

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 371**

51 Int. Cl.:

A61M 1/34 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A01N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2007 E 12176014 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2578081**

54 Título: **Composiciones, métodos, y dispositivos para tratar enfermedades hepáticas**

30 Prioridad:

11.10.2006 US 850778 P

12.10.2006 US 851234 P

12.04.2007 US 923138 P

26.09.2007 US 995316 P

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

20.09.2016

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(50.0%)

55 Fruit Street

Boston, MA 02114, US y

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)

72 Inventor/es:

YARMUSH, MARTIN y

PAREKKADAN, BIJU

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 583 371 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

Composiciones, métodos, y dispositivos para tratar enfermedades hepáticas

5 Investigación o desarrollo con subvención federal

Esta invención se hizo con el apoyo gubernamental en virtud de los números de concesión R01 DK43371, K18 DK076819, y K08 DK66040 otorgados por el National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10

Campo técnico

Esta invención se refiere a composiciones y métodos para tratar enfermedades y trastornos relacionados con la degeneración del hígado.

15

Antecedentes

La insuficiencia hepática es la incapacidad del hígado de realizar su función sintética y metabólica normal como parte de la fisiología normal. La insuficiencia hepática aguda puede aparecer en tan poco como 48 horas, y típicamente coincide con la pérdida o disfunción del 80-90% de las células hepáticas. La insuficiencia hepática es una afección potencialmente mortal que demanda cuidados médicos urgentes.

20

La insuficiencia hepática aguda tiene una prevalencia estimada de 2000 casos al año y una tasa de mortalidad de aproximadamente el 80%.

25

En muchos casos, el trasplante ortotópico de hígado es el único tratamiento eficaz para la insuficiencia hepática aguda. El uso de dichos trasplantes, sin embargo, está limitado debido a la escasez de donantes, los altos costes, y la necesidad de inmunosupresión de por vida. Por tanto, existe una clara necesidad de tratamientos alternativos para el tratamiento de insuficiencia hepática.

30

Sumario

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la terapia basada en células estromáticas multipotentes (MSC) proporciona soporte trófico al hígado lesionado. Por tanto, puede usarse la administración de medio condicionado de MSC (MSC-CM), o el uso de un dispositivo de hígado bioartificial (BAL) con MSC, para tratar a sujetos con enfermedad hepática.

35

La presente invención proporciona un dispositivo extracorpóreo de soporte hepático que comprende una población purificada de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas.

40

Se describen adicionalmente en este documento métodos de preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad hepática. En algunos ejemplos, los métodos incluyen proporcionar una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas, cultivar las MSC indiferenciadas en un medio, por ejemplo, a aproximadamente un 80% de confluencia, por ejemplo, usando aproximadamente 1×10^2 células/cm² hasta 1×10^4 células/cm², por ejemplo, durante un tiempo suficientes para que se produzca una cantidad deseada de factores activos, por ejemplo, 6, 12, 18, 24, 36, o 48 horas, por ejemplo, 12-48 horas, 12-36 horas, 24-36 horas, por ejemplo, 24 horas, obtener el medio (medio condicionado de MSC (MSC-CM)), fraccionar el medio usando métodos conocidos de fraccionamiento, por ejemplo, mediante uno o más de (1) carga, (2) tamaño, y/o (3) unión a sulfato de heparina, seleccionar una fracción del medio que sea capaz de promover la proliferación de hepatocitos y/o inhibir la muerte de hepatocitos y, opcionalmente, formular la fracción seleccionada para su administración a un mamífero, por ejemplo, para administración sistémica, por ejemplo, por administración intravenosa. Preferiblemente, las MSC se mantienen en cultivo en un estado indiferenciado. En general, el MSC-CM y las fracciones activas del mismo estarán libres de células. En algunos ejemplos, la composición está concentrada 25 veces. En algunos ejemplos, la composición incluye un medio de cultivo tisular sin suero o PBS. Los métodos pueden incluir liofilizar la composición.

50

55

También se describen en este documento composiciones farmacéuticas que incluyen MSC-CM o una fracción activa del mismo, por ejemplo, producida por un método descrito en este documento. La presente invención destaca dispositivos extracorpóreos de soporte hepático que comprenden una población purificada de MSC indiferenciadas. En algunas realizaciones, los dispositivos también incluyen una población de hepatocitos primarios. Por tanto, la invención proporciona sistemas para tratar la sangre o el plasma de un mamífero. Los sistemas incluyen un biorreactor extracorpóreo (EB) que incluye un compartimento de tratamiento de fluido y un compartimento de células, y una barrera selectivamente permeable que separa el compartimento de tratamiento de fluido y el compartimento de células, donde el compartimento de células comprende una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas. Además de las MSC, el compartimento de células también puede incluir una población de hepatocitos primarios. La barrera selectivamente permeable puede ser, por ejemplo, un haz de fibras

60

65

huecas, o una membrana plana; se conocen barreras adecuadas en la técnica.

En general, el EB también incluye una entrada de fluido biológico y una salida de fluido biológico, donde la entrada y la salida de fluido biológico permiten la comunicación fluida entre el compartimento de tratamiento de fluido y el torrente sanguíneo de un mamífero.

Los sistemas preferiblemente también incluirán una o una pluralidad de bombas para hacer circular la sangre o el plasma, por ejemplo, desde el sujeto a través del compartimento de tratamiento de fluido del EB y de vuelta al sujeto.

Los sistemas también pueden incluir un cartucho de ultrafiltración en comunicación fluida con el sujeto y/o el compartimento de tratamiento de fluido, de modo que la sangre procedente del sujeto se separe en ultrafiltrado/plasma y componentes celulares, y el UF/plasma se hace circular a través del compartimento de tratamiento de fluido del EB mientras los componentes celulares de la sangre se devuelven al sujeto.

Los sistemas descritos en este documento pueden usarse en métodos de tratamiento de enfermedad hepática en un sujeto. Los métodos incluyen identificar un sujeto que tenga una enfermedad hepática; proporcionar un sistema para tratar la sangre o el plasma de un mamífero, que incluye un biorreactor extracorpóreo (EB) que incluye un compartimento de tratamiento de fluido y un compartimento de células, y una barrera selectivamente permeable que separa el compartimento de tratamiento de fluido y el compartimento de células, donde el compartimento de células incluye una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas (y opcionalmente una población de hepatocitos primarios); y exponer el plasma o sangre del sujeto a las MSC en el EB.

Los sistemas también pueden usarse en métodos para tratar la sangre o el plasma de un sujeto que tiene una enfermedad hepática. Los métodos incluyen identificar un sujeto que tenga una enfermedad hepática; proporcionar un sistema como se describe en este documento; retirar la sangre o el plasma del sujeto; introducir la sangre o el plasma en el compartimento de tratamiento de fluido del EB; y permitir que la sangre o el plasma fluya a través de y salga del compartimento de tratamiento de fluido, tratando de ese modo la sangre o el plasma.

Se describen en este documento métodos de tratamiento de enfermedad hepática en un sujeto. En algunos ejemplos, estos métodos incluyen identificar un sujeto que necesita tratamiento, y administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que incluye MSC-CM o una fracción activa del mismo, por ejemplo, producida por un método descrito en este documento. El sujeto puede identificarse, por ejemplo, evaluando el nivel de un marcador sérico de función hepática. Los métodos pueden incluir la selección de un sujeto sobre la base de que tienen una enfermedad hepática, por ejemplo, determinada por evaluación del nivel de un marcador sérico de función hepática.

Se conocen varios marcadores séricos de función hepática en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina sérica, albúmina y/o globulinas.

En ciertos ejemplos, el tratamiento continúa hasta que el nivel del sujeto de un marcador sérico de función hepática está dentro del intervalo normal determinado por el médico del sujeto, por ejemplo, durante un tiempo suficiente para mejorar un síntoma o corregir un parámetro clínico de la enfermedad hepática, por ejemplo, un tiempo seleccionado por un médico o profesional de asistencia sanitaria. En algunos ejemplos, la enfermedad hepática a tratarse es insuficiencia hepática aguda. En algunos ejemplos, la insuficiencia hepática aguda es insuficiencia hepática fulminante. En algunos ejemplos, la enfermedad hepática a tratarse es fibrosis hepática. En algunos ejemplos, la composición se administra usando una técnica de bolo intravenoso.

Se describen adicionalmente en este documento métodos adicionales para tratar la enfermedad hepática en un sujeto. Estos métodos incluyen identificar un sujeto que necesita tratamiento, proporcionar un sistema que incluye un biorreactor extracorpóreo (EB) que incluye una población purificada de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas, y exponer el plasma o la sangre del sujeto a las MSC en el EB. En algunos ejemplos, el tratamiento puede continuar durante un tiempo suficiente para mejorar un síntoma o corregir un parámetro clínico de la enfermedad hepática, por ejemplo, un tiempo seleccionado por un médico o profesional de asistencia sanitaria. En algunos ejemplos, el sujeto se identifica evaluando el nivel de un marcador sérico de función hepática, por ejemplo, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina sérica, albúmina, y/o globulinas. En algunos ejemplos, el dispositivo de soporte hepático también incluye una población purificada de hepatocitos primarios.

También se describen en este documento métodos para identificar un componente biológicamente activo para el tratamiento de una enfermedad hepática, mediante (i) obtención de una muestra de un medio que contiene factores secretado de una población purificada de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas, (ii) obtención de una fracción del medio usando métodos de fraccionamiento conocidos en la técnica, (iii) ensayo de la capacidad de la fracción de promover la proliferación de hepatocitos o inhibir la muerte de hepatocitos, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, (iv) selección de una fracción del medio que es capaz de promover la proliferación de hepatocitos o inhibir la

muerte de hepatocitos, (v) opcionalmente repetición de las etapas (i) a (iv), y (vi) identificación de una o más moléculas presentes en la fracción seleccionada. En algunos ejemplos, se obtienen distintas fracciones de acuerdo con uno o ambos de tamaño o carga. En algunos ejemplos, la muestra del medio es una fracción del medio que se une a sulfato de heparina.

5 La expresión "insuficiencia hepática aguda" incluye, aunque sin limitación, las afecciones mencionadas por las expresiones insuficiencia hepática hiperaguda, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática subaguda e insuficiencia hepática fulminante (FHF).

10 "Tratar" significa reducir uno o más síntomas de enfermedad hepática, por ejemplo, para promover una mejora en la función hepática evaluada usando uno o más marcadores séricos de función hepática (por ejemplo, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina sérica, albúmina y globulinas) y, por tanto, para mejorar al menos un síntoma, por ejemplo, un síntoma asociado con pérdida de células del parénquima en un órgano, por ejemplo, el hígado.

15 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir un resultado beneficioso o deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz es una que consigue un efecto terapéutico deseado, por ejemplo, para mejorar un síntoma o corregir un parámetro clínico de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad hepática. Esta cantidad puede ser iguala a o diferente de una cantidad profilácticamente eficaz, que es una cantidad necesaria para prevenir la aparición de una enfermedad o síntomas de enfermedad.

20 Una "fracción activa" es una fracción que puede promover la proliferación de hepatocitos o inhibir la muerte de hepatocitos, por ejemplo, en un cultivo de hepatocitos primarios.

25 Como se usa en este documento, los términos "paciente", "sujeto" e "individuo" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un mamífero incluyendo, sin limitación, seres humanos, animales de granja, animales de competición, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratas y ratones. En algunos ejemplos, el sujeto es un mamífero no humano, por ejemplo, un animal experimental o sujeto de veterinaria.

30 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Se describen métodos y materiales en este documento para su uso en la presente invención; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

35 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, y a partir de las reivindicaciones.

40 Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico de barras que muestra la incorporación de Bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU) en SC activadas como una función de la relación MSC:SC. Se inhibe la proliferación de SC activadas por cocultivo indirecto con MSC. Los datos representan la media de dos experimentos realizados por triplicado. Las barras de error son la desviación típica. * $p < 0,05$ en comparación con SC en solitario (MSC:SC = 0).

La FIG. 2 es una imagen de un gel de agarosa de RT-PCR representativo que muestra los niveles de expresión de ARNm de IL-10. GAPDH sirvió como control interno para el análisis de RT-PCR.

50 La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra los resultados medios de ELISA de dos experimentos de independientes, cada uno de los cuales se realizó por triplicado. Las barras de error son la desviación típica. ** $p < 0,01$ en comparación con MSC no estimuladas.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra la secreción de citoquinas en monocultivos y cocultivo directo de SC y MSC (relación 1:1). Se midieron las concentraciones de IL-6 y TNF- α por ELISA con anticuerpos específicos de especie después de 2 días de cultivo. Los resultados son la media de dos experimentos realizados por triplicado. Las barras de error son la desviación típica.

60 La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra la medición por ELISA de la secreción de IL-10 después de 2 días de monocultivo o cocultivo directo 1:1 de MSC y SC.

La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra la secreción de IL-10 como una función de la cantidad de MSC después de 4 días de cocultivo directo 1:1 con SC activadas, determinada por RT-PCR. Los resultados son la media de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error son la desviación típica. ** $p < 0,01$ en comparación con SC en solitario (MSC:SC = 0).

