre derivadas de otros tejidos, podrían proveer potencialmente una fuente alternativa de hepatocitos humanos. Además de la médula ósea, las células madre residen en los tejidos adultos tales como hígado y en el sistema nervioso central, y tienen una plasticidad mucho mayor que la conocida previamente.

15 Las células progenitoras/madre pluripotentes del hígado humano descritas en la solicitud Internacional de patente WO2006/126236 demostraron experimentar diferenciación en una variedad de tipos de células de tejidos y ejercer efectos regenerativos en órganos. Estas células son derivadas de una línea de células progenitoras pluripotentes de hígado humanas no ovales que expresan marcadores celulares hepáticos.

20 La solicitud internacional de patente WO2006/126236 divulga también un método para aislar las células progenitoras/madre pluripotentes de hígado humano antes mencionadas capaces de experimentar diferenciación en una variedad de tipos de células, comprendiendo el método las etapas de:

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

25 (ii) expandir la población de células supervivientes que tengan morfología epiteliode por cultivo en un medio de cultivo que contiene suero, que contiene glucosa suplementado con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano) y bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos) y que comprende las sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas usuales necesarios para el crecimiento de las células de mamíferos.

y en particular en donde los hepatocitos maduros son congelados en un medio de cultivo que contiene suero en presencia de un agente crioprotector y luego descongelados antes de su cultivo de acuerdo con la etapa (i).

30 Las células progenitoras pluripotentes humanas de WO2006/126236 (designadas como HLSCs en la descripción de patente) y el método de prepararlas se incorporan aquí completamente como referencia.

Las preparaciones de las células madre mesenquimales (MSCs) demostraron ejercer un efecto regenerativo sobre el tejido. Por ejemplo, las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea son conocidas por soportar de manera natural la hematopoyesis secretando un cierto número de moléculas tróficas, glicoproteínas de matriz extracelular solubles, citoquinas y factores de crecimiento.

35 Sin embargo, las preparaciones de células madre tienen la desventaja principal de producir reacciones inmunes cuando se administran. Algunas preparaciones de células madre tienen incluso el potencial de causar cáncer.

NOWAK G. ET AL., GVT, vol. 54, No. 7, 1 de julio de 2005, páginas 972,979 divulga un medio condicionado obtenible a partir del cultivo de progenitores de células madre de hígado fetal humano.

40 La WO00/69449A divulga un medio condicionado que contiene diferentes componentes como IL-6, IL-8 y HGF y puede ser utilizado para aplicaciones en curación de heridas.

BANAS AGNIESZKA ET AL., STEM CELLS, vol. 26, No. 10, 5 de junio de 2008, páginas 2705-2712, divulga un medio condicionado obtenible a partir de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo y comprende HGF, IL-8, IL-6 y VEGF.

45 Parekkadan et al. (Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. PLoS ONE. 2007 Sep 26;2(9):e941) estableció primero diversos tratamientos con MSC, tales como la administración de un medio condicionado (CM), para probar su eficacia en un modelo de rata de daño severo en el hígado inducido. En este artículo, las ratas recibieron administración intraperitoneal de un total de dos inyecciones de D-galactosamina (Gal-N). En un segundo estudio (Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem
50 cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro e in vivo. Hepatology. 2008 Jan 24;47(5):1634-1643.) el grupo del Parekkadan investigó si la infusión sistémica de MSC-CM podría llevar a una

respuesta hepatoprotectora en el hígado agudamente lesionado, específicamente inhibiendo la muerte celular y estimulando programas reparadores. Este grupo utilizó un régimen subletal de inducción por D-galactosamina, demostrando un beneficio de supervivencia significativo y la prevención de la liberación de enzimas hepáticas después del tratamiento con MSC-CM.

5 A la vista de las desventajas antes mencionadas de tratamientos con células madre, el hecho de que preparaciones altamente eficientes del arte anterior en el campo de la medicina regenerativa contienen usualmente células es un problema técnico que debería ser superado.

Así, el objetivo de la presente invención es proveer una preparación que es efectiva como composición farmacéutica en el campo de medicina regenerativa pero que no contiene células, evitando por lo tanto las desventajas causadas por las preparaciones del arte anterior las cuales contienen células, particularmente células madre.

Otro objetivo de la presente invención es proveer un método para preparar una composición farmacéutica que es efectiva en el campo de la medicina regenerativa pero que no contiene células, evitando por lo tanto las desventajas causadas por las preparaciones del arte anterior que contienen células, particularmente células madre.

Estos y otros objetivos son alcanzados mediante las preparaciones y el método tal como se define en las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes están dirigidas a realizaciones preferidas de la invención. El asunto objeto de las reivindicaciones tanto dependientes como independientes forma una parte integral de la descripción.

El uso de un modelo en ratón de fallo hepático fulminante (FHF), el medio condicionado libre de células (CM libre de células) producido cultivando una línea celular progenitora de hígado, tal como por ejemplo la línea de células progenitoras pluripotentes de hígado humano no ovals divulgado en WO2006/126236, demostró por parte de los inventores ejercer un efecto regenerativo sobre el hígado. El medio condicionado libre de células (CM libre de células) producido por cultivo de la línea celular progenitora del hígado demostró ser efectivo en la terapia de fallo de órganos, particularmente en la terapia de fallo de hígado y riñón. Sorprendentemente, también se encontró que una línea celular progenitora de hígado CM es significativamente más efectiva que una célula madre mesenquimal CM preparado bajo las mismas condiciones.

En particular, en los estudios descritos en el ejemplo 1 de la presente descripción, ratones macho SCID de 6 a 7 semanas de edad recibieron una inyección intraperitoneal de 500 µL de solución salina que contenía 0,125 µg de LPS y 18 mg de D-galactosamina (GAIN) para inducir FHF. Después de 30 minutos, 1 y 3 horas después de la administración de LPS y GAIN, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 3 ml de medio condicionado derivado de HLSCs cultivadas en un biorreactor rotatorio. El análisis preliminar del medio condicionado reveló una gran fracción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Los niveles en suero de la alanina transaminasa y la aspartato transaminasa se incrementó marcadamente después de la inducción de lesiones y disminuyó significativamente después de 6 días de la inyección con tratamientos con medio condicionado. Por otro lado, el análisis histopatológico del tejido de hígado evaluado por BrdU, PCNA y el ensayo de Tunel reveló un índice disminuido de apoptosis y necrosis y una recuperación de la morfología del tejido.

Estos estudios proveyeron la primera evidencia experimental de uso terapéutico potencial de medio condicionado derivado de HLSCs en el tratamiento de condiciones inflamatorias y regeneración de órganos.

Así, un primer aspecto de la invención es un medio condicionado tal como se define en la reivindicación 4. Las líneas de células progenitoras de hígado humanas mencionada en la reivindicación 4 es preferiblemente una línea de células progenitoras pluripotentes de hígado humano no ovals, más preferiblemente la línea de células pluripotentes de hígado humano no ovals divulgada en la solicitud internacional de patente WO2006/126236, la cual se incorpora aquí por referencia.

Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la preparación definida más arriba cae también dentro del alcance de la invención.

45 En lo que sigue, el medio condicionado que forma el asunto objetivo de la invención será denominado como el "HLSC-CM libre de células".

El término "HLSC" se refiere a una línea de células progenitoras/madre pluripotente de hígado. Preferiblemente, el término "HLSC" se refiere a una línea de células pluripotentes de hígado no ovals, más preferiblemente a la línea de células progenitoras/madre pluripotentes de hígado divulgada en WO2006/126236. Más preferiblemente, la línea celular HLSC tiene las características definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 de la WO2006/126236 y/o las características resumidas en la Tabla 1, página 7 de la WO2006/126236. Tales características se incorporan aquí como referencia.

La HLSCs-CM libre de células que forma el asunto objeto de la invención es adecuada para uso como una composición farmacéutica como tal o en una forma concentrada. Una forma concentrada es concentrada por

ejemplo al menos aproximadamente 5 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces, incluso más preferiblemente de manera aproximada 25 veces.

5 Preferiblemente, la HLSC-CM libre de células de la invención se obtiene a partir células progenitoras/madre pluripotentes de hígado, preferiblemente la línea celular HLSC divulgada en WO2006/126236, cultivada bajo condiciones de GMP, las cuales son conocidas para la persona experimentada. Alternativamente, puede ser obtenida de células progenitoras/madre pluripotentes de hígado, preferiblemente la línea celular HLSC divulgada en WO2006/126236 cultivada en un sistema BAL (Hígado Bioartificial), el cual también es conocido para la persona experimentada.

10 Un ejemplo de condiciones GMP para el crecimiento de células progenitoras/madre pluripotentes de hígado y recolección del medio condicionado libre de células (CM) de las mismas es como sigue.

15 Las células progenitoras/madre pluripotentes de hígado son aisladas por el método divulgado en WO2006/126236, en el cual la etapa de expansión se lleva a cabo cultivando las células madre progenitoras en la presencia de suero de ternera fetal (FCS) preferiblemente a una concentración de aproximadamente 10%, hEGF (factor de crecimiento epitelial humano) y bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básicos). el FCS, bFGF y el hEGF son preferiblemente grado GMP, por ejemplo, los producidos por Invitrogen.

20 Para recolectar el medio condicionado en condiciones de GMP, el FCS es retirado del cultivo, puesto que esta es una proteína heteróloga que no es adecuada para inyección en humanos. Con este fin, las células son lavadas y cultivadas durante 24 horas en un medio de recolección que comprende por ejemplo alfa-MEM suplementado con albúmina humana grado GMP. La albúmina está preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0.05%. El medio condicionado libre de células es recolectado entonces por centrifugación o filtración.

En la experimentación *in vivo* mencionado más arriba, la administración del HLSC-CM libre de células de la invención a un modelo animal (ratones SCID) de fallo hepático fulminante (FHF) demostró proveer un beneficio de supervivencia significativo en los ratones SCID tratados con MSC-CM.

25 El medio condicionado de acuerdo con la invención es adecuado para uso como un medicamento:

En particular para el tratamiento de fallo y/o lesión en un órgano, preferiblemente fallo y/o lesión en hígado y/o riñón.

30 Además, los inventores analizaron la composición del HLSC-CM libre de células de la invención, con el fin de identificar aquellas proteínas (por ejemplo, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y/o otras proteínas) que más probablemente provean una contribución significativa a los efectos beneficiosos del CM mencionados más arriba, de tal manera que se provean composiciones farmacéuticas simplificadas compuestas de una mezcla de proteínas capaces de imitar, al menos en parte, las capacidades regenerativas de órganos del CM producido por cultivo del HLSCs como se describió más arriba.

35 Así, otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica simplificada que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una mezcla de al menos factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucinas 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a 10-400 ng/ml.

En una realización preferida, la composición farmacéutica simplificada comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una mezcla de al menos factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y proteína estimulante de macrófago (MSP) y opcionalmente factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

40 En aún otra realización preferida, la composición farmacéutica simplificada comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una mezcla de proteínas de acuerdo con cualquiera de las realizaciones definidas más arriba y al menos una proteína adicional seleccionada del grupo consistente de activina C, molécula de adhesión celular de leucocitos activada (ALCAM), receptor 4 de quimioquina (motivo C-C) (CCR4), regulador 1 de transmembrana BMP rico en cisteína (tipo cordina) (CRIM), Decorina, ectodisplasina A2 (EDA-A2), endotelina, factor de crecimiento de fibroblastos tipo receptor 1 (FGFR5), Glipicano 3, oncoproteína relacionada con crecimiento (GRO), proteína 6 de enlazamiento a factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP-6), factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF-1), receptor de interleucina 20, alfa (IL-20 R alfa), proteína 2 de transmembrana que contiene Kringle (Kremen-2), proteína 1 de enlazamiento beta al factor de crecimiento de transformación latente (TGF-beta bp1 latente), proteína intrínseca principal de fibra de lente (MIP-2), cadena beta de MSP, osteoprotegerina/TNFRSF11B (superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 11b), gp130 soluble (sgp130), proteína secretada, 50 ácida, rica en cisteína (osteonectina) (SPARC).

Los rangos de concentración de citoquinas preferidos en la composición farmacéutica simplificada de la invención son como sigue:

- HGF: 1-100 ng/ml, preferiblemente 5-80 ng/ml, más preferiblemente 10-65 ng/ml;

- IL-6: 10-200 ng/ml, preferiblemente 20-100 ng/ml, más preferiblemente 30-50 ng/ml;
- IL-8: \geq 35 ng/ml, preferiblemente 50-600 ng/ml, más preferiblemente 100-300 ng/ml;
- VEGF (si está presente): 10-400 ng/ml, preferiblemente 20-250 ng/ml, más preferiblemente 35-175 ng/ml; and
- MSP (si está presente): 1-100 pg/ml, preferiblemente 5-80 pg/ml, más preferiblemente 5-65 pg/ml.

5 Sin embargo, el alcance de la invención también incluye cualquier forma diluida o concentrada de la composición farmacéutica simplificada. Una forma concentrada es concentrada por ejemplo al menos aproximadamente 5 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces, incluso más preferiblemente de manera aproximada 25 veces. Una forma diluida está diluida por ejemplo al menos aproximadamente 5 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 25 veces.

10 La composición farmacéutica simplificada de la invención es adecuada para uso como un medicamento, preferiblemente para el tratamiento de fallo y/o lesión de un órgano, preferiblemente fallo y/o lesión de hígado y/o riñón. De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica es formulada de tal manera que se administran las dosis siguientes de citoquina:

- 15
- HGF: 0.01-1 mg/kg, preferiblemente 0.03-0.8 mg/kg, más preferiblemente 0.1-0,5 mg/kg;
 - interleucina 6 (IL-6): 0.01-1 mg/kg, preferiblemente 0.03-0.8 mg/kg, más preferiblemente 0.05-0,5 mg/kg;
 - interleucina 8 (IL-8): 0.01-1 mg/kg, preferiblemente 0.02-0.8 mg/kg, más preferiblemente 0.03-0,5 mg/kg;
 - VEGF (si está presente): 0.01-1 mg/kg, preferiblemente 0.02-0.8 mg/kg, más preferiblemente 0.04-0,5 mg/kg;
 - MSP (si está presente): 0.01-1 mg/kg, preferiblemente 0.02-0.8 mg/kg, más preferiblemente 0.08-0,5 mg/kg.