- La FIG. 7 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de la secreción de IL-10 por MSC en cocultivo directo (1:1) con SC activadas después de tratamiento con anticuerpo neutralizante anti-IL-6. Los resultados son la media de dos experimentos realizados por triplicado. Las barras de error son la desviación típica. ** $p < 0,01$ en comparación con la ausencia de anticuerpo.
- 5 La FIG. 8 es un gráfico de barras que muestra la secreción de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) después de 2 días de monocultivo o cocultivo directo 1:1 de SC y MSC. Los resultados son la media de dos experimentos realizados por triplicado.
- 10 La FIG. 9 es un modelo esquemático de los efectos paracrinos de factores derivados de MSC sobre SC activadas. Los factores autocrinos sintetizados por SC no están representados en este modelo. La liberación de IL-6 por SC activadas conduce a la secreción de IL-10 por MSC. La IL-10 inducida, junto con la TNF- α secretada de forma constitutiva, inhiben la proliferación de SC y la síntesis de colágeno. El efecto marginal de IL-10 sobre la proliferación de SC se indica por el tamaño de fuente más pequeño. Las SC experimentan apoptosis después de cocultivo con MSC debido a los niveles aumentados de HGF.
- 15 La FIG. 10 es un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratas Gal-N después de tratamiento con MSC-CM. * $p = 0,017$ (rango Log). MSC-CM, medio condicionado de células madre mesenquimáticas; FHF, insuficiencia hepática fulminante; Gal-N, D-galactosamina.
- 20 Las FIG. 11A-11F son gráficos de barras que muestran los niveles sistémicos de (11A) IL-1 β ; (11B) TNF- α ; (11C) IL-6; (11D) IL-2; (11E) IL-1ra; y (11F) IL-10 después de exposición a Gal-N. Los datos mostrados son la media \pm desviación típica de experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.
- 25 FIG. 12A es un gráfico de barras que muestra valores determinados por examen histológico semi-cuantitativo como se describe en el Ejemplo 6. Los datos mostrados son la media \pm error típico de la media de 10 campos aleatorios de alta energía por animal. Barra sólida = 100 μm . * $p = 0,024$, ** $p = 0,004$.
- 30 La FIG. 12B es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de células inmunitarias infiltrantes por análisis de imágenes digitales. Los datos mostrados son la media \pm error típico de la media de 10 campos aleatorios de alta energía por animal. Barra sólida = 100 μm . * $p = 0,024$, ** $p = 0,004$.
- 35 La FIG. 13 es un gráfico de barras que muestra los resultados de la cuantificación de núcleos TUNEL-positivos usando análisis de imágenes digitales. Los datos se presentan como la media \pm error típico de la media para 10 campos aleatorios por animal. * $p = 0,009$.
- La FIG. 14 es un gráfico de barras que muestra la apoptosis de hepatocitos aislados primarios de rata usando cultivo *in vitro*. Los datos se muestran como la media \pm desviación típica. * $p = 0,005$.
- 40 La FIG. 15 es un gráfico de barras que muestra los núcleos PCNA-reactivos cuantificados por análisis de imágenes digitales. Los datos se presentan como la media \pm error típico de la media para 10 campos aleatorios por animal. * $p = 0,04$.
- 45 La FIG. 16 es un gráfico de barras que muestra los resultados de la cuantificación de los cambios en la expresión génica por PCR a tiempo real (RT-PCR) después de tratamiento con MSC-CM. Las abreviaturas son: oncostatina M (OSM); receptor α -1 β adrenérgico (AR); factor- α de crecimiento transformante (TGF- α); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); factor de necrosis tumoral- α (TNF- α); factor de crecimiento epidérmico (EGF); interleuquina 6 (IL-6); factor de células madre (SCF); factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF); y metaloproteinasas tisulares 3 (TIMP3).
- 50 La FIG. 17A es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de hepatocitos BrdU-positivos por análisis de imágenes. Los datos se muestran como la media \pm desviación típica de dos experimentos diferentes por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ns = no significativo.
- 55 La FIG. 17B es un gráfico de barras que muestra la secreción de albúmina. Los datos se muestran como la media \pm desviación típica de dos experimentos diferentes por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ns = no significativo.
- 60 La FIG. 17C es un gráfico de barras que muestra la síntesis de urea. Los datos se muestran como la media \pm desviación típica de dos experimentos diferentes por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ns = no significativo.
- 65 La FIG. 18 es un gráfico lineal que muestra los resultados del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratas a las que se ha administrado Gal-N tratadas con trasplantes o lisados celulares. Los puntos temporales de las intervenciones se indican por encima de los diagramas de supervivencia. Los resultados son datos acumulativos de dos experimentos independientes (N = 8 por cada grupo) usando diferentes lotes de MSC. Valor P determinado por ensayos de rango Log.

La FIG. 19A es un gráfico lineal que muestra el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratas a las que se ha administrado Gal-N tratadas con MSC-CM concentrado.

La FIG. 19B es un gráfico de barras que muestra la respuesta a dosis de la supervivencia de los animales 72 horas después de la inducción de la insuficiencia hepática como una función de la masa de MSC de la que se obtuvo MSC-CM. Los controles recibieron vehículo o medio condicionado de fibroblastos (fibroblasto-CM). Los puntos temporales de las intervenciones se indican por encima de los diagramas de supervivencia. Los resultados para ambos paneles son datos cumulativos de dos experimentos independientes usando diferentes lotes de MSC-CM (N = 8 por cada grupo). Valor P determinado por ensayo de rango Log.

La FIG. 20 es una representación esquemática de un circuito extracorpóreo ejemplar. En resumen, los circuitos se cebaron con plasma de rata Sprague-Dawley heparinizado, estéril, que se filtró inmediatamente antes de su uso. Se administró a la rata 100 U de heparina (0,1 ml) de forma sistémica a través de la línea venosa 5 minutos antes del inicio de la perfusión. Las líneas arterial y venosa se conectaron posteriormente al circuito extracorpóreo. La sangre arterial se bombeó a 0,55-0,85 ml/minuto a través del tubo de silicona n.º 13 MASTERFLEX (Cole-Palmer Instrument Co.) mediante un accionamiento de bomba peristáltica digital de velocidad variable (Cole-Palmer Instrument Co.). Se colocó un separador de plasma (MICROKROS, material de membrana: ésteres mixtos de celulosa, tamaño de poro de membrana: 0,2 μ m, área superficial de membrana: 16 cm^2 ; Spectrum Laboratories Inc. Laguna Hills, CA) después de la bomba. El plasma separado se bombeó a través del BAL mediante una segunda y tercera bomba peristáltica a un caudal de 0,1 ml/minuto. El plasma separado y los componentes sanguíneos restantes se reunieron antes de entrar en un colector de burbujas. La sangre reconstituida volvió al animal a través de la cánula venosa. Durante la perfusión, se administró heparina (41,5 U/ml) con solución de dextrosa al 5% de forma continua a través de la línea venosa a una tasa de 0,2 ml/hora mediante una bomba de infusión de jeringa. En esta configuración, el volumen muerto del sistema completo de perfusión fue de 12 ml, de los cuales, 6 ml estaban justificados por el BAL. Se estableció flujo de gas oxigenante (21% de O_2 , 5% de CO_2 , 74% de N_2) a través de la cámara por encima de la cámara interna del BAL.

Las FIG. 21A-21B son gráficos de barras que muestran los datos recogidos de estudios de biorreactor extracorpóreo (EB). Los animales se trataron con un MSC-EB, usando un biorreactor basado en fibroblastos 3T3 (fibroblasto-EB) y un biorreactor acelular (acelular-EB) como controles. Biomarcadores séricos de lesión hepática, aspartato aminotransferasa (AST, 21A) y alanina aminotransferasa (ALT, 21B) previo a y 24 horas después de tratamiento con un MSC-EB (n = 5) o un acelular-EB (n = 3). Debido a la mortalidad, n = 1 en el grupo acelular después de tratamiento. Valor P determinado por análisis de ensayo t de student.

La FIG. 21C es un gráfico lineal que muestra los resultados de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratas a las que se ha administrado Gal-N tratadas con EB. Los puntos temporales de las intervenciones se indican por encima de los diagramas de supervivencia. Cada resultado mostrado fue de un experimento independiente usando diferentes lotes de MSC. Valor P determinado por ensayo de rango Log.

La FIG. 22A es una ilustración esquemática del diseño experimental de un estudio de transferencia adoptiva. Ratas lesionadas con Gal-N se trataron con vehículo o MSC-CM seguido de infusión de leucocitos marcados con In^{111} .

La FIG. 22B es un gráfico de barras que ilustra el recuento y diferenciales de leucocitos. Se recogió sangre completa después de canulación y se analizó para células sanguíneas periféricas usando un citómetro de flujo disponible en el mercado (glóbulos blancos (WBC); neutrófilos (NE); linfocitos (LY); monocitos (MO); basófilos (BA); eosinófilos (EO)).

La FIG. 22C es un gráfico de barras que muestra la distribución *in vivo* de leucocitos radiomarcados después de tratamiento subletal con Gal-N.

La FIG. 23A-C muestra que MSC-CM está compuesto por altos niveles de quimioquinas que se correlacionan con beneficio de supervivencia observada en FHF. Se analizó MSC-CM sin suero usando una serie de anticuerpos para 174 proteínas especificadas. La FIG. 23A es un gráfico de barras que muestra los resultados o análisis de densitometría de resultados de serie de anticuerpos aplicados puntualmente. Los datos se presentan como intensidad de mancha respecto al control negativo y normalizados al control positivo. La FIG. 23B es un diagrama de sectores que muestra el análisis de grupos de proteínas secretadas por MSC basándose en la función presentada. El MSC-CM se fraccionó sobre una columna de heparina-agarosa en fracciones unidas y no unidas a heparina. La FIG. 23C es un gráfico lineal que muestra los resultados del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratas a las que se ha administrado Gal-N tratadas con el MSC-CM (+) heparina y MSC-CM (-) heparina. Los puntos temporales de las intervenciones se indican por encima de los diagramas de supervivencia. Los resultados para (C) son datos cumulativos de dos experimentos independientes usando diferentes lotes de MSC-CM (N = 8 por cada grupo). Valor P determinado por ensayo de rango Log.

La FIG. 24 es un gráfico de barras de la síntesis de urea en hepatocitos cultivados en fibroblastos NIH-3T3-J2 de crecimiento detenido durante 14 días, suplementado con 5 ng/ml de SDF-1a o AMD3100, un antagonista de CXCR4. Los datos representan la media \pm error típico de la media (s.e.m.) de dos experimentos independientes realizados

por triplicado.

Las FIG. 25 y 26 son ilustraciones esquemáticas de ejemplos de sistemas de hígado bioartificial.

5 La FIG. 27 es una ilustración esquemática de un biorreactor de fibra hueca.

La FIG. 28 es una ilustración esquemática de una sección transversa en la línea A-A a través del biorreactor de fibra hueca mostrado en la FIG. 27.

10 La FIG. 29 es una ilustración esquemática de un biorreactor de placa plana o dos compartimentos.

Descripción detallada

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que las células estromáticas multipotentes (MSC), y agentes secretados desde las mismas, proporcionan soporte trófico al hígado lesionado. Si el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que este efecto terapéutico es un resultado de la inhibición de la muerte hepatocelular y la estimulación de la regeneración hepatocelular. Por tanto, pueden usarse métodos de tratamiento que incluyen administración parenteral de una composición de medio condicionado de MSC sin células, o el uso de dispositivos de hígado artificial que incluyen MSC, para tratar a sujetos con enfermedad hepática, como se describe en este documento.

20 Al menos en parte, los datos presentados en este documento demuestran que las MSC, y los agentes secretados desde las mismas, son capaces de modular la función de células estrelladas activadas mediante mecanismos paracrinos, de tratar una afección inflamatoria, y de proporcionar soporte trófico al hígado lesionado inhibiendo la muerte hepatocelular y estimulando de regeneración de hepatocitos. Por consiguiente, la terapia basada en MSC, como se describe en este documento, es útil en el tratamiento de cualquier afección aguda y/o crónica, incluyendo afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, en que sería beneficiosa la inhibición de la muerte celular y la estimulación de la reparación de tejidos. Dichas afecciones incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, enfermedad hepática (por ejemplo, fibrosis, cirrosis, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática fulminante (FHF), y cualquier otra enfermedad hepática degenerativa), lesión isquémica (por ejemplo, infarto de miocardio y apoplejía), insuficiencia renal, pancreatitis aguda, y enfermedad autoinmunitaria. La terapia basada en MSC también puede ser beneficiosa en cualquier afección o trastorno en que es beneficiosa la acción de moléculas secretadas tróficas.

Terapia con MSC

35 Como se describe en este documento, las MSC y agentes secretados desde las mismas, por ejemplo, en una composición de medio condicionado de MSC, pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos hepáticos que implican la pérdida o daño de las células del parénquima del hígado en un sujeto. En general, la etiología de estas enfermedades o trastornos puede ser una respuesta inflamatoria local o sistémica. Sin embargo, también se incluyen otras enfermedades o trastornos hepáticos asociados con la pérdida o daño de células del parénquima del hígado.

40 Como se describe en este documento, las MSC y agentes secretados desde las mismas, por ejemplo, en una Composición de medio condicionado de MSC, son particularmente útiles en el tratamiento de insuficiencia hepática aguda en un sujeto, por ejemplo, FHF. En algunos ejemplos, se seleccionará un sujeto para tratamiento usando las composiciones y métodos descritos en este documento basándose en un diagnóstico positivo de enfermedad hepática. La enfermedad hepática puede diagnosticarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando uno o más de los ensayos de función hepática descritos en este documento, o basándose en el criterio de un médico.

45 En algunos ejemplos, el tratamiento se realiza usando la administración de una composición de medio condicionado de MSC (MSC-CM), o una fracción activa del mismo. En algunas realizaciones, el tratamiento se realiza usando un Biorreactor extracorpóreo basado en MSC (MSC-EB).

Aislamiento de MSC

50 Las células estromáticas multipotentes (MSC) también se mencionan en la técnica como células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, y placenta, y células estromáticas derivadas de médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, y placenta. Las MSC pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, de células mononucleares de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, tejido placentario, basándose en su adherencia a plástico de cultivo tisular. Por ejemplo, las MSC pueden aislarse de aspirados de médula ósea disponibles en el mercado (véase el Ejemplo 1). La purificación de las MSC puede conseguirse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos en este documento, incluyendo, aunque sin limitación, FACS.

55 En algunos ejemplos, una preparación de MSC incluirá una solución. Esta solución puede contener aquellos

componentes necesarios para soportar la supervivencia y crecimiento de MSC. Dichos componentes están presentes, de forma rutinaria, en medio de cultivo tisular disponible en el mercado, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Dichos componentes incluyen, por ejemplo, aminoácidos, vitaminas, una fuente de carbono (natural y no natural), sales, azúcares, hidrolizados derivados de plantas, piruvato sódico, tensioactivos, amoníaco, lípidos, hormonas o factores de crecimiento, tampones, aminoácidos no naturales, precursores de azúcares, indicadores, nucleósidos y/o nucleótidos, butirato o agentes orgánicos, DMSO, productos derivados de animales, inductores génicos, azúcares no naturales, reguladores del pH intracelular, betaína u osmoprotector, elementos traza, minerales, vitaminas no naturales. Componentes adicionales que pueden usarse para suplementar un medio de cultivo tisular disponible en el mercado incluyen, por ejemplo, suero animal (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), suero de fetal de ternero (FCS), suero de caballo (HS)), antibióticos (por ejemplo, incluyendo, aunque sin limitación, penicilina, estreptomycin, sulfato de neomicina, anfotericina B, blasticidina, cloranfenicol, amoxicilina, bacitracina, bleomicina, cefalosporina, clortetraciclina, zeocina, y puromicina), y glutamina (por ejemplo, L-glutamina). La supervivencia y crecimiento de las MSC también depende del mantenimiento de un entorno aeróbico, pH, y temperatura apropiados. En algunas realizaciones, la solución no incluirá suero animal, por ejemplo, cuando las MSC se colocan en un dispositivo de hígado bioartificial.

En algunas realizaciones, una preparación de MSC estará esencialmente libre de células o material celular no MSC. En algunas realizaciones, una preparación de MSC contendrá al menos un 80% de MSC identificadas por los criterios descritos en este documento, por ejemplo, al menos un 85%, 90%, 95%, 98%, 99% y mayor de MSC. En algunas realizaciones, las células en una preparación de MSC serán 100% MSC. Una población de células que es al menos un 80% de MSC puede denominarse una población "purificada" de MSC. En general, los métodos, composiciones, y dispositivos descritos en este documento usarán poblaciones purificadas de MSC.

Como un ejemplo, las MSC pueden cultivarse usando medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero fetal de ternero al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y 1 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (Life Technologies, Rockville, MD). Después de 4 días de cultivo, pueden retirarse las células hematopoyéticas no adherentes lavando con PBS. Las monocapas de MSC adherentes entonces se cultivan con cambios de medio 2-3 veces por semana. Las MSC pueden pasarse usando tripsina al 0,25%/EDTA al 0,1%. Las MSC pueden subcultivarse de forma rutinaria a una densidad de 5×10^3 células/cm². Las MSC pueden mantenerse usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Pittenger et al., Science, 284:143-147, 1999).

En algunas realizaciones, las MSC pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento durante los pases 1-7, por ejemplo, durante los pases 4-7, donde el pase uno es el primer pase después del aislamiento. En general, no debe permitirse que las MSC en cultivo excedan una densidad celular mayor del 80% de confluencia. La confluencia puede estimarse de forma visual, por ejemplo, usando un microscopio óptico convencional. Como alternativa, la confluencia celular puede determinarse realizando recuentos celulares usando, por ejemplo, un hemocitómetro convencional. En algunas realizaciones, el 80% de confluencia corresponde a aproximadamente 1×10^6 MSC por matraz de calidad de cultivo tisular de 175 cm². En algunas realizaciones, el 80% de confluencia corresponde a aproximadamente 5×10^3 células/cm².

En general, será deseable mantener las MSC en un estado indiferenciado. El estado de diferenciación de MSC puede evaluarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos de caracterización de MSC descritos en este documento.

45 Caracterización de MSC

Una preparación de MSC (es decir, una preparación de MSC indiferenciadas) puede caracterizarse antes de su uso terapéutico para confirmar la identidad, pureza, y estado de diferenciación de las células.

Las MSC presentan una morfología fibroblastoide única y fácilmente identificable y expresan una serie única de antígenos que reaccionan con anticuerpos monoclonales SH2 (CD105) y SH3 (CD73). Las MSC también tienen una capacidad única de dar lugar, de forma reproducible, a adipocitos, osteoblastos, y condrocitos *in vitro* (Pittenger et al., Science, 284:143-147, 1999).

Como se describe en este documento, una preparación de MSC (por ejemplo, una preparación de MSC indiferenciadas) puede caracterizarse realizando uno o más de los siguientes ensayos, que pueden realizarse *in vivo* o *in vitro* (véase el Ejemplo 2):

- 60 (1) evaluando la capacidad de una MSC o una preparación de MSC de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, y condrocitos. Las MSC indiferenciadas pueden dar lugar a todos estos tipos celulares.
- (2) detectando la presencia o ausencia de uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD11b, CD14, CD18, CD34, CD36, y CD45 sobre una MSC aislada o en una preparación de MSC, por ejemplo, usando una serie. Las MSC indiferenciadas expresan CD105, CD106, y CD44 y no expresan CD14, CD34, y CD45.

En general, la identificación positiva de una preparación de MSC (por ejemplo, una preparación de MSC indiferenciadas) requiere que al menos el 80%, por ejemplo, al menos el 85%, 90%, 95%, 98%, 99% y superior, o el 100% de las células en la preparación de un resultado positivo en el ensayo para la expresión en superficie celular de CD105, CD106, y CD44 y de un resultado negativo en el ensayo para la expresión en superficie celular de CD14, CD34, y CD45 (es decir, CD105+; CD106+; CD44+; CD14-; CD34-; CD44-).

En algunos ejemplos, la identificación positiva de una preparación de MSC indiferenciadas requiere realizar solamente uno de los dos ensayos descritos anteriormente. Sin embargo, pueden realizarse ambos ensayos.

En algunos ejemplos, pueden realizarse ensayos adicionales, por ejemplo, antes del uso terapéutico de una preparación de MSC para confirmar la ausencia de contaminantes incluyendo, por ejemplo, bacterias, virus, hongos, proteínas infecciosas, y moléculas inmunológicas indeseadas. Dichos ensayos son conocidos en la técnica.

Medio condicionado de MSC (MSC-CM)

Puede prepararse una composición de MSC-CM usando una población de MSC indiferenciadas entre los pases 4-7, donde el pase uno es el primer pase después del aislamiento. Como se describe en este documento, puede prepararse una composición de MSC-CM usando aproximadamente 1×10^5 a 1×10^7 células, por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 a 1×10^6 células, 1×10^6 a 1×10^7 células, 1×10^6 a 9×10^6 células, 1×10^6 a 8×10^6 células, 1×10^6 a 7×10^6 células, 1×10^6 a 6×10^6 células, 1×10^6 a 5×10^6 células, 1×10^6 a 4×10^6 células, 1×10^6 a 3×10^6 células, y 1×10^6 a 2×10^6 células. En algunos ejemplos, puede prepararse una composición de MSC-CM usando 2×10^6 células.

En algunos ejemplos, se prepara una composición de MSC-CM usando aproximadamente 1×10^2 células/cm² a 1×10^4 células/cm², por ejemplo, aproximadamente 1×10^2 células/cm² a 1×10^3 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 1×10^4 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 9×10^3 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 8×10^3 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 7×10^3 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 6×10^3 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 5×10^3 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 4×10^3 células/cm², 1×10^3 células/cm² a 3×10^3 células/cm², y 1×10^3 células/cm² a 2×10^3 células/cm². En algunos ejemplos, puede prepararse una composición de MSC-CM usando aproximadamente 5×10^3 células/cm². En algunos ejemplos, puede prepararse una composición de MSC-CM usando dos poblaciones de 1×10^6 MSC por 175 cm², es decir, puede prepararse una composición de MSC-CM usando 2×10^6 células.

En algunos ejemplos, se prepara una composición de MSC-CM del siguiente modo (véase también el Ejemplo 4):

- (1) Se lavan minuciosamente MSC al 70-80% confluentes con solución salina tamponada con fosfato (PBS);
- (2) Se cultivan las MSC de (1) durante aproximadamente 12, 24, 36, o 48 horas, por ejemplo, 24 horas en un volumen apropiado de medio de cultivo sin suero que contiene DMEM, o un equivalente del mismo, suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,05% (nota; el volumen del medio variará dependiendo del tamaño del recipiente de cultivo celular) en un recipiente adecuado, por ejemplo, una matraz T175 cm², con cada recipiente/matraz al 80% de confluencia, equivalente a aproximadamente 5×10^3 células/cm²; y
- (3) Se recoge el medio de cultivo de MSC de (2).

La composición de MSC-CM recogida puede concentrarse, por ejemplo, usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, unidades de ultrafiltración con un punto de corte de 3 kD (AMICON Ultra-PL 3, Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Por ejemplo, la composición de MSC-CM puede concentrarse al menos 2 veces hasta 10 veces, 10 veces hasta 20 veces, 20 veces hasta 30 veces, 30 veces hasta 49 veces, y por encima. Como un ejemplo, una composición de MSC-CM se concentra 25 veces.

En algunos ejemplos, la composición de MSC-CM comprende medio de cultivo que contiene DMEM suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,05%. En algunos ejemplos, la composición de MSC-CM no contiene nada de suero animal. En algunos ejemplos, la composición de MSC-CM comprende PBS. Como alternativa, la composición de MSC-CM se proporciona en forma liofilizada.

En algunos ejemplos, una composición de MSC-CM puede fraccionarse por tamaño o por carga. En algunos ejemplos, una composición de MSC-CM puede fraccionarse en fracciones de unión a sulfato de heparina y no de unión a heparina. Por ejemplo, en experimentos de fraccionamiento en sulfato de heparina, una composición de MSC-CM concentrada puede pasarse sobre una columna de heparina, u otras columnas, por ejemplo, un método de separación cromatográfica por intercambio iónico, por tamaño, en fase inversa u otros métodos de separación cromatográfica según las instrucciones del proveedor. Las fracciones de flujo continuo y eluidas pueden recogerse, entonces, por separado. Las fracciones eluidas (es decir, la fracción de unión a heparina) entonces pueden recogerse y opcionalmente concentrarse, como se ha descrito anteriormente.

En algunos ejemplos, una composición de MSC-CM está al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, y 100% libre de material no de unión a heparina.

Métodos de tratamiento

Los métodos descritos en este documento pueden usarse para tratar una enfermedad hepática en un sujeto. En algunos ejemplos, la etiología de la enfermedad hepática a tratarse puede ser una respuesta inflamatoria local o sistémica. Los métodos descritos en este documento son de uso particular para el tratamiento de FHF en un sujeto. Los métodos incluyen tratar a un sujeto diagnosticado como que tiene FHF, o sospechoso de tener FHF, por ejemplo, un sujeto que se presenta a un médico con síntomas que son típicos de FHF. En algunos ejemplos, los métodos y composiciones descritos en este documento son de uso en el tratamiento de fibrosis hepática.

Generalmente, los métodos descritos en este documento incluyen (1) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de MSC-CM (o fracción activa del mismo) a un sujeto que necesita, o que se ha determinado que necesita dicho tratamiento; y/o (2) tratar a un sujeto identificado como que necesita, o que se ha determinado que necesita dicho tratamiento, con un dispositivo extracorpóreo de soporte hepático o un dispositivo de asistencia hepática que contiene MSC (por ejemplo, un biorreactor extracorpóreo (EB) que contiene MSC (MSC-EB)).

Terapia con MSC-CM

Los métodos descritos en este documento pueden incluir la administración parenteral de una composición que incluye uno o más de (A) una fracción purificada de una composición de MSC-CM; (B) una o más fracciones purificadas de una composición de MSC-CM; (C) fracciones de una composición de MSC-CM de pesos moleculares particulares, por ejemplo, 1-3 kDa, 3-6 kDa, 6-50 kDa, y 50 kDa y por encima, incluyendo combinaciones de estas fracciones; (D) una composición no fraccionada de MSC-CM; y (E) cualquier combinación de A-D. Cada uno de estos se menciona, de forma individual o colectiva, como la "composición" o la "composición de MSC-CM". Las fracciones biológicamente activas pueden identificarse *in vitro* exponiendo hepatocitos a estímulos apoptóticos, tales como actinmiosina D y TNF-I. El nivel de apoptosis entonces puede determinarse usando, por ejemplo, ensayo TUNEL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las fracciones biológicamente activas inhibirán la apoptosis en una cantidad estadísticamente significativa en este sistema, por ejemplo, en un 25%, 30%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más. Estas observaciones *in vitro* pueden complementarse usando ensayos *in vivo* en un modelo animal de insuficiencia hepática aguda.

En algunos ejemplos, se administra una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de MSC-CM a un sujeto usando inyección sistémica en bolo intravenoso. La administración de bolo (también mencionada como infusión en bolo) incluye la administración de una dosis de fármaco sobre un corto periodo de tiempo, por ejemplo, mediante inyección en un vaso sanguíneo.