20 En una realización particularmente preferida estas dosis de citoquinas son administran una vez por día.

Debe entenderse que las composiciones farmacéuticas simplificadas definidas más arriba se proveen puramente como ejemplos no limitantes de composiciones farmacéuticas simplificadas capaces de imitar, al menos en parte, las capacidades regenerativas de órganos de un CM obtenible por cultivo de HLSCs como se describió más arriba.

25 objetivos y ventajas adicionales de la invención aparecerán de manera más clara a partir de los siguientes ejemplos, los cuales se proveen únicamente a manera de ilustración.

Ejemplo 1 – Estudios preliminares *in vivo*

Preparación de cultivos de células HLSC y MSC

30 Se aislaron células progenitoras de hígado humanas (HLSCs) como se describe en WO2006/126236. Las células se dejaron crecer a 60%-70% de confluencia (aproximadamente 2×10^6 HLSCs por matraz de 75 cm²), se lavaron exhaustivamente y se cultivaron en 10 mL de medio alfa-MEM libre de suero suplementado con 0.05% de albúmina de suero humana (producida por GMP). Se aislaron células madre mesenquimales humanas (MSCs) a partir de aspirados de médula ósea y se cultivaron y caracterizaron como se informó previamente. Las MSCs fueron cultivadas en medio MesenPRO RST™ el cual es un medio reducido en suero (2% de FCS) específicamente formulado para soportar el crecimiento de MSCs.

35 Preparación del medio condicionado

40 El medio condicionado libre de células fue preparado recolectando el medio después de 24 horas de cultivo de MSCs y HLSCs por centrifugación. Los experimentos fueron llevados a cabo con una masa celular de 2×10^6 células. El medio fue concentrado entonces, aproximadamente 25 veces, utilizando unidades de ultrafiltración (Amicon Ultra-PL 3, Millipore) con un corte de peso molecular de 3 kDa. Se obtuvo un total de 250 μ l de medio condicionado. Este medio concentrado fue diluido en 3 ml de α -MEM (sin FCS) hasta un volumen final de 3 ml. se administró por vía intraperitoneal 1 ml de medio condicionado 30 minutos, 1 y 3 horas después de la inducción de la lesión en el hígado.

Modelo FHF *in vivo*.

45 Para la inducción de fallo hepático fulminante (FHF), se desarrolló toxicidad letal de lipopolisacárido (LPS) sobre animales en tratamiento con D-galactosamina (2-amino-2-desoxi-D-galactosa) como se describió previamente (Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of ipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal

and D-galactosamine-treated mice. J Exp Med. 1987;165(3):657-63). En resumen, un grupo de 10 ratones SCID recibieron una inyección intraperitoneal de D-galactosamina (GalN) (600 mg/kg) y 0.125 µg de LPS por animal. Los inventores determinaron previamente que se indujo 100% de letalidad en GalN (600 mg/kg) y LPS (0.125 µg por animal) en ratones tratados durante 8 horas. Se administraron GalN y LPS como una mezcla en 500 µl de solución de NaCl libre de pirógenos. Las muertes fueron registradas hasta 24 horas después de la inyección. 30 minutos, 1 y 3 horas después de la inyección de LPS y GalN, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal tres veces con 1 ml de medio condicionado concentrado de HLSC y MSC. Como se muestra en la Figura 1, cuatro de cinco ratones inyectados con el CM derivado de HLSC sobrevivieron, mientras que ninguno de los ratones tratados con el CM derivado de MSC sobrevivieron.

5

10 Composición en citoquina de medio condicionado con HLSC y MSC

Para estudiar la composición de medio condicionado obtenido por cultivo de HLSCs y MSCs como se divulgó más arriba, se midió un panel de 31 citoquinas diferentes por ELISA múltiple (Bioclarma). Ambos tipos de células fueron cultivados en un medio con 10% de FCS. Los medios condicionados fueron recolectados después de 24 horas de cultivo. La composición en citoquinas del medio solo también fue medida. Los resultados se proveen a continuación en la Tabla 1.

15

Tabla 1. HLSCs vs. MSCs: producción de citoquinas*

	HLSCs	MSCs	condición de cultivo 10% FCS
IL1β	0	0	0.86
ILra	0	0	0
IL-2	0	0	0
IL-4	0	0	0.73
IL-5	0	0	0
IL-6	1130.89	2434.4	0
IL-7	0	0	0
IL-8	>4205.64	51.65	0.36
IL-9	0	0	0
IL-10	0.12	0.36	0.85
IL-12	0	0.47	0.24
IL-13	0	0	0
IL-15	0	0	0
IL-17	0	0	0
Eotaxina	5.1	3.96	0
bFGF	0	0	0
G-CSF	43.17	11.06	0
GM-CSF	1.75	0	0.03
IFNγ	38.46	104.73	0
IP-10	0	0	0
MCP-1	514.43	256.03	0

ES 2 556 630 T3

	HLSCs	MSCs	condición de cultivo 10% FCS
MIP-1 α	0	0	0
MIP-1 β	0	0	0
PDGF	0	0	0
Rantes	5.97	0	0
TNF α	3.7	13.04	0.19
VEGF	896.9	4961.43	0
HGF	5179	2.3	0
M-CSF	17.79	4.48	0
MIF	159.26	32.51	5.29
SCF	5.1	0.11	0
* (la concentración de citoquina fue expresada en pg/ml x 10 ⁶ células tanto de HLSC como MSC cultivados en condición de cultivo al 10% de FCS durante 24 horas)			

Ejemplo 2 - Efecto de CM de HLSCs y MSCs obtenido de cultivo en matraz T y mezclas de proteínas en un modelo *in vivo* con D-galactosamina/endotoxina de (FHF).

5 Se llevaron a cabo los siguientes estudios experimentales en un modelo *in vivo* (ratones SCID) de fallo hepático fulminante (FHF).

1) El primer protocolo experimental consistió en la inyección intraperitoneal de 1 ml de un sobrenadante concentrado 25 veces obtenido del matraz T de cultivo de HLSC. La concentración de 25 veces fue alcanzada con membranas 3KD (Millipore). El sobrenadante fue sometido a ultracentrifugación antes del uso. La inyección fue administrada 30 minutos, 1 hora y 3 horas después de la inducción FHF mediante la inyección de D-GalN/LPS. En total se trataron doce ratones SCID.

2) El segundo protocolo experimental consistió en la inyección de una mezcla de citoquinas. Se inyectó a un total de 10 ratones SCID con la siguiente mezcla de citoquina recombinante. HGF: 870,75 ng/ml X 30 ml de alfa-MEM (inyecciones i.v.)=26 μ g IL-6: 340,5 ng/ml X 30 (inyecciones i.v.)= 10,4 μ g IL-8: 261 ng/ml X 30 (inyecciones i.v.)= 8 μ g VEGF: 202 ng/ml X 30 (inyecciones i.v.)= 6 μ g. Se prepararon 30 ml de esta mezcla con el fin de tener 3 ml de mezcla para un total de 10 ratones SCID. Cada ratón SCID fue inyectado con 1 ml de esta mezcla de citoquinas a los 30 minutos, 1 hora y 3 horas después de la inyección intraperitoneal de GalN/LPS. Cada ratón SCID recibió: [HGF]: 2,59 μ g, [IL-6]: 1,02 μ g, [IL-8]: 0,79 μ g, [VEGF]: 0,6 μ g. Esta mezcla es designada como MIX 4.

3) El tercer protocolo experimental consistió en la inyección de MIX 4 más MSP-1. Un total de 5 ratones SCID fueron inyectados. Cada ratón SCID recibió: [HGF]: 2,59 μ g, [IL-6]: 1,02 μ g, [IL-8]: 0,79 μ g, [VEGF]: 0,6 μ g (las cuales son las concentraciones de citoquina obtenidas de los experimentos BAL) más [MSP-1]: 2 ug.

4) El cuarto protocolo experimental consistió en la inyección de MSC-CM o HLSC-CM. Con el fin de obtener el MSCs- CM, los MSCs se dejaron crecer a 90% de confluencia (aproximadamente 2×10^6 MSCs por matraz de 75cm²), se lavaron exhaustivamente y cultivaron en 10 mL MesenPRO RS™, un medio cultivado con FCS al 2%. El medio condicionado fue recolectado 24 horas después y concentrado 25 veces utilizando unidades de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA) con un corte de 3-kDa. Para producir HLSCs-CM, el HLSCs se dejó crecer a 60% hasta 70% de confluencia (aproximadamente 2×10^6 HLSC por matraz de 75 cm²), se lavó exhaustivamente, y se cultivó en 10 ml de medio alfa-MEM libre de suero suplementado con 0.05% de albúmina de suero humana (producida por GMP). El medio condicionado fue recolectado 24 después y concentrado 25 veces utilizando unidades de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA) con un corte de 3-kDa.

30 El peso medio de los ratones SCID usados en estos experimentos fue de aproximadamente 25 g.

Materiales y métodos

Modelo *in vivo* de FHF. Para la inducción de FHF, se desarrolló toxicidad letal de lipopolisacárido (LPS) sobre animales en tratamiento con D-galactosamina (2-amino-2-desoxi-D-galactosa) como se describió previamente (Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J Exp Med.* 1987;165(3):657-63). En resumen, los ratones SCID recibieron una inyección intraperitoneal de D-galactosamina (GalN) (600 mg / kg, 18 mg por animal) y 0.125 µg de LPS por animal. Los inventores determinaron previamente que se indujo 100% de letalidad en GalN (600 mg/kg) y LPS (0.125 µg por animal) tratando ratones durante 8 horas. El GalN y el LPS fueron administrados como una mezcla en 500 µl de solución de NaCl libre de pirógenos. Las muertes fueron registradas hasta 24 horas después de la inyección. 30 minutos, 1 y 3 horas después de la inyección de LPS y GalN, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 1 mL de medio condicionado con HLSC, medio condicionado con MSC o mezcla de citoquinas.

Cultivo de células. Se aislaron células madre mesenquimales humanas (MSCs) a partir de aspirados de médula ósea y se cultivaron y caracterizaron como se informó previamente. Los MSCs fueron cultivados en medio MesenPRO RS™ el cual es un medio reducido en suero (2% de FCS) formulado específicamente para soportar el crecimiento de MSC. Se usaron células para experimentos durante los pasajes 3-5.

Preparación del medio condicionado (CM) de MSCs. Se cultivaron MSC humanas y se caracterizaron para la expresión de marcador de superficie y adipogénico y para la capacidad de diferenciación osteogénica tal como se describió previamente. Para obtener MSCs-CM, las células se dejaron crecer hasta 90% de confluencia (2 x 10⁶ MSCs por matraz de 75 cm²), se lavaron exhaustivamente y cultivaron en 10 mL de MesenPRO RS™, un medio cultivado con 2% de FCS. El medio condicionado fue recolectado 24 horas después y concentrado 25 veces utilizando unidades de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA) con un corte de 3 kDa.

Preparación de HLSCs-CM. Se obtuvieron HLSCs humanos a partir de hepatocitos humanos congelados. Los HLSCs fueron cultivados y caracterizados en cuanto a la expresión del marcador de superficie y capacidad de diferenciación como se describió previamente. Para obtener HLSCs-CM, las células se dejaron crecer a 60% hasta 70% de confluencia (aproximadamente 2 x 10⁶ HLSC por matraz de 75 cm²), se lavaron exhaustivamente y cultivaron en 10 mL de medio alfa-MEM libre de suero suplementado con 0.05% de albúmina de suero humana (producida por GMP). El medio condicionado fue recolectado 24 horas después y concentrado 25 veces utilizando unidades de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA) con un corte de 3 kDa.

Concentración del medio condicionado: Los sobrenadantes fueron recolectados del matraz en T después de 24 horas de cultivo. El sobrenadante fue concentrado entonces, aproximadamente 25 veces, utilizando unidades de ultrafiltración con un corte de peso molecular de 3 kDa de Millipore.

Análisis histológico: Se analizó la necrosis del hígado a través de tinción con H&E (tinción con hematoxilina y eosina), proliferación (tinción con PCNA) y TUNEL (células apoptóticas).

Análisis bioquímicos. Los niveles de alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) en suero fueron medidos utilizando un analizador clínico automático estándar.

Inmunoprecipitación Western: La inmunoprecipitación Western se llevó a cabo para la detección de BAX y BclXS/L. Los hígados fueron homogeneizados y sometidos a lisis a 4°C durante 1 hora en regulador de lisis (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8.3, Triton X-100 al 1%, 10 µmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 10 µmol/L de leupeptina, y 100 U/ml de aprotinina) y se centrifugaron a 15,000 g. El contenido de proteína de los sobrenadantes fue medido por el método de Bradford. Alícuotas que contenían 200 µg de proteína de lisados de hígado fueron sometidas a electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio al 10% en gel de poliacrilamida bajo condiciones reductoras y sometidas a electrodeposición sobre filtros de membrana de nitrocelulosa. Las siembras fueron bloqueadas con leche desengrasada al 5% en 20 mmol/L de Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L de NaCl más 0.1% de Tween (TBS-T). Las membranas fueron inmunosembradas subsecuentemente durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios relevantes en la concentración apropiada. Después de lavados extensos con TBS-T, las siembras fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos del isotipo conjugados con peroxidasa, lavada con TBS-T, desarrollada con reactivos de detección ECL durante 1 minuto, y expuesta a película X-Omat. Se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti-BAX y anticuerpo policlonal anti-BclXS/L de Santa Cruz Biotechnology.

Resultados

Los resultados obtenidos se ilustran en las figuras 2-4.

La Figura 2 muestra la tasa de supervivencia (%) de ratones SCID lesionados con GalN/LPS tratados con HLSC-CM (n = 22; 73% de supervivencia), a MSC-CM (n = 5; 0% de supervivencia) o con una mezcla de citoquinas (citoquinas: VEGF, IL6, IL8, HGF; n=10 con; 40% de supervivencia, y la mezcla de citoquinas más MSP-1 (citoquinas*: VEGF, IL6, IL8, HGF + MSP-1; n=5;. 100% de supervivencia)

La figura 3 muestra los niveles en suero de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) de ratones de control, tratados con GalN/LPS y GalN/LPS inyectados con HLSC-CM después de 6 días de inducción FHF

5 La figura 4 es una imagen que representa la tinción con H&E y PCNA de ratones SCID tratados con GalN/LPS inyectados con HLSC-CM después de 3 y 6 días de inducción de FHF.