En algunos ejemplos, se administra una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de MSC-CM a un sujeto usando un goteo intravenoso. Otros modos de administración pueden incluir cualquiera de varias vías diferentes incluyendo, aunque sin limitación, inyección intravenosa, intradérmica, subcutánea, y percutánea.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de MSC-CM puede darse al sujeto en una o más administraciones, aplicaciones, o dosificaciones. Las composiciones pueden administrarse desde una o más veces al día hasta una o más veces a la semana; incluyendo una vez en días alternos. Los expertos en la materia apreciarán que ciertos factores pueden influir en la dosificación y cronología necesarias para tratar de forma eficaz a un sujeto, incluyendo, aunque sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones descritas en este documento puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos.

En algunos ejemplos, se administra una composición de MSC-CM a un sujeto como una única dosis diaria o como múltiples dosis diarias, por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis diarias. Las dosis pueden administrarse con o sin considerar la ingesta de alimento.

En algunos ejemplos, se administra una composición de MSC-CM a un sujeto durante un periodo de 1 a 7 días. En algunos ejemplos, se administra una composición de MSC-CM a un sujeto durante un periodo de al menos 1 semana hasta 1 mes, por ejemplo, al menos 1, 2, 3 o 4 semanas. En un ejemplo alternativo adicional, se administra una composición de MSC-CM a un sujeto durante un periodo de al menos 1 mes hasta 1 año o más tiempo. En algunos ejemplos, se administra una composición de MSC-CM hasta que se ha conseguido el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, recuperación funcional del hígado, por ejemplo, hasta niveles normales o casi normales, o hasta niveles tratables por otros medios terapéuticos), según decida el sujeto o el profesional médico del sujeto. En algunos ejemplos, la función hepática puede evaluarse usando ensayos conocidos de función hepática, por ejemplo, niveles en suero de lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina, niveles de proteínas, tiempo de protrombina, tiempo de coagulación activada (ACT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT), y tiempo de consumo de protrombina (PCT) (analizado adicionalmente a continuación).

- La dosificación, toxicidad, y eficacia terapéutica de la composición pueden determinarse, por ejemplo, por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Generalmente se prefieren compuestos que muestran altos índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.
- En algunos ejemplos, puede validarse una composición de MSC-CM y/o puede determinarse la eficacia terapéutica de una composición de MSC-CM, por ejemplo, de un lote dado de una composición de MSC-CM, usando un modelo experimental (por ejemplo, un modelo animal o un modelo *in vitro*), por ejemplo, como se describe en este documento.
- Terapia y dispositivos con MSC-EB
- Los métodos descritos en este documento pueden incluir el uso de dispositivos extracorpóreos de soporte hepático con MSC para tratar a sujetos con enfermedad hepática. Dichos dispositivos están dentro del alcance de la presente descripción.
- Los dispositivos extracorpóreos de soporte hepático son análogos a los dispositivos usados para realizar diálisis renal. Los dispositivos descritos en este documento son dispositivos de hígado bioartificial (BAL) que incluyen biorreactores extracorpóreos (EB), que son cartuchos o recipientes que tienen al menos una entrada de perfusión y una salida de perfusión, y un compartimento de células, por ejemplo, una matriz, dentro del recipiente que proporciona un entorno adecuado para células vivas mientras se permite la perfusión del compartimento de células con medios adecuados para mantener las células. Dichos compartimentos de células pueden ser, por ejemplo, fibras huecas, con circulación de sangre o plasma fuera de las fibras, o placas planas; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.759.245.
- Generalmente, los sistemas que comprenden EB también separan de forma continua el plasma de los componentes celulares de la sangre usando un generador de ultrafiltrado. El ultrafiltrado (por ejemplo, plasma) se hace circular a través del cartucho que contiene células cultivadas, es decir, un EB. Como alternativa, puede tratarse la sangre completa en el EB.
- Como se ha indicado anteriormente, los cartuchos de EB generalmente contienen una barrera semi-permeable hecha de un material que permite el paso de macromoléculas y otros productos derivados de células a y desde el plasma del sujeto. Sin embargo, las propias células no abandonan el EB. Después de la circulación y uno o múltiples pases a través del biorreactor, el ultrafiltrado tratado (por ejemplo, plasma) se recombina con los componentes celulares de la sangre del sujeto y se devuelve al sujeto mediante el acceso venoso. Generalmente, la sangre o plasma del sujeto se suplementa con heparina para evitar la coagulación. Esta circulación se mantiene de forma continua durante, por ejemplo, un periodo de soporte de 10 horas de terapia. En sistemas BAL actuales, la sangre o el plasma transporta toxinas desde el paciente hasta un biorreactor que contiene hepatocitos. Véase, por ejemplo, Yarmush et al., *Cell Transplant*, 1:323 (1992), y Arkadopoulos et al., *Int'l J. Artif. Organs*, 21:781 (1998).
- Los presentes dispositivos incluyen a) un biorreactor que comprende un compartimento de tratamiento de fluido y un compartimento de células, y opcionalmente una barrera selectivamente permeable que separa el compartimento de tratamiento de fluido y el compartimento de células; y b) un depósito de células en comunicación fluida con el compartimento de células del biorreactor, donde el depósito de células comprende una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas. La sangre o el ultrafiltrado procedente de un sujeto se hace pasar al compartimento de tratamiento de fluido, donde los agentes secretados por las MSC pasan a la sangre o el ultrafiltrado, por contacto directo entre las MSC y la sangre o el ultrafiltrado, o mediante el paso de los agentes a través de la barrera selectivamente permeable opcional, cuando está presente. En los presentes dispositivos, las MSC en un EB se usan en un estado indiferenciado, evaluado usando técnicas descritas en este documento.
- Los dispositivos extracorpóreos de soporte hepático que incluyen biorreactores se mencionan habitualmente como dispositivos de hígado artificial (BAL) o dispositivos bioartificiales de asistencia hepática (BLAD). Se conocen varios de dichos dispositivos en la técnica y pueden adaptarse para su uso con MSC. Dispositivos extracorpóreos de soporte hepático ejemplares disponibles en el mercado que pueden usarse como se describe en este documento incluyen, aunque sin limitación, el sistema ELAD® actualmente comercializado por Vital Therapies, Incorporated (mostrado en la en Fig. 1 de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0182349), HEPATASSIST® de Circe, BELS de Gerlach, y BLSS de Excorp Medical. Se describen dispositivos ejemplares adecuados adicionales en las patentes de Estados Unidos n.º 6.472.200, 5.605.835; 7.160.719; 7.273.465; 6.858.146; 6.582.955; 5.270.192; 6.759.245; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003-0017142.
- La FIG. 25 muestra un diagrama esquemático de un sistema extracorpóreo de soporte hepático ejemplar en que

pueden usarse los EB que contienen MSC como se describe en este documento. El sistema incluye un biorreactor 1 ejemplar con múltiples cartuchos 2. El biorreactor 1 incluye una entrada de fluido oxigenado 3 para introducir un fluido oxigenado desde un suministro de fluido oxigenado 4, una salida de fluido oxigenado 3', una entrada de líquido 5 para introducir un líquido biológico, suministrado por la bomba 6 desde la unidad de inmunoaislamiento 7, en el biorreactor, y una salida de líquido 5' para retirar el líquido biológico del biorreactor para devolverlo a la unidad de inmunoaislamiento 7. La sangre del paciente 9 fluye mediante la bomba 6' a una unidad de plasmaféresis 8, desde la cual entonces fluye una parte del plasma a la unidad de inmunoaislamiento 7, mediante la bomba 6". El plasma tratado fluye desde la unidad de inmunoaislamiento 7 y se mezcla con la sangre de la unidad de plasmaféresis 8 antes de fluir de vuelta al paciente 9. Para detalles adicionales, véase la patente de Estados Unidos n.º 6.759.245.

Con referencia a la FIG. 26, se muestra otro ejemplo de un sistema de hígado bioartificial en forma esquemática (véase la patente de Estados Unidos n.º 7.160.719). El sistema 10 incluye un EB 42 que incluye MSC, y opcionalmente hepatocitos. Un fluido biológico a tratarse (por ejemplo, sangre o plasma) puede introducirse en el EB 42 mediante la vía de entrada de fluido biológico 32 y puede salir mediante la vía de salida de fluido biológico 33. Por ejemplo, puede usarse un catéter venovenoso para situar el torrente sanguíneo de un mamífero en comunicación fluida con el EB 42 mediante la vía de entrada de fluido biológico 32. En un ejemplo alternativo, un fluido biológico puede tratarse *in vitro* usando un depósito de fluido biológico (no mostrado) en lugar del mamífero 51. En algunos ejemplos, el dispositivo incluye un generador de ultrafiltrado (UF) 41. En esos casos, la sangre del mamífero 51 fluye a lo largo de la vía de sangre 31 al generador de UF 41, donde los componentes celulares se separan del plasma. El plasma ultrafiltrado entonces fluye a lo largo de la vía 32 al EB 42, mientras los componentes celulares se reincorporan al UF tratado mediante la vía 34. El fluido biológico entonces vuelve al mamífero 51 o al depósito de fluido biológico mediante la vía 35.

Aunque las FIG. 25 y 26 representan los diversos componentes en una orientación específica y que tienen dimensiones similares, los componentes pueden estar en cualquier orientación, tamaño, o forma.

En algunas situaciones, para minimizar la diferenciación de MSC, pueden hacerse funcionar dispositivos EB que contienen MSC individuales durante un máximo de 24 horas. En algunas realizaciones, las células MSC pueden combinarse con hepatocitos primarios en un EB convencional.

Por tanto, un sujeto que necesita terapia puede conectarse a un dispositivo BAL que tiene un EB que contiene MSC (MSC-EB), o que contiene una mezcla de hepatocitos y MSC. Estos métodos pueden usarse para tratar la sangre o el plasma del sujeto. El método incluye proporcionar un sistema, como se describe en este documento, que contiene un EB que incluye un compartimento de células que contiene una población de MSC para tratar la sangre o el plasma; para retirar la sangre o el plasma del sujeto; introducir la sangre o el plasma en el compartimento de tratamiento de fluido del EB; y permitir que la sangre o plasma fluya a través de y salga del compartimento de tratamiento de fluido, tratando de ese modo la sangre o el plasma.

El caudal del plasma de un sujeto a través de un EB puede ajustarse según lo necesario, por ejemplo, a una tasa de aproximadamente 50-500 ml/minuto, por ejemplo, 50, 100, 200, 300, 400, y 500 ml/minuto. En algunos ejemplos, el caudal se ajustará para optimizar el paso de agentes secretados desde las MSC indiferenciadas al ultrafiltrado. En algunos ejemplos, el caudal diana será de 175 ml/minuto. El tratamiento del sujeto (por ejemplo, circulación del plasma del sujeto a través de un dispositivo) puede continuar durante un tiempo terapéuticamente eficaz, por ejemplo, entre 1 hora y 24 horas, por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 12, 15, 18, 20, o 23 horas. Los sujetos pueden experimentar múltiples rondas de terapia con MSC-EB durando cada ronda, por ejemplo, entre 1 hora y 24 horas. La terapia con MSC-EB puede continuar, por ejemplo, hasta que se ha conseguido un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, recuperación de función hepática suficiente hasta niveles aceptables o casi normales), según se decida por el sujeto o el profesional médico del sujeto, o hasta que está disponible un hígado donante para su trasplante. En algunos ejemplos, la función hepática puede evaluarse usando ensayos convencionales de función hepática, por ejemplo, niveles en suero de LDH, ALP, AST, ALT, bilirrubina, proteínas, tiempo de protrombina, ACT, PTT, y PCT. En algunos ejemplos, los ensayos de función hepática se realizan antes de y/o después de terapia con MSC-EB, para evaluar la eficacia de la terapia con MSC-EB. Dichas evaluaciones también pueden hacerse antes y/o después de cada ronda de terapia con MSC-EB, así como antes de que empiece la terapia y después de haberse completado la terapia debido a que se está consiguiendo el efecto terapéutico deseado o a la adquisición de un órgano donante.

Los dispositivos extracorpóreos de soporte hepático que incluyen biorreactores también se mencionan habitualmente como dispositivos de hígado artificial (BAL) o dispositivos bioartificiales de asistencia hepática (BLAD). Se conocen varios de dichos dispositivos en la técnica y pueden adaptarse para su uso con MSC. Dispositivos extracorpóreos de soporte hepático disponibles en el mercado ejemplares que pueden usarse como se describe en este documento incluyen, aunque sin limitación, el sistema ELAD® actualmente comercializado por Vital Therapies, Incorporated (mostrado en la Fig. 1 de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0182349), HEPATASSIST® de Circe, BELS de Gerlach, y BLSS de Excorp Medical. Se describen dispositivos ejemplares adecuados adicionales en las patentes de Estados Unidos n.º 6.472.200, 5.605.835; 7.160.719; 7.273.465; 6.858.146; 6.582.955; 5.270.192; 6.759.245; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003-0017142.

Selección de sujetos

5 Los métodos descritos en este documento son de uso particular para el tratamiento de enfermedad hepática (por ejemplo, insuficiencia hepática aguda) en un sujeto que lo necesita. Los métodos incluyen: identificar a un sujeto con enfermedad hepática (por ejemplo, insuficiencia hepática aguda), y tratar al sujeto con las composiciones descritas en este documento usando los métodos descritos en este documento.

10 En algunos ejemplos, los métodos de tratamiento descritos en este documento incluyen una etapa de selección de un sujeto sobre la base de que tiene una enfermedad hepática, por ejemplo, FHF o fibrosis hepática. En algunos ejemplos, se administra un ensayo de función hepática, por ejemplo, como se sabe en la técnica o se describe en este documento, y el sujeto se selecciona para tratamiento usando un método descrito en este documento sobre la base del resultado de ese ensayo, por ejemplo, un resultado de ensayo que indica que el sujeto tiene una enfermedad hepática (por ejemplo, una enfermedad hepática asociada con la pérdida de función hepática y/o la pérdida o daño de hepatocitos, por ejemplo, de células del parénquima del hígado).

15 Por tanto, en algunos ejemplos, un sujeto que necesita tratamiento con las composiciones y métodos descritos en este documento puede seleccionarse basándose en, por ejemplo, marcadores séricos de función hepática. Un sujeto que necesita tratamiento con los métodos descritos en este documento también puede seleccionarse basándose en el diagnóstico por un médico de enfermedad hepática (por ejemplo, enfermedad hepática aguda) en un sujeto.

Enfermedad hepática

25 La expresión "enfermedad hepática" se aplica a muchas enfermedades y trastornos que causan que el hígado funcione inapropiadamente o deje de funcionar, y esta pérdida de función hepática es indicativa de enfermedad hepática. Por tanto, frecuentemente se usan ensayos de función hepática para diagnosticar enfermedad hepática. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, aunque sin limitación, los siguientes;

30 (1) Ensayos para determinar los niveles de enzimas séricas tales como lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), y alanina aminotransferasa (ALT), donde un aumento en los niveles de enzimas indica enfermedad hepática. Los expertos en la materia comprenderán razonablemente que estos ensayos enzimáticos indican solamente que el hígado ha sido dañado. No evalúan la capacidad del hígado de funcionar. Pueden usarse otros ensayos para ensayar la capacidad del hígado de funcionar.

35 (2) Ensayos para determinar los niveles séricos de bilirrubina. Los niveles séricos de bilirrubina se presentan como bilirrubina total y bilirrubina directa. Los valores normales de bilirrubina sérica total son 0,1 - 1,0 mg/dl (por ejemplo, aproximadamente 2 - 18 mmol/l). Los valores normales de bilirrubina directa son 0,0 - 0,2 mg/dl (0 - 4 mmol/l). Aumentos en la bilirrubina sérica son indicativos de enfermedad hepática.

40 (3) Ensayos para determinar los niveles séricos de proteínas, por ejemplo, albúmina y las globulinas (por ejemplo, alfa, beta, gamma). Los valores normales para proteínas séricas totales son 6,0-8,0 g/dl (60-80 g/l). Una disminución en la albúmina sérica es indicativa de enfermedad hepática. Un aumento en la globulina es indicativo de enfermedad hepática.

45 Otros ensayos incluyen tiempo de protrombina, relación normalizada internacional, tiempo de coagulación activada (ACT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT), tiempo de consumo de protrombina (PCT), fibrinógeno, factores de coagulación; alfa-fetoproteína, y alfa-fetoproteína-L3 (porcentaje).

50 Un tipo clínicamente importante de enfermedad hepática es la hepatitis. La hepatitis es una inflamación del hígado que puede estar causada por virus (por ejemplo, virus de la hepatitis A, B y C (HAV, HBV, y HCV, respectivamente), agentes químicos, fármacos, alcohol, enfermedades hereditarias, o el propio sistema inmunológico del paciente (hepatitis autoinmunitaria). Esta inflamación puede ser aguda y resolverse en unas pocas semanas a meses, o crónica, y persiste durante muchos años. La hepatitis crónica puede persistir durante décadas antes de causar síntomas significativos, tales como cirrosis (cicatrización y pérdida de función), cáncer de hígado, o muerte.

55 Otros ejemplos importantes de diferentes enfermedades o trastornos abarcados por la expresión "enfermedad hepática" incluyen, aunque sin limitación, abscesos hepáticos amebianos, atresia biliar, fibrosis, cirrosis, coccidioidomycosis, agente delta, carcinoma hepatocelular (HCC), enfermedad hepática alcohólica, cirrosis biliar primaria, absceso hepático piogénico, síndrome de Reye, colangitis esclerosante, y enfermedad de Wilson. En algunos ejemplos, las composiciones y métodos descritos en este documento son adecuados para el tratamiento de enfermedad hepática caracterizada por la pérdida o daño de células del parénquima del hígado. En algunos aspectos, la etiología de esto puede ser una respuesta inflamatoria local o sistémica.

Insuficiencia hepática

65 La insuficiencia hepática aparece cuando grandes partes del hígado quedan dañadas y el hígado ya no es capaz de realizar su función fisiológica normal. En algunos aspectos, la insuficiencia hepática puede diagnosticarse usando los ensayos descritos anteriormente de función hepática. En algunos ejemplos, la insuficiencia hepática puede

diagnosticarse (por ejemplo, diagnosticarse inicialmente) basándose en los síntomas de un sujeto. Los síntomas que están asociados con la insuficiencia hepática incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes, náuseas, pérdida de apetito, fatiga, diarrea, ictericia, hemorragia anormal/excesiva (por ejemplo, coagulopatía), abdomen hinchado, desorientación mental o confusión (por ejemplo, encefalopatía hepática), somnolencia, y coma.

5 La insuficiencia hepática crónica aparece en meses a años y está muy habitualmente causada por virus (por ejemplo, HBV y HCV), consumo a largo plazo/excesivo de alcohol, cirrosis, hemocromatosis, y malnutrición.

10 La insuficiencia hepática aguda es la aparición de complicaciones graves después de los primeros signos de enfermedad hepática (por ejemplo, ictericia). La insuficiencia hepática aguda incluye varias afecciones, todas las cuales implican lesión grave o necrosis de los hepatocitos. En la mayoría de los casos de insuficiencia hepática aguda, sucede necrosis masiva de los hepatocitos; sin embargo, la insuficiencia hepatocelular sin necrosis es característica del hígado graso de las embarazadas y el síndrome de Reye. Un estado mental alterado (encefalopatía hepática) y coagulopatía en el ámbito de una enfermedad hepática generalmente define insuficiencia hepática aguda. Por consiguiente, la insuficiencia hepática aguda generalmente se define clínicamente como el desarrollo de coagulopatía, habitualmente una relación normalizada internacional (una medida del tiempo que tarda la sangre en coagular en comparación con un valor promedio - INR) de más de 1,5, y cualquier grado de alteración mental (encefalopatía) en un paciente sin cirrosis preexistente y con una enfermedad de menos de 26 semanas de duración. La insuficiencia hepática aguda indica que el hígado ha mantenido un daño grave provocando la disfunción del 80-90% de las células hepáticas.

20 La insuficiencia hepática aguda aparece cuando el hígado falla rápidamente. La insuficiencia hepática hiperaguda se caracteriza como fallo del hígado en una semana. La insuficiencia hepática aguda se caracteriza como el fallo del hígado en 8-28 días. La insuficiencia hepática subaguda se caracteriza como el fallo del hígado en 4-12 semanas.

25 En algunos ejemplos, las composiciones y métodos descritos en este documento son particularmente adecuados para el tratamiento de insuficiencia hepática hiperaguda, aguda, y subaguda, todas las cuales se mencionan en este documento como "insuficiencia hepática aguda." Las causas comunes para insuficiencia hepática aguda incluyen, por ejemplo, hepatitis vírica, exposición a ciertos fármacos y toxinas (por ejemplo, hidrocarburos fluorados (por ejemplo, tricloroetileno y tetracloroetano), Amanita phalloides (por ejemplo, encontrada habitualmente en el "hongo de la muerte"), acetaminofeno (paracetamol), halotanos, sulfonamidas, fenitoínas), isquemia hepática relacionada con enfermedad cardíaca (por ejemplo, infarto de miocardio, parada cardíaca, cardiomiopatía, y embolia pulmonar), insuficiencia renal, oclusión del flujo saliente venoso hepático (por ejemplo, síndrome de Budd-Chiari), enfermedad de Wilson, hígado graso aguda del embarazo, abscesos amebianos, y tuberculosis diseminada.

30 La insuficiencia hepática aguda abarca tanto insuficiencia hepática fulminante (FHF) como insuficiencia hepática subfulminante (o insuficiencia hepática de aparición tardía). La FHF se usa generalmente para describir el desarrollo de encefalopatía en 8 semanas desde la aparición de síntomas en un paciente con un hígado previamente sano. La insuficiencia hepática subfulminante se reserva para pacientes con enfermedad hepática durante hasta 26 semanas antes del desarrollo de encefalopatía hepática.

35 La FHF se define habitualmente como la alteración grave de las funciones hepáticas en ausencia de enfermedad hepática preexistente. La FHF puede resultar de la exposición de un individual susceptible a un agente capaz de producir lesión hepática grave. Ejemplos de dichos agentes incluyen agentes infecciosos, alcohol excesivo, metabolitos hepatotóxicos, y compuestos hepatotóxicos (por ejemplo, fármacos). Otras causas incluyen anomalías congénitas, enfermedad autoinmunitaria y enfermedad metabólica. En muchos casos la etiología precisa de la afección es desconocida (por ejemplo, idiopática). La FHF puede diagnosticarse, por ejemplo, usando los ensayos de función hepática descritos anteriormente.

50 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular incluyendo colágeno que aparece en la mayoría de enfermedades hepáticas crónicas. La fibrosis hepática avanzada provoca cirrosis, insuficiencia hepática e hipertensión portal, y a menudo requiere trasplante de hígado. Un evento clave en la etiología de la fibrosis hepática es la activación inapropiada o excesiva de células estrelladas hepáticas (Abdel-Aziz et al., Am. J. Pathol., 137:1333-1342, 1990; Iredale et al., J. Clin. Invest., 102:538-549, 1998).

Disfunción multiorgánica

60 La insuficiencia orgánica se define generalmente como pérdida de células del parénquima asociada con una respuesta inflamatoria local y sistémica. Más específicamente, la insuficiencia orgánica es el fallo de un sistema esencial en el organismo que requiere intervención médica. El síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) es función orgánica alterada en un paciente gravemente enfermo, que requiere intervención médica para realizar la homeostasis. El MODS habitualmente implica dos o más órganos.

65 El MODS típicamente resulta de infección, lesión (accidente, cirugía), hipoperfusión e hipermetabolismo. Después de

un evento iniciador, se produce una respuesta inflamatoria incontrolada, que causa lesión tisular y desencadena respuestas locales y sistémicas. La insuficiencia respiratoria es habitual en las primeras 72 horas después de la lesión original, la insuficiencia hepática es habitual en los primeros 5-7 días, la hemorragia gastrointestinal puede suceder a los 10-15 días, y la insuficiencia renal es habitual a los 11-17 días. Las tasas de mortalidad para MODS varían del 30% al 100%. Actualmente no existe régimen terapéutico eficaz disponible para revertir el MODS establecido.

En algunos ejemplos, las composiciones y métodos descritos en este documento pueden usarse para el tratamiento de insuficiencia orgánica, por ejemplo, insuficiencia multiorgánica.

Formulaciones farmacéuticas

Las composiciones descritas en este documento, por ejemplo, una composición de MSC-CM y agentes activos aislados a partir de la misma, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Como se usa en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, dichos medios pueden usarse en las composiciones de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica generalmente se formulará para que sea compatible con su vía pretendida de administración. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones inyectables estériles o dispersiones. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida al grado que exista fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe estar conservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (por ejemplo, un agente descrito en este documento) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes necesarios entre los enumerados anteriormente. En caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

En un ejemplo, las composiciones de MSC-CM se preparan con vehículos que protegerán a las composiciones contra la rápida eliminación desde el organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse de forma comercial en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden

prepararse de acuerdo con métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.522.811.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase, o dispensador junto con instrucciones para su administración. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas pueden incluirse como parte de un kit. Dichos kits también están dentro del alcance de la presente invención.

Métodos de detección

10 Se describen en este documento métodos para identificar los compuestos activos contenidos en una composición de MSC-CM, por ejemplo, en la fracción de unión a heparina de una composición de MSC-CM.

15 En algunos ejemplos, los compuestos activos contenidos en una composición de MSC-CM, por ejemplo, en la fracción de unión a heparina de una composición de MSC-CM, pueden obtenerse analizando sistemáticamente cada uno de los compuestos contenidos en una composición de MSC-CM. Como alternativa, una composición de MSC-CM puede fraccionarse, por ejemplo, por tamaño y/o carga, y pueden identificarse las fracciones activas. Entonces, cada una de las fracciones activas puede fraccionarse adicionalmente, e identificarse las fracciones activas de las mismas. Esto puede repetirse una cantidad deseada de veces, y después pueden identificarse los componentes de la fracción activa, por ejemplo, usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, HPLC, espectrometría de masas), y después pueden ensayarse algunos o todos los componentes para su actividad en el sistema de ensayo. Si se identifican dos o más compuestos activos, pueden combinarse para formar una composición combinada para conseguir algo de o toda la eficacia del MSC-CM completo, por ejemplo, una composición combinada con al menos el 40%, por ejemplo, el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más de la eficacia del MSC-CM. En algunos ejemplos, se ensaya la actividad terapéutica de componentes individuales de una composición de MSC-CM, o fracciones de diferente tamaño de una composición de MSC-CM usando ensayos *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo, de crecimiento, proliferación, supervivencia, morfología y función de hepatocitos; varios de dichos ensayos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* adecuados pueden incluir ensayos para analizar la proliferación de hepatocitos, por ejemplo, mediante la incorporación de BrdU; la apoptosis de hepatocitos, por ejemplo, analizando los cambios morfológicos asociados con la apoptosis/necrosis, o usando, por ejemplo, el ensayo TUNEL; RT-PCR para detectar alteraciones en los niveles de expresión de ARNm de IL-10, IL-6, HGF, EGF, y TNF-I; proliferación de células estrelladas; apoptosis de células estrelladas; ELISA para detectar expresión alterada de IL-10, TNF-I, IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-1ra, y quimiotaxis de células inmunitarias. Dichos ensayos *in vivo* incluyen análisis de histologías hepáticas, por ejemplo, después de biopsia del hígado o después del sacrificio de un modelo animal y estudios de supervivencia de un modelo animal. El objetivo de dicha experimentación de detección es identificar el componente biológicamente activo de una composición de MSC-CM. La expresión "componente biológicamente activo de una composición de MSC-CM", como se usa en este documento, se refiere a un componente de una composición de MSC-CM que produce uno o más de los efectos beneficiosos descritos en este documento, por ejemplo, modula la señalización de células estrelladas, promueve la proliferación de hepatocitos, inhibe la muerte celular de hepatocitos, o induce cualquier cambio en los niveles de ARNm o proteínas en hepatocitos como se describe en este documento. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* para detectar dichos efectos son conocidos en la técnica y se describen en este documento.