Ejemplo 3 - experimentos *In vitro* usando medio condicionado (CM) con HLSCs y MSCs y mezclas de citoquina

10 En este protocolo experimental, fue investigada la capacidad de HLSCs-CM para inhibir directamente la apoptosis en hepatocitos primarios humanos cultivados. Utilizando ensayos *in vitro* de apoptosis, el medio condicionado derivado de HLSCs demostró ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la muerte de hepatocitos. Esta actividad *in vitro* fue comparada también con la actividad *in vitro* de MSC-CM. El efecto de 6 citoquinas recombinantes humanas presentes en el medio condicionado producidas por las células también fue estudiado en los ensayos de apoptosis de hepatocitos humanos.

Materiales y métodos

15 Cultivo celular. Se aislaron células madre mesenquimales humanas (MSCs) a partir de aspirados de médula ósea, se cultivaron y caracterizaron como se informó previamente. Las MSCs fueron cultivadas en medio MesenPRO RS™ el cual es un medio reducido en suero (2% de FCS) formulado específicamente para soportar el crecimiento de MSCs. Las células fueron usadas para experimentos durante los pasajes 3-5. Las células progenitoras de hígado humano (HLSCs) fueron aisladas como se describió previamente y se cultivaron en alfa-MEM/EBM (3:1) que contenía 10% de FCS (GMP; suero de ternera fetal) suplementado con 4ng/ml de hEGF y de hFGF.

20 Medio condicionado (CM) con MSCs. Se cultivaron MSCs humanos y se caracterizaron en cuanto a la expresión de marcador de superficie y capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica como se describió previamente. Para obtener MSCs-CM, se dejaron crecer las células hasta 90% de confluencia (aproximadamente 2×10^6 MSCs por matraz de 75 cm²), se lavaron exhaustivamente, y se cultivaron en 10 mL de MesenPRO RS™, un medio cultivado con 2% de FCS. El medio condicionado fue recolectado 24 horas después, se sometió a ultracentrifugación y se concentró 25 veces utilizando unidades de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA) con un corte de 3-kDa.

30 HLSCs-CM. Se obtuvieron HLSCs humanas de hepatocitos humanos congelados. Las HLSCs fueron cultivadas y caracterizadas en cuanto a la expresión del marcador de superficie y capacidad de diferenciación como se describió previamente. Para obtener HLSCs-CM, se dejaron crecer las células a 60% hasta 70% de confluencia (aproximadamente 2×10^6 HLSC por matraz de 75 cm²), se lavaron exhaustivamente y se cultivaron en 10 mL de medio alfa-MEM libre de suero suplementado con 0.05 % de albúmina de suero humana (producida por GMP). El medio condicionado fue recolectado 24 horas después, sometido a ultracentrifugación y concentrado 25 veces utilizando unidades de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA) con un corte de 3-kDa.

35 Apoptosis de hepatocitos *in vitro* (TUNEL). Se cultivaron hepatocitos durante 1 día en placas de 96 pozos a 30000 células/pozo en placas recubiertas con fibronectina. Se agregó galactosamina-D a una concentración de 5 mM durante 24 horas, seguida por diferentes dosis de medios condicionados derivados de HLSC y MSC obtenidos como se describe previamente (de 0.5% a 16%), mezcla de cuatro citoquinas (MIX 4 significa IL-8, IL-6, HGF, VEGF). Los resultados se expresan como media \pm SD de 8 experimentos diferentes.

40 Concentración de citoquinas. La concentración de citoquinas recombinantes humanas usadas en los experimentos *in vitro* fue seleccionada de las concentraciones producidas por HLSCs después de 24 horas en condiciones de cultivo en matraz, concentradas 25 veces. En el caso de MSP, se usó la concentración obtenida en condiciones de cultivo de BAL. La primera concentración se considera la misma que la reserva de medio condicionado, las células fueron estimuladas con el 16% de cada concentración de reserva que representaba la concentración más alta del medio condicionado usado *in vitro*.

IL-6=56,5 ng/ml, concentración final usada = 9 ng/ml

45 IL-8=210 ng/ml, concentración final usada= 33,6 ng/ml

HGF=259 ng/ml, concentración final usada = 41,4 ng/ml

VEGF= 44,8 ng/ml, concentración final usada= 7,2 ng/ml

MCP-1= 25,7 ng/ml, concentración final usada = 4,1 ng/ml

MSP= 60 ng/ml, concentración final usada= 9,6 ng/ml

50 Los resultados se ilustran en las Figuras 5-10.

5 La figura 5 muestra la inhibición del apoptosis de hepatocitos *in vitro* por HLSCs-CM a concentraciones bajas. Los hepatocitos humanos primarios fueron cultivados en placas recubiertas con fibronectina. La apoptosis fue inducida con D-galactosamina (GalN). Durante la exposición a GalN, los hepatocitos fueron cultivados en un medio de cultivo celular suplementado con 0.5; 2; 8 o 16% de HLSCs-CM concentrado 25 veces (producido por GMP). La muerte celular fue cuantificada utilizando análisis de imágenes digital de cuatro imágenes por pozo. Los datos mostrados son la media \pm SD de 8 experimentos. P <0.05.

La Figura 6 muestra micrografías representativas del ensayo TUNEL de hepatocitos humanos tratados con GalN. (A) Los hepatocitos tratados con GalN 5 mM después de 24 horas y (B) hepatocitos tratados con GalN 5 mM estimulados con 2% de HLSCs-CM después de 24 horas.

10 La figura 7 muestra la inhibición de la apoptosis de hepatocitos *in vitro* por MSCs-CM a bajas concentraciones. Los hepatocitos humanos primarios fueron cultivados en placas recubiertas con fibronectina. La apoptosis fue inducida con D-galactosamina (GalN). Durante la exposición a GalN, los hepatocitos fueron cultivados en un medio de cultivo celular suplementado con 0.5; 2; 8 o 16% de MSC-CM concentrada 25 veces. La muerte celular fue cuantificada usando análisis de imágenes digital de cuatro imágenes por pozo. Los datos mostrados son la media \pm SD de 8 experimentos. P <0.05.

15 La figura 8 muestra la inhibición de apoptosis de hepatocitos *in vitro* por diversas mezclas de citoquinas. Los hepatocitos humanos fueron cultivados en la presencia de D-galactosamina (GalN; 5 mM) durante 24 horas. El uso de Mix4 + MSP sobre hepatocitos tratados con GalN dio como resultado la inhibición de la apoptosis después de 24 horas. Los hepatocitos tratados con GalN también fueron cultivados con Mix4 + MCP-1 o con la combinación de Mix4 + MSP + MCP-1. La muerte celular fue cuantificada usando análisis de imágenes digital para cuatro imágenes por pozo. Los datos mostrados son la media \pm SD de 8 experimentos. *P <0.05.

Ejemplo 4 - análisis de la composición de CM por ensayo multiplex y de inmunosorción enlazada a enzima

25 Las citoquinas solubles producidas en los medios de cultivo por células madre de hígado humanas (HLSCs) han demostrado potenciar la curación del hígado. Con el fin de elucidar adicionalmente los mecanismos involucrados, las citoquinas liberadas por HLSCs fueron determinadas y comparadas con las citoquinas producidas por células madre mesenquimales de médula ósea humana (MSCs). El análisis del perfil de las citoquinas secretadas fue extendido por la producción de medio condicionado bajo diferentes condiciones de cultivo celular, tal como botellas rodantes, matraz T en condiciones normóxicas y matraz T bajo condiciones hipóxicas. En el caso de MSCs, las células fueron cultivadas solamente en un matraz T en condiciones de cultivo de normóxicas. Se obtuvo un total de 16 medios condicionados diferentes. Todos los análisis hechos con el sistema Multiplex (de Bio-rad) del medio condicionado producido en 24 horas de cultivo por HLSCs y MSCs, indicó la presencia de citoquinas y quimioquinas, tal como cantidades mayores de, entre otros, HGF, IL6, IL8, VEGF, MCP1, con un total de 31 proteínas diferentes. Varios anticuerpos usados para el ensayo multiplex humano de Bio-Rad fueron también establecidos por ELISA (IL-6, IL-8, HGF, VEGF, MCP1 y MSP1). El ELISA fue llevado a cabo con los kits RayBio® Human ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los inventores también establecieron comparativamente el múltiplex y el ensayo inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA). La comparación fue basada en la medición de seis citoquinas presentes en los 16 medios condicionados diferentes producidos. Las concentraciones de citoquina, tal como se miden de acuerdo con diferentes kits, mostraron tendencias similares, aunque las concentraciones absolutas medidas fueron diferentes.

40 **Materiales y Métodos**

Cultivo celular

HLSCs. Se aislaron células progenitoras de hígado humanas (HLSC) como se describió previamente y se cultivaron en alfa-MEM/EBM (3:1) que contenía 10% de FCS (GMP; suero de ternera fetal) suplementado con 4ng/ml tanto de rhEGF como de rhFGF.

45 Las siembras celulares iniciales y las composiciones de los medios, para la recolección del medio condicionado (CM), en de todos los experimentos llevados a cabo con HLSCs cultivados por 24 horas, fueron como se describe a continuación.

- 2 experimentos con células en pasaje 3 cultivadas en botella rodante: 20x106 HLSC culture in 100 ml of RPMI + 0,05% albúmina humana

50 - 2 experimentos con células en pasaje 10 cultivadas en botella rodante : 20x106 HLSC culture in 100 ml of RPMI + 0,05% albúmina humana

- 3 experimentos con células en pasaje 3 cultivadas en matraces T en condiciones normóxicas: 2x106 HLSC culture in 10 ml of RPMI+ 0,05% albúmina humana

ES 2 556 630 T3

- 3 experimentos con células en pasaje 10 cultivadas en matraces T en condiciones normóxicas: 2x10⁶ HLSC culture in 10 ml of RPMI+ 0,05% albúmina humana
- 2 experimentos con células en pasaje 3 cultivadas en condiciones hipóxicas en matraz T: 2x10⁶ HLSC culture in 10 ml of RPMI+ 0,05% albúmina humana
- 5 - 2 experimentos con células en pasaje 10 cultivadas en condiciones hipóxicas en matraz T: 2x10⁶ HLSC culture in 10 ml of RPMI+ 0,05% albúmina humana
- hMSCs. Se aislaron células madre mesenquimales humanas (hMSCs) a partir de aspirados de médula ósea humana y se cultivaron y caracterizaron como se informó previamente. Las MSCs fueron cultivadas en medio MesenPRO RS™ el cual es un medio reducido en suero (2% de FCS) formulado especialmente para soportar el crecimiento de MSCs. Las células fueron usadas para experimentos durante el pasaje 3.
- 10 La siembra celular inicial y las composiciones de los medios, para la recolección del medio condicionado (CM), de los experimentos llevados a cabo con hMSCs cultivado durante 24 horas son como se discute a continuación.
- 2 experimentos con células en pasaje 3 cultivadas en matraces T en condiciones normóxicas: 2x10⁶ in 10 ml de RPMI+ 0.05% de albúmina humana.
- 15 Preparación de CM. Se obtuvieron CM derivados de HLSCs obtenidos por siembra de las células a una concentración de 2x10⁶ en matraz T e incubándolas durante la noche en la incubadora. El día siguiente, las células fueron lavadas exhaustivamente, y cultivadas en 10 mL de RPMI (sin rojo de fenol) en la presencia de 0.05% de albúmina humana. El medio CM fue recolectado 24 horas después y todas las alícuotas de cada experimento fueron congeladas a -20°C. Se concentró CM por centrifugación durante 1, 30 horas a 4°C a 2700g, utilizando las unidades de ultrafiltración de Millipore con un corte de 3-kDa de tamaños de poro.
- 20 El CM derivado de hMSCs fue obtenido permitiendo el crecimiento a 90% de confluencia (aproximadamente 2 x 10⁶ MSCs por matraz de 75 cm²), lavando exhaustivamente, y cultivando en 10 ml de RPMI (sin rojo de fenol) en la presencia de 0.05% de albúmina humana. El medio condicionado fue recolectado 24 horas después y todas las alícuotas de cada experimento fueron congeladas a -20°C. Se concentró el CM por centrifugación durante 1, 30 horas a 4°C a 2700g, utilizando las unidades de ultrafiltración de Millipore con un corte de 3-kDa de tamaños de poro.
- 25 Después de la recolección del CM, las células fueron recuperadas, se estableció la viabilidad celular mediante exclusión con colorante azul de triplano obteniendo más de 95% de la viabilidad en todos los experimentos.
- 30 Cuantificación de proteína total. La concentración de proteína total en el CM fue determinada de acuerdo con el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories) siguiendo el protocolo del fabricante. Se usó albúmina de suero bovino (BSA) para crear una referencia estándar. Se agregaron 5 µl de cada muestra a 1 ml de colorante del reactivo Bradford diluido 1 a 5 con agua destilada y se mezcló. Después de incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se detectó la absorbancia a 595 nm de luz óptica con un fluorofotómetro. La concentración de proteína de cada muestra fue calculada de acuerdo con la curva de absorbancia de BSA linealizada.
- 35 ELISA. Se usó el RayBio® Human ELISA (ensayo inmunosorbente enlazado a enzima) para la medición cuantitativa de IL-8, IL-6, VEGF, HGF, MCP1 y MSP1. Este ensayo emplea anticuerpos específicos para las citoquinas humanas mencionadas, colocadas como recubrimiento sobre una placa de 96 pozos. Mediante una pipeta se depositan estándares y muestras en los pozos y las citoquinas presentes en una muestra se unen a los pozos por los anticuerpos inmovilizados. Los pozos fueron lavados y se agregan los anticuerpos de citoquina antihumana biotinilados. Después de lavar los anticuerpos biotinilados no enlazados, se transfiere con pipeta estreptavidina conjugada a HRP a los pozos. Los pozos son lavados de nuevo, se agrega una solución de sustrato TMB a los pozos y el color se desarrolla en proporción a la cantidad de citoquinas enlazadas. La Solución Stop cambia el color de azul a amarillo, y la intensidad del color se mide a 450 nm.
- 40
- 45 Ensayo Bioclarma. Un inmunoensayo biométrico multiplex de Bio-rad, que contiene microesferas coloreadas fluorescentes conjugadas con un anticuerpo monoclonal específico para las proteínas objetivo, fue utilizado para la medición de citoquinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Plex Human Cytokine Assay; Bio-Rad). Las siguientes citoquinas fueron ensayadas: IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-9, IL-10, HGF, M-CSF, MIF, SCF, PDGF, Rantes, VEGF, Eotaxin, bFGF, IP-10, IFNγ, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitomonocitos (GM-CSF), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1β/CCl4), MIP-1α y TNF-α.
- 50
- En resumen, se incubaron 250 µl de CM no diluido con perlas acopladas al anticuerpo. Los complejos fueron lavados, luego incubados con anticuerpo para detección biotinilado y, finalmente, con estreptavidina-ficoeritrina antes de establecer los títulos de la concentración de citoquina. Se utilizó un rango de 1.95-40,000 pg/ml de

citoquinas recombinantes para establecer curvas estándar y para maximizar la sensibilidad del rango dinámico del ensayo. Los niveles de citoquinas fueron determinados utilizando un lector de arreglo multiplex de Luminex™ Instrumentation System. La concentración fue calculada utilizando el software provisto por el fabricante. Los resultados obtenidos se ilustran a continuación en las Tablas 2-8.

5

Tabla 2. Número de células recolectadas después de 24 horas

Células	Cantidad de Células después de 24 horas
HLSC Rodante 3p	$4,25 \pm 0,49 \times 10^6$
HLSC Rodante 10p	$2,3 \pm 2,1 \times 10^6$
HLSC Hip 10p	$1,82 \pm 0,74 \times 10^6$
HLSC Hip 3p	$1,04 \pm 0,88 \times 10^6$
HLSC Norm 10p	$2,56 \pm 0,79 \times 10^6$
HLSC Norm 3p	$1,70 \pm 0,18 \times 10^6$
Norm MSC 3p	$2,35 \pm 0,78 \times 10^6$

Tabla 3. Concentración de proteína de CM después de 24 horas en cultivo después de concentración con filtro Amicon.

CM derivado de:	Concentración de proteína de CM (mg/ml) \pm SD	Concentración de proteína de CM después de concentración con Amicon (mg/ml) \pm SD
HLSC Rodante 3p	$0,36 \pm 0,004$	$7,405 \pm 0,106$
HLSC Rodante 10p	$0,335 \pm 0,021$	$7,37 \pm 0,141$
HLSC Hip 10p	$0,315 \pm 0,021$	$7,68 \pm 0,396$
HLSC Hip 3p	$0,31 \pm 0,013$	$7,55 \pm 0,707$
HLSC Norm 10p	$0,29 \pm 0,012$	$7,18 \pm 0,490$
HLSC Norm 3p	$0,28 \pm 0,078$	$7,72 \pm 0,132$
Norm MSC 3p	$0,23 \pm 0,042$	$7,75 \pm 0,276$

10

Tabla 4. Concentración de citoquinas (pg/ml) determinada por Multiplex (Bioclarma) (pg/ml \pm SD)

Citoquina	Rodante HLSC	Rodante 3p HLSC	Rodante10p HLSC	Hip 10p HLSC	Hip 3p HLSC	Norm 10p HLSC	Norm 3p HLSC	Norm 3p MSC
IL1 β	22 \pm 0,14	34 \pm 13	30,8 \pm 19,8	83,4 \pm 32,5	17,1 \pm 9,9	51,8 \pm 35,9	7,5 \pm 2,6	
ILra	96 \pm 0,32	87 \pm 5	99,8 \pm 26,5	163,4 \pm 31,9	86,1 \pm 7,9	91,7 \pm 32,6	596 \pm 404	
IL-2	0	0	0	0	0	0	0	
IL-4	2,6 \pm 0,02	2,8 \pm 0,05	2,9 \pm 1,1	4,8 \pm 0,9	2,4 \pm 0,3	2,4 \pm 1,3	2 \pm 1,4	
IL-5	0	0	0	0	0	0	0	
IL-6	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000
IL-7	0	4,4 \pm 2,5	8,4 \pm 2,4	24,1 \pm 7,9	7,4 \pm 3,7	18,5 \pm 9	7,6 \pm 1,6	
IL-8	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000
IL-9	52 \pm 0,8	42 \pm 3,6	32,7 \pm 12,4	41,9 \pm 15,2	24,6 \pm 7,7	26,1 \pm 4,8	27,9 \pm 3,0	
IL-10	32 \pm 3,9	33 \pm 5,5	32,9 \pm 0,1	36 \pm 4,2	28,5 \pm 3,7	31,3 \pm 1,3	35,8 \pm 7,9	
IL-12	59,1 \pm 11	52,8 \pm 11,6	56,7 \pm 8,7	74 \pm 6,6	56 \pm 8,1	41,1 \pm 17	36,6 \pm 13	
IL-13	9,2 \pm 2,2	7,7 \pm 0,8	5,6 \pm 2,1	7,8 \pm 3,4	4,4 \pm 2,0	2,2 \pm 1	4,9 \pm 1,3	
IL-15	93,3 \pm 9,8	87,1 \pm 8,3	94,6 \pm 5,6	95,9 \pm 13,4	93,9 \pm 10,7	81,8 \pm 9,7	64,5 \pm 22	
IL-17	0	0	0	0	0	0	0	
Eotaxina	81,3 \pm 19	359 \pm 227	2350 \pm 532	2748 \pm 76	1932 \pm 133	2417 \pm 453	21 \pm 17	
bFGF	49,8 \pm 3,9	79 \pm 14	30,1 \pm 5,6	23,5 \pm 2,8	44 \pm 59	22,1 \pm 26	6,7 \pm 9,2	
G-CSF	1150 \pm 149	1714 \pm 183	1371 \pm 1670	16275 \pm 8389	490 \pm 468	2188 \pm 921	359,3 \pm 212	
GM-CSF	47 \pm 0,8	37,4 \pm 5,6	49,5 \pm 2,4	59 \pm 51	38,8 \pm 3,8	60,4 \pm 21	65 \pm 65	

Citoquina		Rodante HLSC	Rodante10p HLSC	Hip 10p HLSC	Hip 3p HLSC	Norm 10p HLSC	Norm 3p HLSC	Norm 3p MSC
	IFN γ	156 \pm 1,6	168 \pm 10,1	171 \pm 49,8	236 \pm 27	147 \pm 14,5	176,1 \pm 44	174,5 \pm 38
	IP-10	0	54 \pm 77	30 \pm 42	61 \pm 86	14,5 \pm 25	283,5 \pm 132	28043,3 \pm 13513
	MCP-1	?	?	5622 \pm 2131	2999 \pm 494	4614 \pm 872	5647,9 \pm 2821	1410,5 \pm 767
	MIP-1 α	3,6 \pm 1,4	2,1 \pm 0,4	2,6 \pm 0,2	2,8 \pm 2,3	2,1 \pm 0,5	5,8 \pm 0,5	12,5 \pm 1,1
	MIP-1 β	0	0	0	0	0	0	0
	bbPDGF	0	0	0	0	0	0	0
	Rantes	109 \pm 28	328 \pm 227	279 \pm 210	909 \pm 566	576 \pm 522	118 \pm 24	11353 \pm 9310
	TNF α	22 \pm 2	24 \pm 4	29 \pm 4	40,5 \pm 7,7	22 \pm 2,5	24,6 \pm 6,7	30,2 \pm 5,3
	VEGF	33817 \pm 6318	24814 \pm 1567	22591 \pm 7330	32286 \pm 4297	14830 \pm 3860	16664 \pm 10951	16485 \pm 3722
	HGF	12238 \pm 1109	6674 \pm 2872	20901 \pm 1033	15508 \pm 1159	20642 \pm 3543	15853 \pm 4380	340 \pm 145
	M-CSF	555 \pm 39	256 \pm 26	496 \pm 177	538 \pm 299	649 \pm 628	548 \pm 33	173 \pm 65
	MIF	35047 \pm 4014	45045 \pm 1835	30773 \pm 9632	24216 \pm 11108	24719 \pm 14645	17956 \pm 4115	10512 \pm 1367
	SCF	119 \pm 10	119 \pm 64	209 \pm 32	144 \pm 31	265 \pm 216	211 \pm 79	15,4 \pm 3,6

ES 2 556 630 T3

Tabla 5. Rango de concentración en pg/ml (o ng/ml cuando se indique) determinado por multiplex de todo el CM producido por HLSCs y MSCs en pasaje 3 (bioclarma)

	HLSC	MSC
IL1 β	15,9-87,7	4,9-10,1
ILra	59,1-124,3	192-1000
IL-2	0	0
IL-4	0-3,7	0-3,4
IL-5	0	0
IL-6	>40000	>40000
IL-7	6,7-27,9	6-9,2
IL-8	>35000	>35000
IL-9	21,3-30,9	19,8-30,9
IL-10	12,9-32,6	15-43,7
IL-12	20,9-58,1	21,9-49,6
IL-13	0-3,2	0-6,2
IL-15	57-91,4	25-109
IL-17	0	0
Eotaxina	505-2870	10-38
bFGF	22-6055	0
G-CSF	1267-3109	11-571
GM-CSF	19,8-81,4	0-130
IFN γ	97-220	107-213
IP-10	152-416	0,9-41,6 (ng/ml)
MCP-1	1658-8500	600-2296
MIP-1 α	5,3-13	11,4-90
MIP-1 β	4,4-6,2	0-1000
bbPDGF	0	0
Rantes	94-142	124-20700
TNF α	17,9-31,3	24,9-35,5
VEGF	34,9-91 (ng/ml)	25,9-65,9 (ng/ml)
HGF	11,5-20,2 (ng/ml)	195-485
M-CSF	515-1072	91-238

ES 2 556 630 T3

	HLSC	MSC
MIF	9114-22100	8280-11900
SCF	128-290	9,9-19

Tabla 6. Concentración de citoquinas (pg/ml) determinado por RayBio® Human ELISA

Citoquina	Rodante 3p HLSC	Rodante 10p HLSC	Hipóxico1 0p HLSC	Hipóxico3 p HLSC	Normóxico 10p HLSC	Normóxico 3p HLSC	Normóxico 3p MSC
VEGF	154572 ± 3903	121884 ± 50131	153456 ± 3479	132132 ± 297	118708 ± 16848	118936 ± 56365	157896 ± 4811
HGF	33822 ± 823	24312 ± 3971	90540 ± 23215	49050 ± 9631	88488 ± 9267	51716 ± 12211	0
MCP1	± 383 698	6397 ± 126	5966 ± 9	5635 ± 38	5823 ± 319	5680 ± 189	5497 ± 465
MSP1	20,4 ± 14,4	6,4 ± 4,5	5,4 ± 4,2	0	39,4 ± 1,4	34,4 ± 28	0
IL6	20604 ± 453	27694 ± 3493	28744 ± 2008	33319 ± 1732	27264 ± 10578	37971 ± 4381	30389 ± 3444
IL8	180432 ± 7682	183909 ± 10799	191568 ± 3311	189114 ± 803	203349 ± 13125	206652 ± 14639	227796 ± 12760

Tabla 7. Rango de concentración determinado por ELISA.

Citoquina	HLSC	MSC
VEGF	63-175(ng/ml)	153-163(ng/ml)
HGF	39,5-64(ng/ml)	0
IL-6	33,6-42,3(ng/ml)	26,9-33,8(ng/ml)
IL-8	192-221 (ng/ml)	215-240(ng/ml)
MCP1	5491-5869 (pg/ml)	5032-5962 (pg/ml)
MSP1	6,4-62,4 (pg/ml)	0

5

Tabla 8. Rango de concentración de citoquinas seleccionadas determinado por múltiplex y ELISA (ND: no determinado)

Citoquina	HLSC	MSC	HLSC	MSC
VEGF	34,9-91 (ng/ml)	25,9-65,9 (ng/ml)	63-175 (ng/ml)	153-163 (ng/ml)
HGF	11,5-20,2 (ng/ml)	195-485 (pg/ml)	39,5-64 (ng/ml)	0
IL-6	>40 ng/ml	>40 ng/ml	33,6-42,3 (ng/ml)	26,9-33,8 (ng/ml)
IL-8	>35 ng/ml	>35ng/ml	192-221 (ng/ml)	215-240 (ng/ml)

ES 2 556 630 T3

Citoquina	HLSC	MSC	HLSC	MSC
MCP1	1658-8500 (pg/ml)	600-2296 (pg/ml)	5491-5869 (pg/ml)	5032-5962 (pg/ml)
MSP1	ND	ND	6,4-62,4 (pg/ml)	0

Imunoprecipitación de MSP-1 a partir de medio condicionado con HLSC y transferencia Western

El MSP-1 en sobrenadantes de cultivo de HLSC fue determinado por inmunoprecipitación y transferencia Western. Se centrifugaron 15 mL de sobrenadante de cultivo después de 24 horas de cultivo durante 70 minutos a 4000 x g a 4°C, se concentró sobre un ultrafiltro Amicon 3kD hasta 250 µL. Para la precipitación de la proteína, se agregó 1 ml de etanol puro frío (-20°C) a 250 µl de sobrenadante concentrado y se incubó a -80°C durante la noche. Las proteínas precipitadas fueron recolectadas después de centrifugación a 1,200 g y se sometieron a lisis con 500 l de regulador RIPA. La inmunoprecipitación se llevó a cabo durante 18 horas utilizando un anticuerpo anti-MSP (sistema R&D) entrecruzada a proteína A-Sefarosa. Para SDS-PAGE, las pellas fueron suspendidas en 40 µl de 2-beta-mercaptoetanol y se calentaron a 100°C. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en gel de acrilamida al 8%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de 1 hora de bloqueo con leche no grasa seca al 5% en solución salina regulada con Tris que contenía 0.05% de Tween 20, la membrana fue incubada durante la noche con 2 µg/ml de anticuerpo MSP antihumano a 4°C y, después de lavar tres veces, se incubó 1 hora a temperatura ambiente con IgG anti ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (BioRad). La membrana fue revelada con un reactivo de quimioluminiscencia y analizada con chemidoc.