Kits

45 Se describen adicionalmente en este documento kits. En algunos ejemplos, los kits comprenden una o más dosis de una composición de MSC-CM. La composición, forma, y tipo de forma de dosificación para el régimen de inducción y el régimen de mantenimiento pueden variar dependiendo de las necesidades del sujeto. Por ejemplo, la forma de dosificación puede ser una forma de dosificación parenteral (por ejemplo, administración en bolo intravenoso), una forma de dosificación oral, una forma de dosificación de liberación retardada o controlada, una forma de dosificación tópica y a la mucosa, incluyendo cualquier combinación de las mismas.

55 En un ejemplo particular, un kit puede contener uno o más de los siguientes en un envase o recipiente: (1) una o más dosis de una composición de MSC-CM, por ejemplo, en forma de solución líquida o congelada o liofilizadas; (2) uno o más tampones farmacéuticamente aceptables; (3) uno o más vehículos para la administración de la dosis, tal como una o más jeringas, un catéter, una bomba, un hidrogel, y una forma de administración de formulación de depósito; (4) uno o más agentes bioactivos adicionales para administración concurrente o secuencial con una composición de MSC-CM, tales como ingredientes active suplementarios (SAI); y (5) instrucciones para su administración. También pueden usarse kits en que se encuentran dos o más, incluyendo todos, los componentes (1)-(5), en el mismo recipiente.

60 Cuando se suministra un kit, los diferentes componentes de las composiciones incluidos pueden envasarse en recipientes diferentes y mezclarse inmediatamente antes de su uso. Dicho envasado de los componentes por separado puede permitir un almacenamiento a largo plazo sin pérdida de las funciones de los componentes activos. Cuando se incluye más de un agente bioactivo en un kit particular, los agentes bioactivos pueden (1) envasarse por separado y mezclarse por separado con adyuvantes o excipientes apropiados (similares o diferentes, pero compatibles) inmediatamente antes de su uso, (2) envasarse juntos y mezclarse juntos inmediatamente antes de su

uso, o (3) envasarse por separado y mezclarse juntos inmediatamente antes de su uso. Si los compuestos elegidos permanecen estables después de la mezcla, los compuestos pueden mezclarse en un momento antes de su uso diferente a inmediatamente antes de su uso incluyendo, por ejemplo, minutos, horas, días, meses, años, y en el momento de la fabricación.

Las composiciones incluidas en kits particulares pueden suministrarse en recipientes de cualquier tipo de modo que se conserve de forma óptima la vida de los diferentes componentes y no se adsorban o alteren por los materiales del recipiente. Los materiales adecuados para estos recipientes pueden incluir, por ejemplo, vidrio, polímeros orgánicos (por ejemplo, policarbonato y poliestireno), cerámica, metal (por ejemplo, aluminio), una aleación, o cualquier otro material típicamente empleado para alojar reactivos similares. Recipientes ejemplares pueden incluir, sin limitación, tubos de ensayo, viales, matraces, frascos, jeringas, y similares.

Como se ha indicado anteriormente, los kits también pueden suministrarse con materiales de instrucción. Estas instrucciones pueden estar impresas y/o pueden suministrarse, sin limitación, como un medio legible electrónico, tal como un disquete, un CD-ROM, un DVD, un disco Zip, una cinta de video, una cinta de audio, y un dispositivo de memoria flash. Como alternativa, las instrucciones pueden publicarse en un sitio web de Internet o pueden distribuirse al usuario como un correo electrónico.

Cartuchos de biorreactor extracorpóreo con MSC

También se incluyen dentro de la presente invención EB, y cartuchos para su uso en los mismos que incluyen MSC (cartuchos de MSC-EB). Cada cartucho puede suministrarse como un cartucho individual para su uso en un dispositivo extracorpóreo de soporte hepático, descrito anteriormente. Los cartuchos de MSC-EB pueden suministrarse para uso único con un paciente durante una franja de tiempo de hasta 24 horas. Pueden suministrarse múltiples cartuchos para su uso en un único paciente, estipulado por el régimen de tratamiento de un sujeto. Se conocen en la técnica varias configuraciones adecuadas de cartuchos, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.270.192; 7.160.719; 6.858.146; 6.582.955; 6.759.245; Dixit y Gitnick, Eur. J. Surg. Suppl. (582):71-6 (1998); y Legallais et al., J. Memb. Sci. 181:81-95 (2001). Dichos cartuchos pueden incluir, por ejemplo, fibras huecas o placas planas. Generalmente, una membrana semi-permeable separará el fluido biológico a tratarse de las células, y dicha membrana puede formar parte de los cartuchos, por ejemplo, una pared exterior del cartucho. Los cartuchos se configuran para que se inserten en un dispositivo BAL, por ejemplo, como parte de un biorreactor o como un biorreactor completo.

La FIG. 27 es una ilustración esquemática de un cartucho de biorreactor de núcleo hueco 100, que contiene varias fibras huecas 140, y una entrada 110 y salida 120. Las fibras huecas serán semi-permeables, permitiendo el paso de los factores activos secretados por las MSC a la sangre o el plasma. La FIG. 28 es una vista en sección transversal del biorreactor 100 en la línea A-A, que ilustra las fibras huecas 140, que tienen un lumen interior del capilar 130 y están rodeadas por el espacio extracapilar 150. En biorreactores de fibra hueca, las MSC pueden estar en el lumen 130, mientras que la sangre o el plasma fluye a través del espacio extracapilar 150, o viceversa. En este caso, el compartimento que incluye las MSC se considera el compartimento de células, mientras que el compartimento a través del cual fluye la sangre o el plasma es el compartimento de tratamiento de fluido.

La FIG. 29 es una ilustración esquemática de un biorreactor de placa plana o de dos compartimentos 200, que incluye un compartimento de tratamiento de fluido 210 y un compartimento de células 220, separados por una membrana semi-permeable 230. La sangre o el plasma fluye a través del compartimento de tratamiento de fluido 210 a lo largo de la vía 250. El compartimento de células 220 incluye las MSC 240 (y, opcionalmente, hepatocitos). Este tipo de biorreactor se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.759.254.

También se proporcionan kits que pueden contener uno o más de los siguientes en un envase o recipiente: (1) un cartucho de MSC-EB; (2) uno o más tampones farmacéuticamente aceptables; (3) instrucciones para instalar el MSC-EB en un BAL específico. También pueden usarse realizaciones en que dos o más, incluyendo todos, los componentes (1)-(3), se encuentran en el mismo recipiente.

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1 - Aislamiento, cultivo y expansión ex vivo de MSC

Se aislaron MSC humanas de aspirados de médula ósea disponibles en el mercado (MSC derivadas de médula ósea) obtenidos de un único donante varón de 25 años de edad (Clonetics-Poietics, Walkersville, MD), como se ha descrito previamente (Mauney et al., Biomaterials, 26:6167-6175, 2005). En resumen, se sembraron en placa aspirados de médula ósea completa a una densidad de 8-10 μ l de aspirado/cm² en matraces de cultivo tisular de 175 cm² y se cultivaron hasta confluencia en medio de expansión a 37°C y 5% de dióxido de carbono. El medio de expansión consistía en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero fetal de ternero al 10%,

100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y 1 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (Life Technologies, Rockville, MD). Después de 4 días de cultivo, se retiraron las células hematopoyéticas no adherentes lavando con PBS, y se cultivaron las monocapas de células adherentes con cambios de medio 2-3 veces a la semana. Las células se pasaron usando tripsina al 0,25%/EDTA al 0,1%, se subcultivaron a una densidad de 5×10^3 células/cm² y se usaron para experimentos durante los pases 4-7. Las MSC aisladas se mantuvieron como se ha descrito previamente (Pittenger et al., Science, 284:143-147, 1999).

Ejemplo 2 - Caracterización de MSC derivadas de médula ósea

Las células madre mesenquimáticas (MSC) poseen varias características únicas y bien establecidas que permiten que estas células se distingan de otras células. Dichas características incluyen la capacidad de las células de dar lugar de forma reproducible (es decir, diferenciarse) en adipocitos, osteoblastos, y condrocitos *in vitro* (Pittenger et al., Science, 284:143-147, 1999); y la capacidad de las células de recuperar trastornos tisulares mesenquimáticos en seres humanos (Horwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:8932-8937, 2002). Además, las MSC humanas pueden identificarse adicionalmente evaluando la expresión en superficie celular de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD11b, CD14, CD18, CD34, CD36, y CD45 (Pittenger et al., Circ. Res., 95:9-20, 2004).

Las MSC aisladas usando los métodos descritos anteriormente se caracterizaron usando dos técnicas distintas.

En primer lugar, se evaluó la multipotencia de las MSC derivadas de médula ósea *in vitro* cultivando las células en medio de inducción de (1) osteogénesis, (2) adipogénesis o (3) condrogénesis durante 2-3 semanas, con cambios de medio cada 3 días, del siguiente modo.

(1). El medio osteogénico consistía en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado con dexametasona 0,1 µM, fosfato de β-glicerol 10 mM, ácido ascórbico (AsA) 0,2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

(2). El medio de adipogénesis consistía en IMDM suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM, hidrocortisona 1 µM, indometacina 0,1 mM, suero de conejo al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

(3). Para estudios de condrogénesis, las células se transfirieron a un tubo de polipropileno de 15 ml y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos para formar una micromasa sedimentada que después se trató con medio condrogénico. El medio de condrogénesis consistía en DMEM de alto contenido en glucosa (Chemicon International, Temecula, CA) suplementado con dexametasona 0,1 µM, 50 µg/ml de AsA, 100 µg/ml de piruvato sódico, 40 µg/ml de prolina, 10 ng/ml de TGF-β₁, 50 mg/ml de ITS+ premezcla (Becton Dickinson; 6,25 µg/ml de insulina, 6,25 µg/ml de transferrina, 6,25 ng/ml de ácido selenioso, 1,25 mg/ml de albúmina sérica bovina, y 5,35 mg/ml de ácido linoleico), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

El fenotipo de las células diferenciadas se evaluó después de 2-3 semanas de inducción, del siguiente modo.

(1). Se determinó el contenido mineral en condiciones osteogénicas usando coloración de Von Kossa, del siguiente modo. En resumen, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se lavaron dos veces con PBS, se tiñeron con nitrato de plata al 1% bajo luz de 100 W durante 60 minutos y se lavaron con agua desionizada (DI).

(2). Se determinó la acumulación de lípidos después de condiciones adipogénicas por tinción con aceite Red O, del siguiente modo. En resumen, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se lavaron dos veces con PBS, se tiñeron con aceite Red O durante 15 minutos y se lavaron con agua DI.

(3). Se evaluó el contenido de proteoglicanos después de condiciones condrogénicas por tinción con safranina-O, del siguiente modo. En resumen, el microsedimento se fijó en paraformaldehído al 4%, se diluyó en serie en etanol y se incorporó en bloques de parafina. Los bloques se seccionaron y se tiñeron con safranina-O.

Todas las imágenes se capturaron en un microscopio Nikon Eclipse E800 Upright.

Los resultados mostraron que se inducían la osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis en sus respectivos medios de inducción. La tinción para osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis se visualiza por deposición de minerales, gotas de lípidos y sulfato de condroitina, respectivamente.

En segundo lugar, las MSC se inmunofenotiparon por citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). El panel de antígenos de superficie incluía CD14, CD34, CD44, CD45, y CD106 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ).

Como se esperaba, el perfil de antígenos de superficie de las MSC aisladas fue CD14-, CD105+, CD34-, CD45-, CD106+ y CD44+. Estas observaciones son coherentes con los informes previos de expresión de marcadores superficiales de MSC indiferenciadas (Pittenger et al., Circ. Res., 95:9-20, 2004).

Por tanto, los métodos usados eran adecuados para el aislamiento de MSC.

Ejemplo 3 - Inmunomodulación de células estrelladas por MSC

Este ejemplo demuestra que las MSC son capaces de modular las células estrelladas hepáticas activadas (SC), probablemente mediante mecanismos paracrinos.

5 Generalmente se cree que la fibrosis hepática, el precursor de cirrosis, es el resultado de un desequilibrio en la síntesis de matriz extracelular (ECM) y de degradación mediada principalmente por SC.

10 Las SC son pericitos frecuentemente encontrados en el espacio perisinusoidal localizado entre los sinusoides y los hepatocitos en el hígado. En un hígado normal y sano, las SC son quiescentes y están principalmente implicadas en el almacenamiento de vitamina A. Después de lesión hepática, las SC experimentan un cambio fenotípico en células proliferativas, de tipo miofibroblasto, positivas a α -actina de músculo liso, con capacidad aumentada de síntesis de colágeno. Las SC pueden distinguirse fácilmente por las grandes gotas de lípidos observadas en el citoplasma de estas células.