Los resultados se ilustran en la Figura 9, mostrando inmunoprecipitación de MSP a partir de medio condicionado de HLSCs en tres pasajes diferentes (1, 2, 5). Las bandas de 85 kDa representan MSP monomérico (pro-MSP), y las bandas de 55 kDa la cadena α de MSP dimérico (activo).

Ejemplo 5 - análisis de la composición de CM por arreglo de anticuerpo basado en marcación con Biotina Raybio

Los niveles de expresión de 507 proteínas objetivo humanas derivadas de HLSC y MSC CM. fueron detectados simultáneamente. Los CM fueron recolectados después de 48 horas de cultivo de 1×10^6 células en presencia de αMEM suplementada con 0.2% de FCS como se describió en el protocolo de arreglo de proteínas. El panel de moléculas incluía citoquinas, quimioquinas, adipokuina, factores de crecimiento, factores angiogénicos, proteasas, receptores solubles, moléculas solubles de adhesión, y otras proteínas en el sobrenadante de cultivo celular.

25 Material y métodos

Preparación de CM. Para preparar CM de HLSCs y MSC, se sembraron células en placas de cultivo de tejidos de 100 mm a una densidad de 1×10^6 células por placa. Las células fueron entonces cultivadas con medio de cultivo completo durante 24-48 horas. Después de eso, el medio fue reemplazado con medio bajo en suero (0.2% de FCS) y luego las células fueron cultivadas durante 48 horas de nuevo una vez más. Los CM fueron recolectados y centrifugados a 1000 g. Los CM de ambos tipos de células fueron dializados antes de la etapa de marcación con biotina. A través de un proceso simple, la amina primaria de las proteínas en las muestras fue biotinilada, seguida por diálisis para eliminar biotina libre. A partir de aquí, las muestras recién biotiniladas fueron agregadas sobre la membrana de arreglo e incubadas a temperatura ambiente. Después de incubación con HRP-estreptavidina, las señales fueron visualizadas por quimioluminiscencia. En esta disposición, se utilizó un control interno para monitorizar el proceso completo incluyendo la marcación con biotina-y el arreglo de anticuerpos. Los resultados fueron analizados con la RayBio Analysis Tool el cual es un programa específicamente diseñado para análisis de arreglo de anticuerpos basados en marcación con biotina RayBio. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre esta disposición en el Manual de Usuario de Arreglo I de Anticuerpos Humanos Basado en Marcación con Biotina RayBio®.

40 La figura 10 muestra el mapa de arreglo humano basado en marcación con Biotina RayBio y de sobrenadante (B), derivado de HLSCs (A) y MSC (B).

Los resultados completos del ensayo de arreglo de anticuerpos basado en marcación con biotina RayBio se resumen a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9

Proteínas	HLSC (análisis densitométrico)	relación HLSC/MSC
6Cquina	6,11	2,06
Activina A	6,54	2,16
Activina B	5,42	2,18
Activina C	7,27	2,56
Activina RIA / ALK-2	5,63	2,18
Activina RIB / ALK-4	5,27	1,95
Activina RII A/B	5,18	1,76
Activina RIIA	5,28	1,71
Adiponectina / Acrp30	5,57	1,48
AgRP	5,67	1,59
ALCAM	10,30	2,62
Angiogenina	9,40	2,38
Angiopoyetina-1	6,45	1,45
Angiopoyetina-2	5,92	1,48
Angiopoyetina-4	5,62	1,40
Tipo Angiopoyetina 1	5,76	1,36
Tipo Angiopoyetina 2	6,51	1,51
Factor Tipo Angiopoyetina	6,26	1,53
Angiostatina	6,90	1,66
APJ	6,00	1,40
AR (Amfiregul ira)	6,34	1,47
APRIL	7,03	1,47
Artemina	7,30	1,52
Axl	8,83	1,70

B7-1 / CD80	9,33	1,66
BAFF R / TNFRSF13C	9,12	1,48
BCMA / TNFRSF17	4,68	1,79
BD-1	4,64	1,77
BDNF	4,71	1,68
beta-Catenina	4,23	1,61
beta-Defensina 2	4,31	1,63
beta-NGF	4,38	1,66
BIK	4,56	1,73
BLC / BCA-1 / CXCL13	4,36	1,56
BMP-2	4,25	1,50
BMP-3	4,43	1,43
BMP-3b / GDF-10	4,34	1,43
BMP-4	4,60	1,41
BMP-5	4,46	1,40
BMP-6	4,47	1,34
BMP-7	4,44	1,31
BMP-8	4,87	1,31
BMP-15	4,74	1,33
BMPR-IA / ALK-3	5,30	1,49
BMPR-IB / ALK-6	6,35	1,69
BMPR-II	5,76	1,59
BTC	5,71	1,61
Cardiotrofin-1 / CT -1	5,89	1,61
CCL14 / HCC-1 / HCC-3	5,92	1,50
CCL28 / VIC	6,67	1,57
CCR1	7,76	1,42
CCR2	9,00	1,63
CCR3	8,21	1,49
CCR4	8,04	3,02
CCR5	5,02	1,97
CCR6	5,59	2,08
CCR7	5,52	1,89
CCR8	4,43	1,51
CCR9	4,10	1,48
CD14	4,21	1,55
CD27 / TNFRSF7	3,94	1,50
CD30 / TNFRSF8	3,70	1,38
Ligando CD30 / TNFSF8	4,28	1,40
CD40 / TNFRSF5	4,40	1,56
Ligando CD40 / TNFSF5 / CD154	4,14	1,38
CD 163	3,69	1,33
Cerberus 1	3,86	1,29
Chem R23	3,59	1,22
Tipo-Cordina 1	3,62	1,14
Tipo-Cordina 2	3,74	1,16
Csk	5,97	1,51
CLC	4,23	1,20
CNTF	4,73	1,35
CNTF R alfa	4,51	1,29
Factor de Coagulación III / Factor de Tejido	4,70	1,38
CRIM-1	8,98	2,55
Cripto-1	5,26	1,50
CRTH-2	5,11	1,44

Críptico	5,65	1,59
CTACK / CCL27	6,33	1,66
CTGF / CCN2	6,97	1,77
CTLA-4 / CD152	10,38	2,31
CV-2 / Sin intersección venosa 2	7,80	1,61
CXCL14 / BRAK	6,49	2,03
CXCL16	4,64	1,67
CXCR1 / IL-8 RA	4,56	1,61
CXCR2 / IL-8 RB	4,41	1,55
CXCR3	4,01	1,56
CXCR4 (fusina)	3,85	1,44
CXCR5 / BLR-1	3,84	1,41
CXCR6	3,92	1,40
D6	3,77	1,38
DAN	4,02	1,36
DANCE	3,78	1,38
DcR3 / TNFRSF6B	3,62	1,28
Decorina	9,12	2,86
Dkk-1	4,35	1,36
Dkk-3	3,41	1,12
Dkk-4	3,50	1,09
DR3 / TNFRSF25	3,53	1,11
DR6 / TNFRSF21	4,20	1,25
Dkk	9,06	2,17
EDA-A2	237,46	2,94
EDAR	6,79	1,88
EDG-1	4,43	1,25
EGF	4,63	1,30
EGF R / ErbB1	4,69	1,31
EG-VEGF / PK1	5,03	1,34
EMAP-II	6,15	1,75
ENA-78	6,28	1,74
Endocan	8,34	2,14
Endoglina / CD105	8,97	2,02
Endostatina	8,59	1,53
EN-RAGE	5,08	2,04
Eotaxina / CCL11	4,52	1,77
Eotaxina-2 / MIP1F-2	4,27	1,47
Eotaxina-3 / CCL26	4,24	1,52
Epirregulina	3,87	1,43
ErbB2	3,90	1,43
ErbB3	4,17	1,56
ErbB4	3,82	1,34
Eritropoyetina	4,16	1,26
E-Selectina	3,79	1,33
Endotelina	14,95	3,86
FADD	3,77	1,29
FAM3B	6,05	1,76
Fas / TNFRSF6	3,73	1,21
Ligando Fas	3,61	1,11
FGF Básico	3,67	1,08
FGF-BP	3,78	1,16
FGF R3	4,05	1,19
FGF R4	4,72	1,29

FGF-R5	17,21	2,92
FGF-4	4,68	1,30
FGF-5	4,05	1,13
FGF-6	4,27	1,16
FGF-7 / KGF	4,93	1,22
FGF-8	4,89	1,37
FGF-9	5,40	1,49
FGF-10 / KGF-2	5,74	1,56
FGF-11	6,19	1,66
FGF-12	8,68	1,98
FGF-13 1B	7,74	1,60
FGF-16	5,31	1,77
FGF-17	3,91	1,37
FGF-18	4,00	1,44
FGF-19	3,88	1,37
FGF-20	3,67	1,33
FGF-21	3,88	1,42
FGF-23	3,90	1,22
FLRG	3,84	1,34
Ligando Flt-3	3,69	1,32
Folistatina	5,33	1,58
tipo-Folistatina 1	5,81	1,15
Fractalquina	3,94	1,28
Rizado-1	3,88	1,23
Rizado-3	3,80	1,18
Rizado-4	3,78	1,21
Rizado-5	4,52	1,36
Rizado-6	5,46	1,62
Rizado-7	4,17	1,23
Galectina-3	5,86	1,56
GASP-1 / WFIKKNRP	5,03	1,44
GASP-2 / WFIKKN	4,39	1,20
GCP-2 / CXCL6	4,69	1,26
GCSF	5,57	1,52
G-CSF R / CD 114	4,68	1,26
GDF1	5,00	1,28
GDF3	6,38	1,77
GDF5	6,55	1,74
GDF8	6,08	1,58
GDF9	10,31	2,26
GDF11	8,84	1,70
GDF-15	4,64	1,34
GDNF	3,87	1,27
GFR alfa-1	3,67	1,25
GFR alfa-2	3,92	1,21
GFR alfa-3	4,09	1,39
GFR alfa-4	4,01	1,45
GITR / TNFRF18	3,80	1,33
Ligando GITR / TNFSF18	4,04	1,44
Glucagón	3,89	1,31
Glut1	3,61	1,23
Glut2	3,73	1,22
Glut3	3,87	1,25
Glut5	4,00	1,29

Glipicano 3	34,34	2,73
Glipicano 5	5,27	1,48
GM-CSF	4,20	1,24
GM-CSF R alfa	4,37	1,28
Granzima A	4,92	1,41
GREMLIN	8,49	2,19
GRO	21,75	3,69
GRO-a	4,90	1,32
Hormona del Crecimiento (GH)	5,17	1,34
Hormona del Crecimiento R (GHR)	5,42	1,36
HB-EGF	5,37	1,46
HCC-4 / CCL16	4,91	1,33
HCR / CRAM-A/B	5,09	1,39
Hepasocina	6,08	1,61
Heregulina / NDF / GGF / Neuregulina	6,08	1,45
HGF	15,29	3,38
HGFR	6,53	1,31
HRG-alfa	4,47	1,40
HRG-beta 1	4,09	1,25
HVEM / TNFRSF14	4,06	1,24
I-309	3,67	1,25
ICAM-1	3,49	1,25
ICAM-2	3,28	1,16
ICAM-3 (CD50)	3,77	1,15
ICAM-5	3,49	1,24
IFN-alfa / beta R1	3,50	1,19
IFN-alfa / beta R2	3,52	1,18
IFN-beta	3,66	1,19
IFN-gamma	3,67	1,17
IFN-gamma R1	3,89	1,22
IGFBP-1	4,95	1,39
IGFBP-2	13,69	2,11
IGFBP-3	6,11	1,66
IGFBP-4	5,90	1,64
IGFBP-6	27,78	4,59
IGFBP- μ 1 / IGFBP-7	333,01	2,75
IGF-I	13,74	3,15
IGF-I SR	5,23	1,35
IGF-II	4,76	1,26
IGF-II R	6,57	1,69
IL-1 alfa	9,12	2,26
IL-1 beta	4,87	1,30
IL-1 F5 / FIL1delta	5,25	1,42
IL-1 F6 / FIL1 épsilon	7,50	1,79
IL-1 F7 / FIL1 zeta	5,73	1,37
IL-1 F8 / FIL1 eta	5,91	1,25
IL-1 F9 / IL-1 H1	6,37	1,24
IL-1 F10 / IL-1HY2	4,26	1,19
IL-1 R3 / IL-1 R AcP	4,11	1,25
IL-1 R4 /ST2	4,29	1,33
IL-1 R6 / IL-1 Rrp2	3,69	1,21
IL-1 R8	3,32	1,13
IL-1 R9	3,32	1,07
IL-1 ra	3,36	1,11

IL-1 sRI	3,29	1,09
IL-1 sRII	3,25	1,03
IL-2	3,53	1,12
IL-2 R alfa	4,82	1,43
IL-2 R beta /CD122	3,88	1,15
IL-2 R gamma	4,07	1,17
IL-3	4,34	1,26
IL-3 R alfa	4,64	1,24
IL-4	4,72	1,25
IL-4 R	5,53	1,11
IL-5	6,31	1,60
IL-5 R alfa	16,15	2,21
IL-6	35,23	1,46
IL-6 R	6,41	1,51
IL-7	6,01	1,51
IL-7 R alfa	6,10	1,30
IL-8	38,69	1,37
IL-9	6,41	1,47
IL-10	5,27	1,39
IL-10 R alfa	5,42	1,36
IL-10 R beta	5,54	1,38
IL-11	5,71	1,20
IL-12 p40	6,30	1,17
IL-12 p70	4,14	1,22
IL-12 R beta 1	3,44	1,08
IL-12 R beta 2	8,52	1,70
IL-13	3,81	1,11
IL-13 R alfa 1	4,12	1,14
IL-13 R alfa 2	3,59	1,03
IL-15	4,07	1,19
IL-15 R alfa	4,37	1,19
IL-16	4,16	1,17
IL-17	4,13	1,18
IL-17B	4,59	1,17
IL-17B R	4,89	1,16
IL-17C	5,24	1,23
IL-17D	5,18	1,24
IL-17E	5,74	1,41
IL-17F	5,96	1,40
IL-17R	5,29	1,35
IL-17RC	9,68	2,10
IL-17RD	6,54	1,60
IL-18 BPa	7,23	1,50
IL-18 R alfa /IL-1 R5	5,76	1,44
IL-18 R beta /AcPL	5,84	1,44
IL-19	6,69	1,61
IL-20	6,79	1,58
IL - 20 R alfa	15,60	3,16
IL-20 R beta	7,48	1,34
IL-21	3,14	0,98
IL-21 R	3,18	0,95
IL-22	3,34	0,91
IL-22 BP	3,22	0,93
IL-22 R	3,51	0,97