15 La activación *in vivo* de SC se divide en una respuesta fibrogénica e hiperplásica que está mediada por muchas señales autocrinas y paracrinas. Se ha informado de la resolución espontánea de la fibrosis hepática en diferentes modelos de rata de lesión hepática crónica (Abdel-Aziz, et al., Am. J. Pathol., 137:1333-1342, 1990; Iredale et al., J. Clin. Invest. 102:538-549, 1998). Esta resolución se ha correlacionado con síntesis disminuida de colágeno de tipo I e inhibidor tisular de los transcritos 1 y 2 de metaloproteinasas de matriz (TIMP), con una disminución concomitante en la cantidad de SC α -SMA positivas (Iredale et al., J. Clin. Invest. 102:538-549, 1998). No está claro si la disminución en la cantidad de SC activadas se debe a apoptosis selectiva o a reversión a un estado quiescente por indicios microambientales.

25 Estos datos demuestran que la terapia con MSC es útil en el tratamiento de trastornos causados por SC activadas en un sujeto, por ejemplo, fibrosis hepática.

3A- Aislamiento de SC

30 Se aislaron SC primarias de rata de ratas Lewis hembra adultas de 2-3 meses de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) que pesaban 180-200 g, como se ha informado previamente en detalle para el aislamiento de hepatocitos (Dunn et al., FASEB J., 3:174-177, 1989). En resumen, se obtuvo el sobrenadante de las etapas de purificación de hepatocitos, que contenía células no del parénquima del hígado y se trató con DNasa I durante 15 minutos a 37°C, se centrifugó a 300 g durante 20 minutos, y después se resuspendió en PBS. Esta suspensión celular se sometió a una separación en gradiente de densidad estratificando cuidadosamente la suspensión sobre la parte superior de un gradiente discontinuo del 40%-60% de Percoll isotónico. Las capas después se centrifugaron de 900 g durante 25 minutos. La capa de densidad más baja, enriquecida en SC, después se retiró, se diluyó con PBS y se centrifugó a 900 g durante 25 minutos. Las células se resuspendieron en medio SC (medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con FBS al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin) y se cultivaron en matraces de cultivo tisular de 175 cm². Las SC se cultivaron durante 10-14 días en plástico de cultivo tisular, que condujo a su activación, antes de su uso en los experimentos. La pureza y diferenciación de cultivos SC se evaluaron realizando inmunofluorescencia para desmina, un marcador de miofibroblastos, y α -SMA, un marcador para miofibroblastos en un estado más avanzado de diferenciación.

45 Se realizó detección inmunofluorescente después de 15 minutos de fijación en solución de paraformaldehído al 4% preparada en solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de un único lavado con PBS. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron incubando con tampón de bloqueo (suero de caballo normal al 10%, Triton X-100 al 0,025% y dimetilsulfóxido al 0,5% en PBS) durante 45 minutos. Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -SMA (GeneTex Inc, San Antonio, TX; dilución 1:100) o anticuerpo policlonal de cabra anti-desmina (Santa Cruz Biotechnology-clon C18; dilución 1:100) en tampón de bloqueo durante 60 minutos. Después de lavar tres veces con tampón de bloqueo, se realizó incubación con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con rodamina red-X (dilución 1:250) o anticuerpo secundario de burro anti-cabra conjugado con FITC (dilución 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante 60 minutos, respectivamente. Se realizaron tres lavados con tampón de bloqueo, incubando con 5 μ g/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) durante 5 minutos durante el primer lavado. Las muestras sin anticuerpo primario se usaron como controles negativos. Se realizó microscopía fluorescente y de contraste de fase en un microscopio invertido Zeiss AXIOVERT 200 M.

60 Todas las células se tiñeron positivamente tanto para desmina como α -SMA después de 10 días de cultivo, lo que demuestra aislamiento y purificación satisfactorios de células SC.

3B - Sistemas de cultivo de MSC y SC

65 Se cocultivaron SC aisladas con MSC, se aislaron y se caracterizaron como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, usando sistemas directos o indirectos, del siguiente modo.

Sistema de cocultivo directo: se sembraron SC y MSC juntas a una relación de 1:1 en cada pocillo de una placa de seis pocillos (Corning Costar, Acton, MA).

5 Sistema de cocultivo indirecto: se cocultivaron SC y MSC usando una configuración Transwell. Se sembraron aproximadamente $1,0 \times 10^5$ SC en la cámara inferior con $0-1,0 \times 10^5$ MSC sembradas en los insertos de membrana. Las MSC se remplazaron con células endoteliales de vena umbilical humana para los controles. Los cocultivos se mantuvieron en medio SC durante 4 días.

10 3C - Las MSC inhiben la síntesis de colágeno en células estrelladas activadas

Se midió la secreción por SC de péptido C de procolágeno tipo-I (PIP), un fragmento peptídico escindido de colágeno precursor tras secreción extracelular, después de cuatro días de cocultivo indirecto como una función de la relación de MSC a SC, permaneciendo la cantidad de SC constante.

15 Se cuantificó la síntesis de colágeno usando un ELISA para el péptido C de procolágeno tipo-I (Takara-Bio Inc., Shiga, Japón). Después del periodo de cocultivo, el inserto Transwell que contenía MSC se retiró y se remplazó el medio en las SC con medio fresco. Veinticuatro horas después, se recogió el medio y se midió la concentración de péptido C de procolágeno tipo-I por ELISA.

20 Los niveles de PIP secretados por SC activadas (101 ± 11 pg/106 células/día) estaban significativamente reducidos a una relación MSC:SC de cocultivo de 1:10 (41 ± 18 pg/106 células/día; $p = 0,0491$), con una reducción del 66% a una relación 1:1 de cocultivo (34 ± 5 pg/106 células/día; $p = 0,004$).

25 No se observó secreción reducida de PIP en cocultivos de SC con células endoteliales de vena umbilical humana (MVEC), lo que sugiere un efecto específico de MSC. Estos resultados sugieren que factores solubles liberados por MSC inhiben la síntesis de procolágeno en SC activadas.

30 3D - Las MSC inducen apoptosis en SC activadas

La disminución en la fibrosis hepática observada después del trasplante de MSC está acompañada por una reducción en la cantidad de células α -SMA+ (estrelladas activadas) observada por tinción inmunohistológica (Sakaida et al., Hepatology, 40:1304-1311, 2004; Fang et al., Transplantation, 78:83-88, 2004; Zhao et al., World J. Gastroenterol., 26:6167-6175, 2005). El mecanismo por el cual sucede la reducción en la cantidad de células estrelladas activadas no está claro; existen evidencias de capacidad proliferativa disminuida, una reversión a un fenotipo quiescente y de muerte de células apoptóticas. Por lo tanto, se examinó el destino de las SC activadas cocultivadas indirectamente con MSC midiendo el grado de desdiferenciación, proliferación y muerte de SC.

40 La desdiferenciación o reversión de nuevo de las SC a un estado quiescente se determinó por análisis de la expresión de α -SMA, como se ha descrito anteriormente. La expresión de α -SMA no disminuyó después de cocultivo. Esta observación sugiere que las SC no revierten a un fenotipo quiescente en presencia de MSC.

45 Se evaluó la proliferación de SC usando citometría de flujo para cuantificar la población de SC que entra en la fase S del ciclo celular, medida por incorporación de BrdU, después de cocultivo con MSC.

50 En resumen, veinticuatro horas antes del análisis, se retiró el inserto de Transwell que contenía MSC y los cultivos de SC se trataron con BrdU $10 \mu\text{M}$. Después se lavaron las células con PBS tres veces, se trataron con tripsina y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Para la fijación, se resuspendió el sedimento en etanol al 70% durante 45 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó y se lavó dos veces con PBS. Las células se incubaron con HCl 4 M durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un tampón de bloqueo compuesto por PBS y FBS al 10% durante 10 minutos. Después se incubaron las células con anticuerpo anti-BrdU conjugado con colorante Alexa-Fluor 488 durante 60 minutos a 37°C , se centrifugaron y se lavaron con PBS. Los controles negativos consistían en células incubadas sin el anticuerpo. Las células marcadas de forma fluorescente se analizaron por citometría de flujo.

55 Como se muestra en la FIG. 1, se observó una disminución, del $30 \pm 9\%$ al $15 \pm 4\%$, en SC BrdU⁺ a una relación 1:1 de cocultivo ($p = 0,043$).

60 La observación microscópica de cocultivos indirectos indicó una disminución en la cantidad de SC que se adhieren a la placa de poliestireno. Para determinar si la apoptosis justificaba los cambios observados en la cantidad de SC después del cocultivo, se usó tinción con Anexina-V-FITC y citometría de flujo.

65 En resumen, se determinó la cuantificación de apoptosis/necrosis celular usando el kit de Anexina-V FLUOS (Roche, Indianapolis, IN) según las instrucciones del proveedor. Después de cocultivo, se recuperaron las SC y se tiñeron con Anexina V durante 20 minutos y se analizaron usando citometría de flujo. SC privadas de suero sirvieron como control positivo para apoptosis. Los resultados se sincronizaron con las señales fluorescentes mayores de

autofluorescencia de SC.

- 5 En SC cultivadas en solitario, hubo un nivel basal de apoptosis (25%). Usando el sistema de cocultivo indirecto con una relación de 1:1, hubo un aumento aproximado de 2,5 veces en la apoptosis (55%). El cocultivo con fibroblastos provocó un nivel de apoptosis que fue similar a SC en solitario (32%), lo que demuestra que el efecto proapoptótico era específico de MSC.

Tabla 1: Apoptosis de SC activadas como una función de la cantidad de MSC

Relación MSC:SC	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Media (%)	Des. típ. (%)	Valor <i>p</i>
0	12,24	18,47	16,23	15,87	15,68	2,54	-
1:10 ³	18,37	34,16	22,24	14,95	22,43	8,37	0,1008
1:10 ²	25,54	26,53	26,00	25,96	26,01	0,41	8,63 x 10 ⁻³
1:10	34,22	23,2	36,31	38,08	32,95	6,69	3,56 x 10 ⁻³
1:1	53,53	44,71	45,85	36,92	42,97	11,64	6,98 x 10 ⁻⁴

- 10 Como se muestra en la tabla 1, también sucedió muerte significativa de SC a relaciones de cocultivo de MSC:SC de 1:100 o mayores, lo que sugiere que pequeñas cantidades de MSC pueden liberar potentes moléculas proapoptóticas que inducen muerte de SC.

- 15 Tomados juntos, estos resultados *in vitro* implican que el trasplante de MSC *in vivo* puede mejorar o resolver la fibrosis hepática a través de un mecanismo que implica un efecto proapoptótico altamente selectivo sobre SC activadas.

3E - Las MSC secretan IL-10 y TNF- α

- 20 Se expusieron MSC a IL-1, IL-6, o factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), todos los cuales son citoquinas que se sabe que están implicadas en fibrosis hepática, durante 24 horas. La secreción de proteína IL-10 y los niveles de ARNm se determinaron por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y RT-PCR, respectivamente.

- 25 En resumen, se trataron MSC humanas con medio de expansión de MSC suplementado con 2,5 ng/ml de IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 5 ng/ml de IL-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), o 25 ng/ml de TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN) durante 24 horas. Las MSC cultivadas en medio de expansión sirvieron como control negativo. Después del tratamiento, se recogieron las células y se analizaron para los cambios en la expresión génica.

- 30 Se determinó la cuantificación de IL-10 humana usando un ELISA según las instrucciones del proveedor (Endogen, Rockford, IL). Los sobrenadantes se muestrearon después de 48 horas de cocultivo y se almacenaron at -20°C hasta el análisis.

- 35 Se extrajo el ARN de 0,1-1,0 x 10⁶ MSC usando el kit de purificación de ARN NUCLEOSPIN (BD Biosciences, Palo Alto, CA) según las instrucciones del fabricante. Se transcribió de forma inversa aproximadamente 1 μ g de ARNm total a ADNc usando el kit de RT-PCR ONESTEP (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante y se amplificó en un termociclador Perkin Elmer-Cetus 480. Las condiciones de ciclado fueron: 1) 50°C durante 30 minutos; 2) 95°C durante 15 minutos; 3) 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto; y 4) una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se amplificó IL-10 usando una combinación de los oligonucleótidos con sentido y antisentido SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, para producir un producto de PCR de 364 pares de bases (pb). Se amplificó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando una combinación de los oligonucleótidos con sentido y antisentido SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, para producir un producto de PCR de 238 pb.

- 45 5'-AAGCCTGACCACGCTTTCTA-3' SEQ ID NO: 1
5'-GTAGAGCGGGTTTCACCA-3' SEQ ID NO: 2
5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' SEQ ID NO: 3
5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3' SEQ ID NO: 4

- 50 Como se muestra en las FIG. 2-3, la exposición a IL-6 (2,5 ng/ml) o TNF- α (25 ng/ml), citoquinas que están significativamente elevadas en modelos de lesión hepática, condujo a regulación positiva tanto del ARNm de IL-10 (FIG. 2) como de la secreción de proteínas en el medio de cultivo (FIG. 3).

- 55 Como se muestra en la FIG. 4, se descubrió que IL-6 y TNF- α estaban ambos presentes en el sistema de cocultivo directo de SC/MS, como se determina por ELISA, como se ha descrito anteriormente. Se secretó IL-6 por SC activadas (65 \pm 1 pg/10⁶ células/día), mientras que se secretó TNF- α por MSC (23 \pm 1 pg/10⁶ células/día).

Como se muestra en la FIG. 5, las SC activadas son capaces de inducir que las MSC secreten IL-10 cuando las células se cocultivan directamente a una relación de 1:1 (54 pg/10⁶ células/día). Estos niveles fueron similares a los niveles observados en la FIG. 6.

Como se muestra en la FIG. 6, a una relación de MSC:SC de al menos 1:10, las SC eran capaces de inducir expresión elevada de ARNm de IL-10 en MSC cuando se cultivaban indirectamente usando la configuración Transwell descrita anteriormente. Usando el mismo sistema, la secreción de proteína IL-10 aumentó hasta 32 ± 7 pg/10⁶ células/día ($p < 0,01$).