IL-23	4,14	1,07
IL-23 R	3,75	1,06
IL-24	4,14	1,07
IL-26	4,28	1,17
IL-27	5,71	1,42
IL-28A	9,23	2,20
IL-29	5,31	1,18
IL-31	4,89	1,23
IL-31 RA	5,80	1,26
Inhibina A	5,19	1,31
Inhibina B	5,93	1,37
Insulina	5,29	1,25
Insulina R	5,13	1,22
Insulisina / IDE	7,60	1,78
IP-10	5,86	1,36
I-TAC / CXCL11	5,83	1,40
Quinostatina / Quininógeno	7,18	1,75
Kremen-1	6,35	1,54
Kremen-2	13,18	3,01
Lck	7,05	1,42
TGF-beta bp1 Latente	28,04	4,90
LBP	4,34	1,23
LECT2	3,38	1,00
Zurdo - A	3,38	1,01
Leptina R	3,66	0,98
Leptina (OB)	3,52	1,03
LFA-1 alfa	3,75	1,05
LIF	4,12	1,09
LIF R alfa	4,43	1,02
LIGHT / TNFSF14	4,34	1,09
Lipocalina-1	4,58	1,14
LRP-1	9,89	1,81
LRP-6	29,80	2,28
L-Selectina (CD62L)	5,94	1,51
Luciferasa	5,29	1,25
Linfotactina / XCL1	8,21	1,50
Linfotoxina beta / TNFSF3	5,97	1,39
Linfotoxina beta R / TNFRSF3	5,61	1,30
MAC-1	5,54	1,20
MCP-1	22,87	1,84
MCP-2	5,83	1,37
MCP-3	6,96	1,65
MCP-4 / CCL13	6,09	1,48
M-CSF	6,90	1,65
M-CSF R	7,02	1,62
MDC	8,30	1,64
MFG-E8	8,93	1,62
MFRP	3,43	0,98
MIF	3,73	1,02
MIG	3,67	1,03
MIP-1a	5,17	1,42
MIP-1b	3,49	0,98
MIP-1d	3,45	0,93
MIP-2	11,45	2,56

MIP-3 alfa	4,64	1,33
MIP-3 beta	3,68	1,03
MMP-1	5,06	1,20
MMP-2	4,30	1,14
MMP-3	4,08	0,75
MMP-7	4,49	0,93
MMP-8	4,80	1,15
MMP-9	4,25	0,98
MMP-10	6,05	1,44
MMP-11 /Estromelisina	5,23	1,22
MMP-12	5,12	1,33
MMP-13	5,75	1,40
MMP-14	7,60	1,79
MMP-15	5,71	1,39
MMP-16 / MT3-MMP	7,86	1,80
MMP-19	9,10	1,70
MMP-20	8,06	1,68
MMP-24 / MT5-MMP	6,44	1,48
MMP-25 / MT6-MMP	6,20	1,36
Almizcle	6,62	1,41
MSP Cadena alfa	6,85	1,40
MSP cadena-beta	16,76	2,65
NAP-2	9,61	1,71
NCAM-1 / CD56	5,11	1,24
Neuritina	4,04	1,06
NeuroD1	3,86	1,07
Neuropilina-2	3,58	1,01
Neurturina	3,58	0,94
NGF R	3,63	1,03
NOV / CCN3	3,58	1,13
Isoforma NRG1 GGF2	3,60	1,10
NRG1-alfa / HRG1-alfa	3,58	1,03
NRG1-beta1 / HRG1-beta1	4,12	1,20
NRG2	4,09	1,02
NRG3	4,45	1,11
NT-3	3,73	0,96
NT-4	4,10	0,85
Orexina A	4,34	0,65
Orexina B	4,60	0,55
OSM	4,89	0,69
Osteoactivina / GPNMB	5,20	0,98
Osteocrina	8,16	1,73
Osteoprotegerina / TNFRSF11B	265,56	5,65
Ligando OX40 / TNFSF4	11,27	2,49
PARC / CCL18	5,35	1,26
PD-ECGF	5,31	1,20
PDGF R alfa	5,73	1,32
PDGF R beta	6,80	1,49
PDGF-AA	7,08	1,54
PDGF-AB	6,91	1,52
PDGF-BB	7,03	1,51
PDGF-C	7,12	1,43
PDGF-D	7,08	1,31
PECAM-1 /CD31	4,21	1,18

Pentraxina 3 / TSG-14	11,67	2,24
Persefin	4,49	1,20
PF4 / CXCL4	3,88	1,10
PIGF	3,69	1,10
PLUNC	3,72	1,17
Pref-1	3,88	1,20
Progranulina	4,96	1,52
Prolactina	4,16	1,26
P-selectina	3,86	1,10
RAGE	3,93	1,06
RANK / TNFRSF11A	4,43	1,17
RANTES	3,86	1,05
RELM beta	3,74	0,98
RELT / TNFRSF19L	4,28	0,93
ROBO4	4,21	1,08
S100 A8/A9	4,84	1,18
S100A10	4,89	1,19
SAA	5,14	1,23
SCF	7,37	1,53
SCF R / CD117	5,51	1,32
SDF-1 / CXCL12	5,32	1,18
sFRP-1	6,65	1,47
sFRP-3	6,42	1,35
sFRP-4	69,46	5,43
sgp130	15,48	2,93
SIGIRR	7,82	1,55
Siglec-5/CD170	7,13	1,47
Siglec-9	7,91	1,63
SLPI	7,96	1,29
Smad 1	4,78	1,23
Smad 4	10,65	2,26
Smad 5	4,59	1,15
Smad 7	4,59	1,22
Smad 8	3,92	1,09
SMDF / Isoforma NRG1	4,11	1,05
Soggy-1	3,92	1,14
Erizo sónico (Shh N-terminal)	3,77	1,10
SPARC	56,56	3,63
Spinesina	6,40	1,68
TACI / TNFRSF13B	4,40	1,10
Tarc	3,85	1,07
TCCR / WSX-1	3,80	1,00
TECK / CCL25	3,79	0,98
TFPI	5,18	1,22
TGF-alfa	4,28	1,09
TGF-beta 1	4,64	1,19
TGF-beta 2	4,85	1,22
TGF-beta 3	5,26	1,32
TGF-beta 5	5,28	1,29
TGF-beta RI / ALK-5	6,94	1,51
TGF-beta RII	5,43	1,30
TGF-beta RIIB	5,72	1,34
TGF-beta RIII	6,70	1,53
Trombopoyetina (TPO)	7,40	0,94

Trombospodina (TSP)	325,53	3,99
Trombospodina - 1	281,16	3,76
Trombospodina - 2	10,81	1,94
Trombospodina - 4	7,96	1,57
Timopoyetina	7,60	1,44
Tie-1	4,03	0,88
Tie-2	3,92	0,86
TIMP-1	137,73	1,08
TIMP-2	54,09	7,91
TIMP-3	7,21	1,73
TIMP-4	4,31	1,05
TL1A / TNFSF15	4,70	1,14
TLR1	4,81	1,21
TLR2	5,77	1,36
TLR3	4,47	1,06
TLR4	4,16	1,01
TMEFF1 / Tomoregulin-1	4,91	1,10
TMEFF2	4,66	1,16
TNF-alfa	5,07	1,26
TNF-beta	5,36	1,26
TNF RI / TNFRSF1A	8,08	1,77
TNF RII / TNFRSF1B	5,79	1,19
TRADD	5,70	1,26
TRAIL / TNFSF10	5,83	1,26
TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A	6,28	1,40
TRAIL R2 / DR5 / TNFRSF10B	6,57	1,36
TRAIL R3 / TNFRSF10C	6,98	1,44
TRAIL R4 / TNFRSF10D	8,02	1,38
TRANCE	9,17	1,53
TREM-1	4,77	0,95
TROY / TNFRSF19	5,21	1,04
TSG-6	5,72	1,10
TSLP	4,90	1,03
TWEAK / TNFSF12	5,00	1,03
TWEAK R / TNFRSF12	5,14	1,07
Ubiquitina+1	4,92	1,03
uPA	4,94	0,90
uPAR	5,41	1,11
Vasorin	6,12	1,27
VCAM-1 (CD106)	5,02	1,11
VE-Cadherina	5,20	1,18
VEGF	10,00	1,61
VEGF R2 (KDR)	5,73	1,25
VEGF R3	5,48	1,19
VEGF-B	5,24	1,15
VEGF-C	7,98	1,60
VEGF-D	6,11	1,18
VEGI / TNFSF15	6,03	1,20
WIF-1	6,07	1,21
WISP-1 / CCN4	6,68	1,30
XEDAR	7,81	1,46

Con base en una relación HLSC/MSK igual o superior a 2.5, se identificó un total de 25 proteínas como aquellas que son las que más probablemente proveen una contribución a la actividad del CM. Tales proteínas están resaltadas en la Tabla 9.

Ejemplo 6 - Comparación de los efectos de tratamientos con CM de HLSCs y HLSCs sobre el modelo FHF *in vivo*

5 Modelo *in vivo* de D-galactosamina/endotoxina de hepatitis letal tóxica aguda.

Los mecanismos subyacentes a la acción hepatotóxica de la galactosamina se presentan debido a una alta acumulación de derivados de UDP-galactosamina en el hígado, llevando a la eliminación del UTP hepático. Como resultado cesa la biosíntesis de macromoléculas (ARN, proteínas, glicoproteínas, glicógeno, etc.). Estas alteraciones llevan a un eventual daño celular y a muerte celular, los cuales en etapas posteriores de la reacción pueden ser identificados por el incremento de las enzimas del hígado en la sangre y por histología. Al mismo tiempo, la endotoxina indujo la producción de un factor de necrosis tumoral α (TNF- α) - que se desarrolló una apoptosis de hepatocitos masiva. Desarrollamos esto en un modelo *in vivo* en ratones SCID para estudiar la acción de HLSC en este sistema letal *in vivo*.

Métodos

15 Animales y protocolos experimentales. Se alojaron ratones SCID macho de 6 a 7 semanas de edad en instalaciones para animales con acceso libre a alimento y agua. A estos animales se aplicó una inyección intraperitoneal de 500 μ l de solución salina que contenía 0.125 μ g de LPS y 18 mg de GalN. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 30×10^6 de HLSC después de 2 horas de la inyección de D-GalN/LPS. Un segundo grupo de ratones SCID fue inoculado intraperitonealmente con 1 ml de sobrenadante de HLSC en solución salina al mismo tiempo, 30 minutos y 2 horas después de la inyección de LPS y GalN. Los ratones de control recibieron una inyección de una mezcla de LPS y GalN.

25 Producción de sobrenadante a partir de HLSC en el matraz T: Para la generación de CM a partir de HLSC (CM-HLSC), las células se dejaron crecer a 60% hasta 70% de confluencia (aproximadamente 2×10^6 de HLSC por matraz de 75 cm²), se lavaron exhaustivamente y se cultivaron en 10 mL de medio alfa-MEM libre de suero suplementado con 0.05% de albúmina de suero humana (producida por GMP). El medio condicionado fue recolectado 24 horas después y concentrado 25 veces utilizando unidades de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA) con un corte de 3-kDa.

Análisis histológico: La necrosis del hígado fue analizada a través de tinción con H&E, proliferación (tinción con PCNA) y TUNEL (células apoptóticas).

30 Transferencia Western: Se llevó a cabo Transferencia Western para la detección de BAX y BclXS/L. Los hígados fueron homogeneizados y sometidos a lisis a 4°C durante 1 hora en regulador de lisis (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8.3, Triton X-100 al 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 10 μ mol/L, leupeptina 10 μ mol/L, y aprotinina 100 U/ml) y se centrifugaron a 15,000 g. El contenido de proteína de los CM fue medido por el método de Bradford. Las alícuotas que contenían 200 μ g de proteína de hígados lisados fueron sometidas a electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras y electrotransferidas sobre filtros de membrana de nitrocelulosa. Las transferencias fueron bloqueadas con leche no grasa al 5% en Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7.5, NaCl 500 mmol/L más 0.1% de Tween (TBS-T). Las membranas fueron inmunotransferidas subsecuentemente durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios relevantes a la concentración apropiada. Después de lavados extensos con TBS-T, las transferencias fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos para el isotipo conjugados con peroxidasa, lavados con TBS-T, desarrollados con reactivos de detección de ECL durante 1 minuto, y expuestos a una película X-Omat. Se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti-BAX y anticuerpo policlonal anti-BclXS/L de Santa Cruz Biotechnology.

Resultados

45 Para establecer posibles efectos beneficiosos de HLSC sobre la letalidad de ratones que recibieron endotoxina (LPS) y GalN, se llevaron a cabo estudios de supervivencia utilizando 6 ratones. El % de supervivencia de los animales inyectados con 0.125 μ g de LPS y 18 mg de GalN y 30×10^6 HLSC fue de 75%. El % de supervivencia de los animales inyectados con 1 ml concentrado de sobrenadante de HLSC en solución salina al mismo tiempo, 30 minutos y 2 horas después de la inyección de LPS y 18 mg GalN fue de 70% (n=17). Los niveles en suero de alanina transaminasa (ALT) disminuyeron desde 273 U/L a 57 U/L y en suero de aspartato transaminasa (AST) disminuyeron de 1693 U/L a 291 U/L ambos después de 7 días de inyección de HLSC. Los niveles de AST disminuyeron desde 1693 U/L a 1000 U/L ambos después de 6 días de inyección de CM-HLSC.

El análisis histológico de secciones de hígado después de 7 días de inyección de HLSC mostró un índice disminuido de apoptosis y necrosis.

5 El análisis histológico de secciones de hígado después de 3 y 6 días de tratamiento con sobrenadante mostró un índice disminuido de apoptosis (TUNEL) y necrosis. Se observó una regeneración masiva de tejido. Estos hallazgos se correlacionan con un incremento del índice de proliferación de tejido (tinción con PCNA). Por transferencia western se demostró que hubo una sobreexpresión de la proteína proapoptótica BAX en animales tratados con GalN/LPS junto con una subregulación en el punto de tiempo diferente en ambos sobrenadantes concentrados. En el caso de la expresión de la proteína proapoptótica BclX/L se observó una sobreexpresión de esta proteína en animales tratados con el sobrenadante concentrado y una subregulación de la expresión en animales tratados con GalN/LPS solos.

Los resultados mencionados anteriormente se ilustran en las Figuras 11-13.

10 La figura 11a muestra la supervivencia de ratones en modelo letal LPS/GalN inyectados con HLSC (n=6).

La figura 11b muestra la supervivencia en ratones modelo letal LPS/GalN inyectado con HLSC concentrado (n=17).

La figura 12 muestra la tinción con H&E y PCNA de ratones SCID tratados GalN/LPS inyectados con CM concentrado a partir de HLSC purificadas de un matraz T después de 3 y 6 días de inducción del fallo hepático (GalN/LPS).

15 La figura 13 muestra los resultados del ensayo TUNEL para evaluar los hepatocitos apoptóticos. La presencia de la proteína proapoptótica BAX y la proteína antiapoptótica BclX fue evaluada por el análisis de transferencia Western.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir de un medio condicionado, que comprende las etapas de:
 - (i) cultivar hepatocitos maduros humanos derivados de hígado de adulto en un medio de cultivo celular hasta la muerte de hepatocitos maduros y selección de una población de células supervivientes que tienen morfología epitelioide;
 - (ii) expandir la población de células supervivientes que tienen morfología epitelioide cultivando en un medio de cultivo que contiene suero, que contiene glucosa suplementado con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano) y bFGF (factor de crecimiento fibroblastos básico) y que contiene sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas usuales necesarios para el crecimiento de células de mamíferos; y
 - (iii) separar las células del medio de cultivo celular.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los hepatocitos maduros son congelados en un medio de cultivo que contiene suero en la presencia de un agente crioprotector y luego descongelados antes del cultivo de acuerdo con la etapa (i).
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el medio de cultivo comprende alfa MEM suplementado con albúmina humana grado GMP.
4. Un medio condicionado obtenible por el cultivo de una línea de células progenitoras pluripotentes de hígado humano, caracterizado porque está libre de las células y caracterizado adicionalmente porque comprende una mezcla de al menos un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
5. La composición de medio condicionado de acuerdo con la reivindicación 4, la cual es obtenible por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva del medio condicionado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5.
7. Un composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una mezcla de al menos un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a una concentración que varía de 10 a 400 ng/ml.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la mezcla comprende adicionalmente proteína estimulante de macrófago (MSP) en una cantidad farmacéuticamente activa.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) está a una concentración que varía de 1 a 100 ng/ml, la interleucina 6 (IL-6) está a una concentración que varía de 10 a 200 ng/ml, la interleucina 8 (IL-8) está a una concentración igual a o superior a 35 ng/ml.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la proteína estimulante de macrófago (MSP) está a una concentración que varía de 1 a 100 pg/ml.
11. Una composición farmacéutica concentrada que consiste de la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 concentrada al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 20 veces, aún más preferiblemente al menos 25 veces.
12. Una composición farmacéutica diluida consistente de la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 diluida al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 20 veces, incluso más preferiblemente al menos 25 veces.
13. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 para uso en el tratamiento de lesión o fallo en un órgano.
14. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el órgano es hígado o riñón.
15. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, la cual se prepara como un medicamento adecuado para administrar una dosis de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que varía entre 0.01 a 1 mg/kg, una dosis de interleucina 6 (IL-6) que varía entre 0.01 a 1 mg/kg, una dosis de interleucina 8 (IL-8)

que varía entre 0.01 a 1 mg/kg y opcionalmente una dosis de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que varía entre 0.01 a 1 mg/kg.

Fig. 1

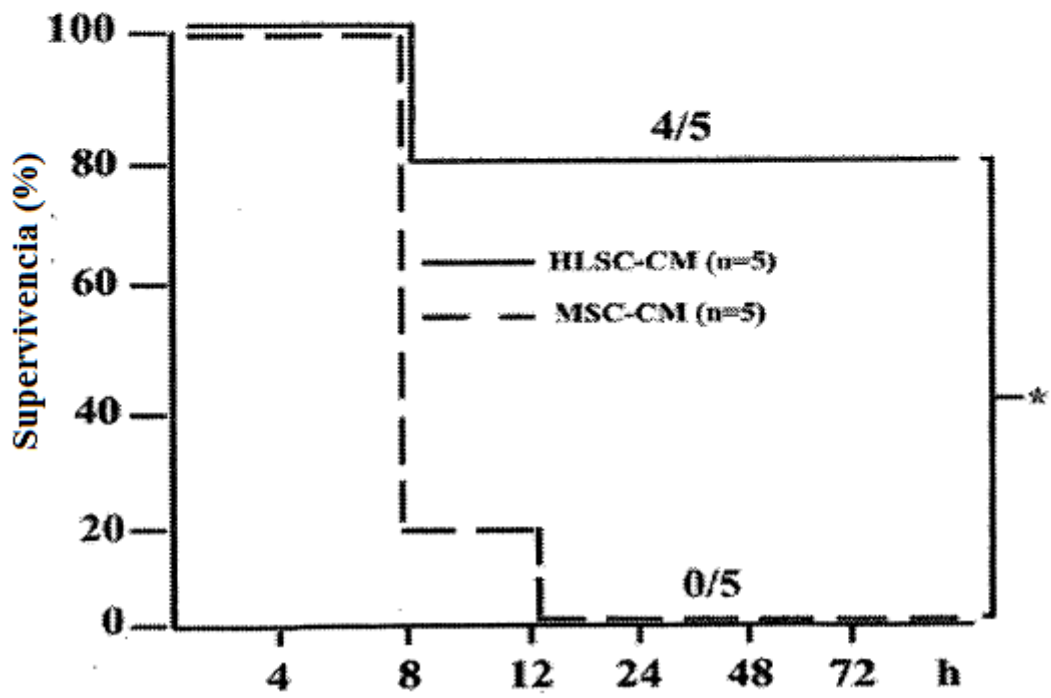


Fig. 2

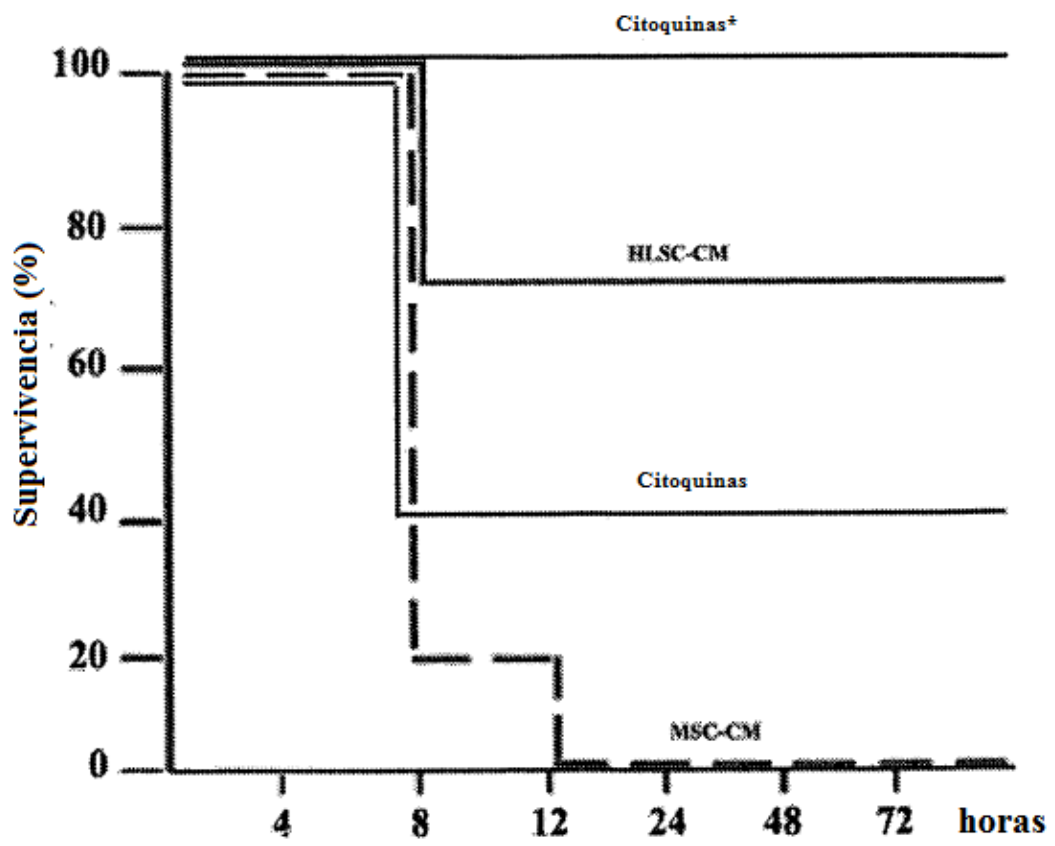


Fig. 3

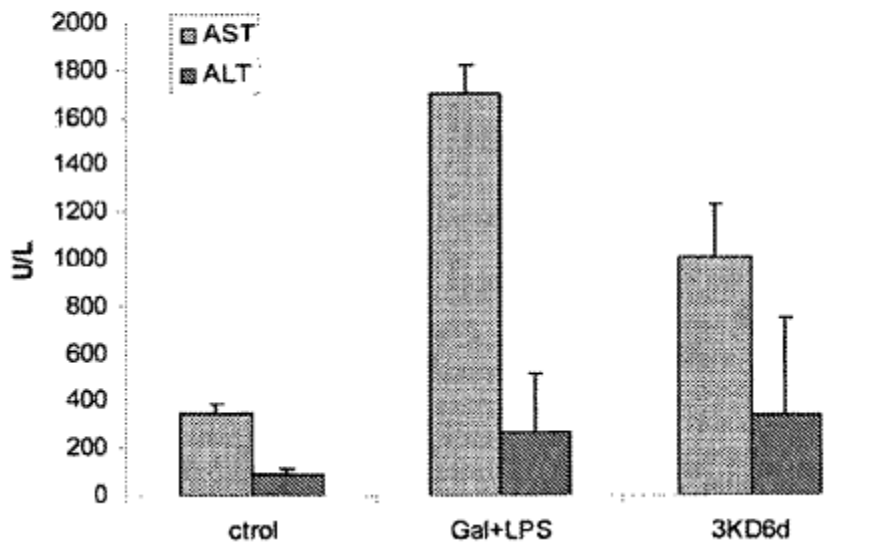


Fig. 4

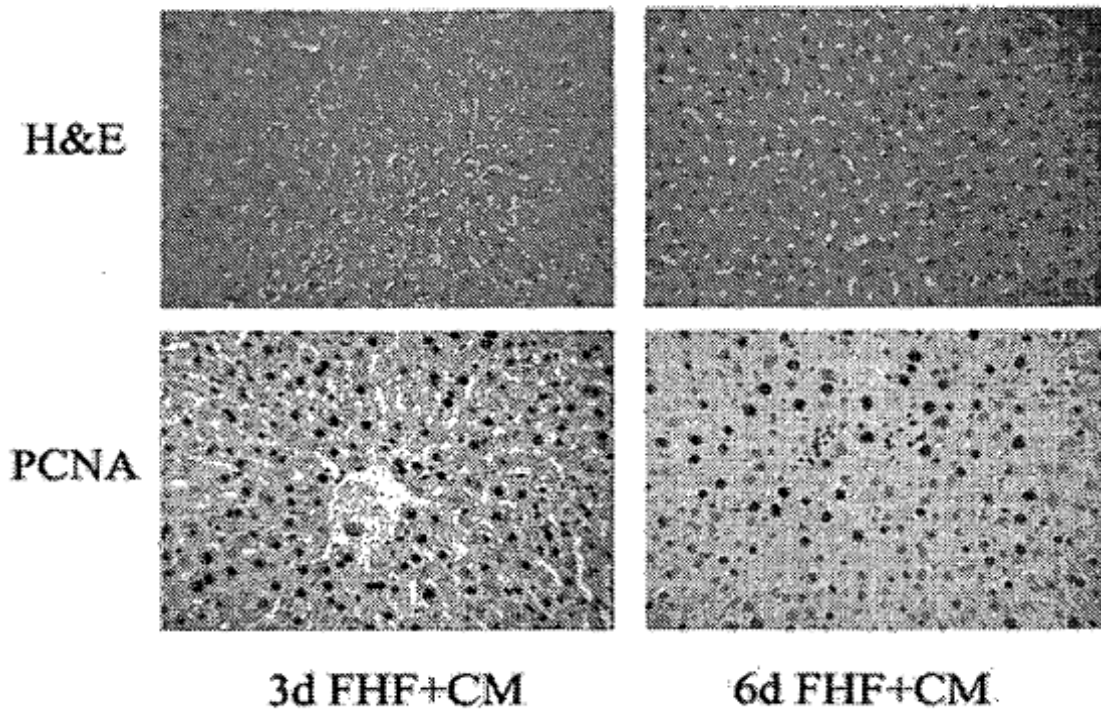


Fig. 5

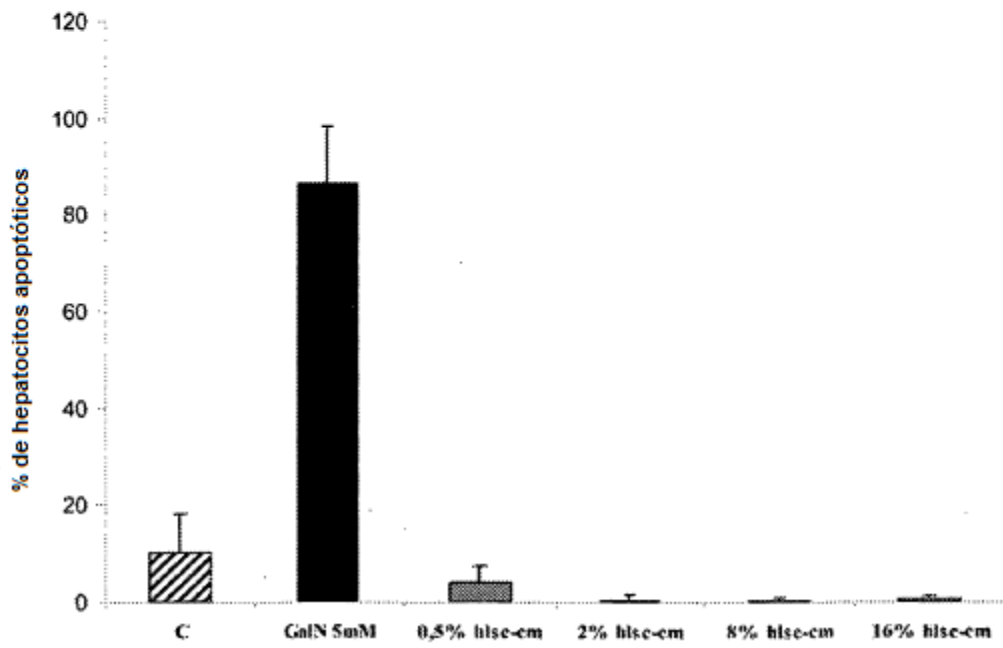


Fig. 6

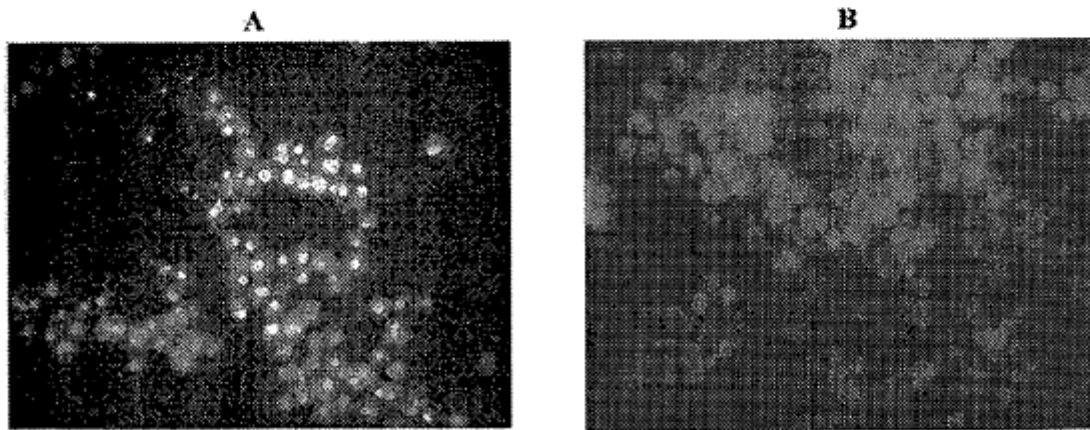


Fig. 7

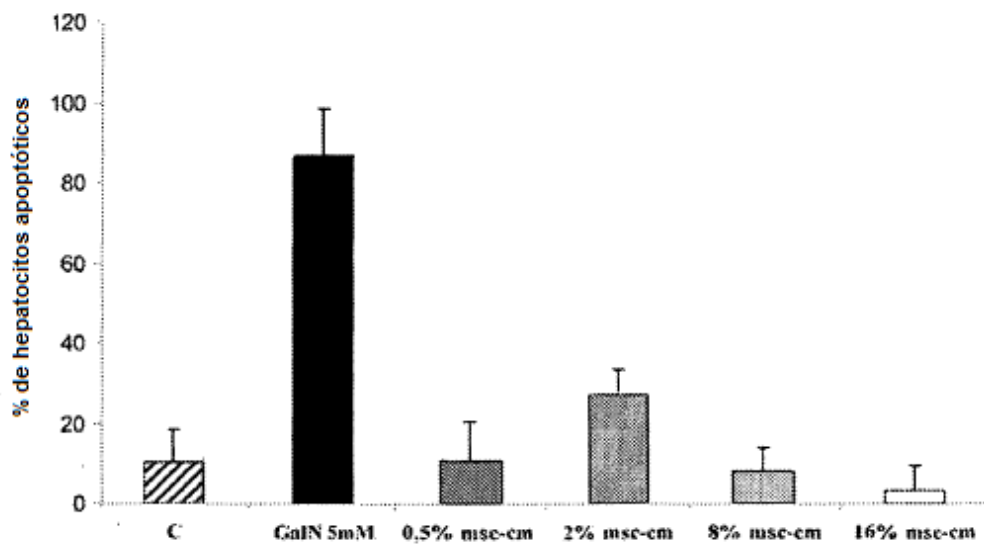


Fig. 8

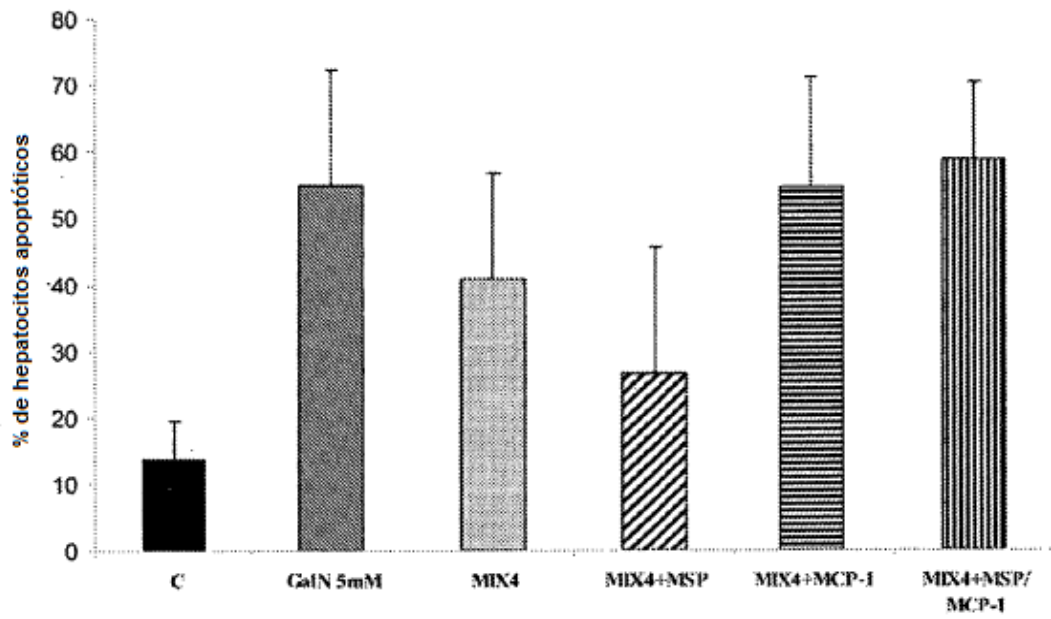


Fig. 9

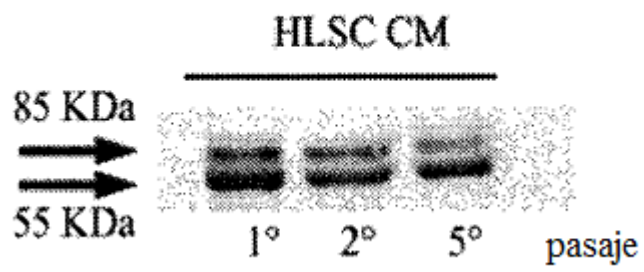


Fig. 10

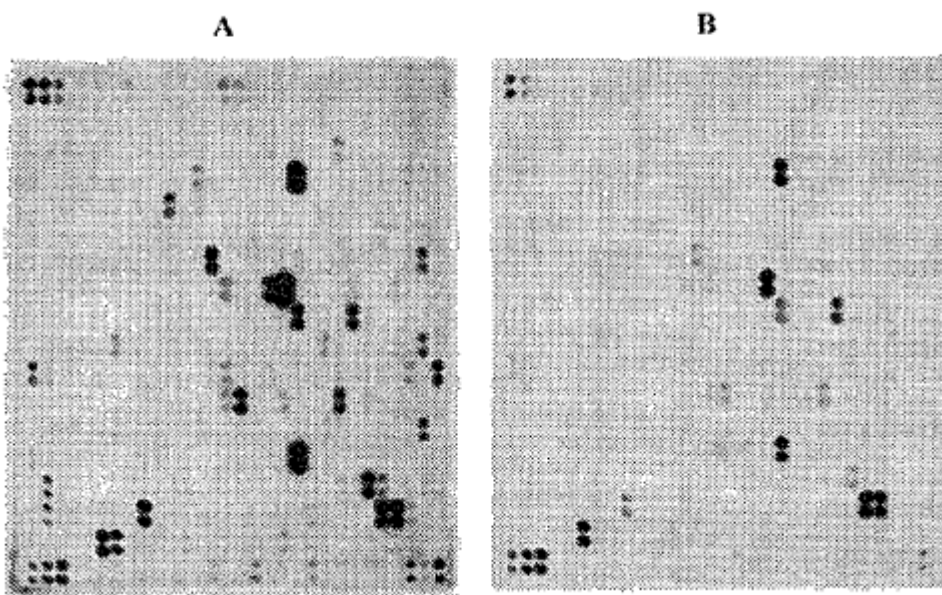


Fig. 11a

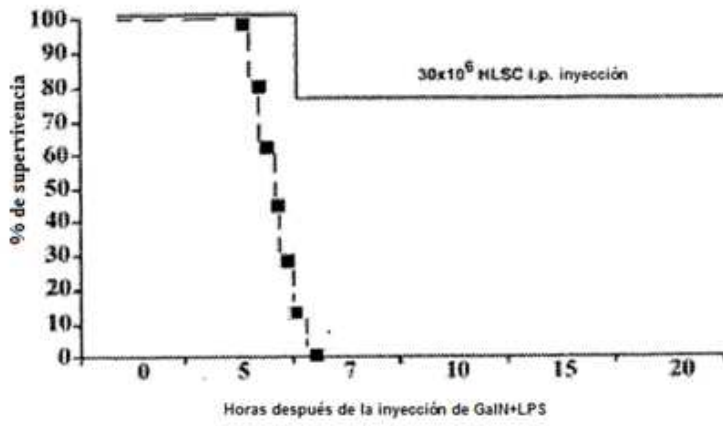


Fig. 11b

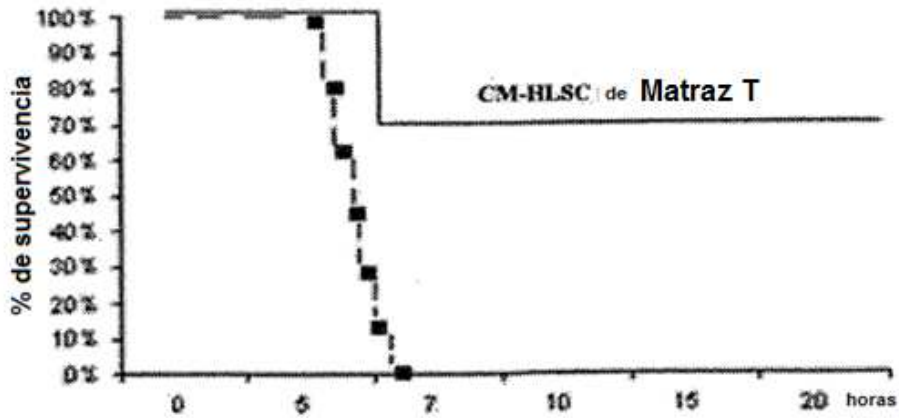


Fig. 12

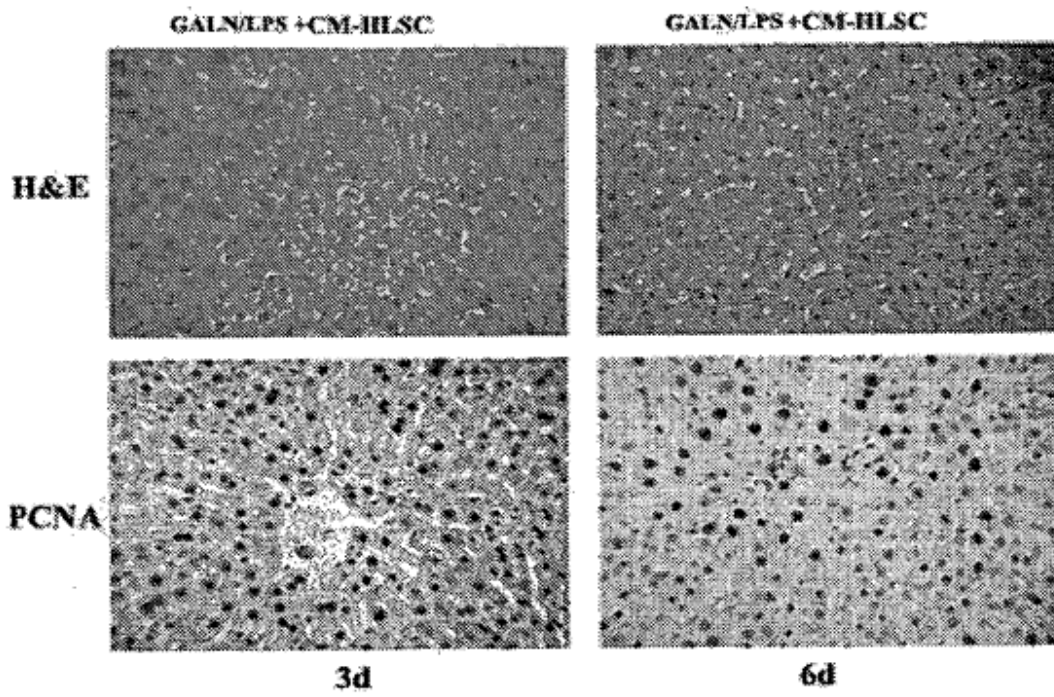


Fig. 13