Como se detectó tanto IL-6 como TNF- α en cocultivos de MSC-SC, se realizó neutralización por anticuerpos monoclonales para determinar el papel de IL-6 y TNF- α sobre la liberación de IL-10 por MSC.

Se realizó la neutralización de citoquinas específicas durante cocultivos indirectos. Para todos los experimentos de neutralización, la relación de MSC a SC fue 1:1. Se diluyeron anticuerpo anti-IL-10 (BioLegend, San Diego, CA), TNF- α , (BioLegend, San Diego, CA), o HGF humana y anti-IL-6 de rata (Cell Sciences, Canton, MA) en medio SC basándose en las concentraciones de la mitad de inhibición máxima dadas por el fabricante. Se añadió medio fresco con anticuerpos neutralizantes después de 48 horas de cocultivo.

Como se muestra en la FIG. 7, se observó una disminución significativa en la liberación de IL-10 (48 ± 4 a 18 ± 1 pg/10⁶ células/día; $p < 0,01$) cuando los cocultivos indirectos se trataron con 1250 ng/ml de anticuerpos neutralizante anti-IL-6. No se observó diferencia significativa después del tratamiento con anticuerpo neutralizante anti-TNF- α . Tomados juntos, estos datos implican que las SC activadas secretan IL-6, que induce que las MSC secreten IL-10.

3F - Las MSC inhiben la síntesis de colágeno por SC activadas y la proliferación mediante señalización paracrina de IL-10 y TNF- α

Para determinar si la supresión previamente observada de la síntesis de colágeno y la proliferación en SC activadas, después de cocultivo indirecto con MSC, estaba mediada por IL-10 y TNF- α derivados de MSC, se midieron los niveles de secreción de PIP por SC activadas después de cuatro días de cocultivo indirecto con MSC en presencia de anticuerpos neutralizantes contra IL-10, TNF- α , o ambos.

Se observó normalización parcial de la secreción de PIP después de neutralización de IL-10 o TNF- α a concentraciones de anticuerpos de 1000 ng/ml y 500 ug/ml o mayores, respectivamente. La neutralización tanto de IL-10 como de TNF- α en cocultivo condujo a una elevación sinérgica en los niveles de PIP desde 79 ± 9 pg/10⁶ células/día hasta 215 ± 20 pg/10⁶ células/día ($p = 0,002$) a concentraciones máximas de anticuerpos.

Se analizaron los efectos de TNF- α e IL-10 derivados de MSC sobre la proliferación de SC activadas. La neutralización de los efectos de IL-10 en un cocultivo 1:1 condujo a una elevación marginal en la cantidad de células BrdU-positivas, desde el 12% hasta el 15% a la concentración máxima de anticuerpos. La neutralización de TNF- α provocó un efecto más significativo sobre la proliferación con un aumento en las células BrdU-positivas desde el 13% hasta el 33% ($p = 0,0197$). La neutralización de ambas citoquinas condujo al aumento más significativo de la población en proliferación (del 13% hasta el 44%).

Estos datos sugieren una sinergia entre las rutas de señalización de TNF- α e IL-10 ($p = 0,009$).

3G - El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) derivado de MSC induce la apoptosis en SC activadas

Dada la observación de que una cantidad relativamente pequeña MSC podría causar apoptosis de SC, se analizaron sobrenadantes de cocultivo indirecto para potentes señales pro-apoptóticas.

Como se muestra en la FIG. 8, se detectó una cantidad considerable de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en mono- y cocultivos y se produjo a niveles aproximadamente equivalentes tanto por SC como por MSC.

Tabla 2: Apoptosis de SC activadas como una función de la neutralización de HGF

Anti-HGF ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Media (%)	Des. típ. (%)	Valor p
0	53,53	44,71	45,85	36,92	42,97	11,64	-
0,05	43,66	22,11	25,67	21,5	28,24	10,45	0,2056
0,5	39,32	11,87	19,26	23,94	23,59	11,60	0,1136
1,5	18,47	21,17	15,9	17,25	18,20	2,24	0,0390
5,0	13,81	17,76	14,38	-	15,32	2,14	0,0413

Como se muestra en la tabla 2, se observó una disminución en la apoptosis como una función del anticuerpo neutralizante contra HGF. Esta disminución en la apoptosis no sucedió cuando los cultivos se incubaban con un anticuerpo de control sin especificidad por HGF. Estos datos apoyan un papel para HGF derivado de MSC en la aceleración de la tasa de apoptosis de SC.

En resumen, los datos presentados en el Ejemplo 3 demuestran que las MSC son capaces de inhibir la función proliferativa y fibrogénica de SC activadas de un modo paracrino y como una función de la cantidad de MSC. Esta

inhibición está causada por IL-10 y TNF- α derivados de MSC, que actúan de forma sinérgica. La secreción de IL-10 por MSC es una respuesta dinámica a la secreción de IL-6 por SC activadas. La secreción de IL-10 por MSC en respuesta a TNF- α se observó después de estimulación exógena, pero no durante mono- o cocultivo. Este resultado refleja, probablemente, los altos niveles de estimulación usados *in vitro* (por ejemplo, aproximadamente 25 ng ml⁻¹) en comparación con los niveles bajos medidos en cocultivo (por ejemplo, aproximadamente 2,5 ng ml⁻¹). Esta observación implica fuertemente que es necesaria una concentración umbral de TNF- α para inducir la expresión de IL-10 en MSC. IL-6 y TNF- α también aumentan la señalización factor nuclear (NF)-kappaB en diversos tipos celulares. Por tanto, NF-kappaB también puede desempeñar un papel en la expresión de citoquinas de MSC durante la inflamación.

Las MSC también indujeron apoptosis en SC activadas, que está mediada por HGF. El efecto de HGF e IL-10 derivados de MSC es, probablemente, suplementario a la señalización autocrina de estas proteínas en SC. Los datos descritos anteriormente se resumen en la FIG. 9.

Estos estudios demuestran, por primera vez, que las MSC actúan a través de múltiples mecanismos para coordinar una respuesta dinámica, integrada a la inflamación, particularmente fibrosis. Mecanismo inmunoprotectores similares también pueden influir en el fenotipo de los hepatocitos, células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales, y células inmunitarias que se infiltran en el hígado durante la inflamación.

Ejemplo 4 - Terapia acelular basada en MSC - Generación de medio condicionado de MSC (MSC-CM) acelular

Este ejemplo demuestra la producción de una composición de MSC-CM.

Se aislaron las MSC y se caracterizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 y Ejemplo 2. En algunas realizaciones, las MSC se caracterizaron basándose en la detección de marcadores expresados en superficie celular (por ejemplo, CD14-, CD105+, CD34-, CD45-, CD106+ y CD44+). Las células que no satisficieron el criterio de caracterización descrito en el Ejemplo 2 se descartaron. En algunas realizaciones, se proporcionaron MSC humanas por el Tulane Center for Gene Therapy.

Se generó una composición de MSC-CM cultivando MSC hasta una densidad celular máxima del 70-80% de confluencia. No se permitió que las células experimentaran diferenciación. En otras palabras, las MSC se mantuvieron en un estado indiferenciado. En algunas realizaciones, se controló la diferenciación de las MSC usando el criterio de caracterización descrito en el Ejemplo 2. En algunas realizaciones, una confluencia del 70-80% corresponde a 1×10^6 MSC por matraz de calidad de cultivo tisular de 175 cm². En algunas realizaciones, se generó una composición de MSC-CM usando 2×10^6 MSC, que se obtuvieron usando dos matraces de calidad de cultivo tisular de 175 cm² conteniendo cada matraz 1×10^6 células.

El MSC-CM se preparó del siguiente modo;

- (1) Se lavaron minuciosamente MSC al 70-80% confluentes con solución salina tamponada con fosfato (PBS);
- (2) Se cultivaron las MSC de (1) en 15 ml de DMEM sin suero suplementado con albúmina sérica bovina al 0,05% para evitar la agregación de proteínas;
- (3) Las MSC se cultivaron durante 24 horas;
- (4) Se recogió el medio de cultivo de (3); y
- (5) El medio de cultivo recogido se concentró a factor 25 (por ejemplo, 25 veces) usando ultrafiltración con un punto de corte de 3 kD.

La composición de MSC-CM se concentró usando unidades de ultrafiltración (Amicon Ultra-PL 3, Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

La composición de MSC-CM se fraccionó en fracciones de unión a heparina y no de unión a heparina. Para los experimentos de fraccionamiento, se pasó una composición de MSC-CM concentrada sobre una columna de heparina-agarosa según las instrucciones de proveedor. En resumen, las columnas se cebaron con 10 equivalentes de tampón de unión (fosfato sódico 10 mM, pH 7,0). La muestra se aplicó, seguida de 10 volúmenes equivalentes de tampón de unión, que se consideró como la fracción no unida a heparina. La fracción unida se eluyó con 10 volúmenes de tampón de unión suplementado con NaCl 1 M. Se recogieron por separado las fracciones de flujo continuo y eluidas. Las fracciones de flujo continuo y eluidas se recogieron y se reconcentraron, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 5 - Inducción de FHF experimental y regímenes de tratamiento

Este ejemplo demuestra la inducción de FHF en un modelo animal experimental.

Se ha informado de la inducción de insuficiencia hepática fulminante (FHF) previamente (Shinoda et al., J. Surg. Res., 137:130-140, 2007). En resumen, se usaron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 250-300 g para los experimentos de FHF. Se aislaron hepatocitos de ratas Lewis hembra de 150-200 g. Todos los animales (Charles

River Laboratories, Boston, MA) se manipularon de acuerdo con las directrices expuestas por el Committee on Laboratory Resources, National Institutes of Health.

5 Se indujo FHF usando dos inyecciones de Gal-N (Sigma Aldrich, St Louis, MO), recién disuelto en solución de NaCl al 0,9% y se administró i.p. con un intervalo de 12 horas. Se eligieron diferentes dosificaciones de Gal-N para análisis de tejidos (0,6 g/kg) y estudios de supervivencia (1,2 g/kg), basándose en los estudios previos. Cuando era apropiado, veinticuatro horas después de la inducción de FHF, se inyectaron 0,9 ml de MSC-CM o solución de NaCl al 0,9% (control de vehículo) a través de la vena del pene bajo anestesia con ketamina/xilazina (110 mg/kg y 0,4 mg/kg i.p. respectivamente). Los animales que recibieron 0,6 g/kg se sacrificaron 36 horas después para la recogida de tejido. La supervivencia se controló cada 12 horas durante 28 días.

Ejemplo 6 - La terapia con MSC-CM inhibe el cambio hepático tosco

15 Este ejemplo demostró un efecto hepatoprotector de MSC-CM.

La FHF inducida por Gal-N está acompañada típicamente por cambios característicos en el aspecto tosco del hígado, que consiste en palidez aumentada y una consistencia blanda y encogida.

20 Se indujo FHF en ratas Sprague-Dawley usando Gal-N, como se ha descrito en el Ejemplo 5. Los animales se trataron con infusiones sistémicas de MSC-CM concentrado o con vehículo (control). Se usó una dosis subletal de Gal-N (0,6 g/kg) para el análisis de tejidos 36 horas después del tratamiento y se administraron 1,2 g/kg de Gal-N para estudios de supervivencia. Se analizaron las histologías hepáticas del siguiente modo.

25 Se seccionaron muestras de hígado incrustadas en parafina, fijadas en formalina a 4 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). La evaluación histológica se realizó por un observador no informado, que valoró las secciones hepáticas usando los siguientes criterios: "0" para histología normal, "1" para muerte e inflamación hepatocelular minoritaria, "2" para necrosis en parches ampliamente distribuida con inflamación, "3" para alteración lobular completa y necrosis difusa de hepatocitos con inflamación panlobular, y "4" para mortalidad.

30 En este ensayo, uno de cuatro animales de control murió antes de sacrificar a los animales, confirmando que el grado de lesión en el modelo usado podría ser rápidamente letal. No se realizó necropsia en este animal, pero basándonos en nuestra experiencia previa con este modelo, esperamos que el aspecto tosco fuera anormal.

35 Dos de los tres hígados de control restantes eran blandos y estaban encogidos con un aspecto pálido anormal y una superficie de textura rugosa. El hígado de una rata tratada con vehículo parecía normal. En contraste, ninguno de los 4 hígados tratados con MSC-CM mostraron cambios patológicos toscos. En contraste con los hígados de control afectados, los hígados de animales tratados con MSC-CM eran más grandes con coloración oscura y una superficie brillante típica de un hígado sano.

40 Como se muestra en la FIG. 10, 2 de 16 animales de control (12,5%) sobrevivieron al periodo completo de observación. Todas las demás ratas tratadas con vehículo (87,5%) murieron en 60 horas. En el grupo de MSC-CM, 2 de 8 animales (25%) murieron en las primeras 60 horas. Cuatro (50%) sobrevivieron al periodo de 28 días de estudio. Globalmente, el tratamiento con MSC-CM mejoró significativamente la supervivencia de FHF inducida por Gal-N ($p = 0,017$).

Ejemplo 7- El tratamiento con CM regula negativamente la información sistémica

50 La lesión hepática grave (por ejemplo, después de tratamiento con Gal-N) puede provocar una respuesta inflamatoria local y sistémica que finalmente puede conducir a insuficiencia multiorgánica y muerte. Para investigar la respuesta inflamatoria sistémica en animales expuestos a Gal-N, se recogieron muestras de suero de animales Gal-N 36 horas después de tratamiento con una inyección sistémica de MSC-CM ($n = 4$) o vehículo ($n = 3$) y se analizaron por ELISA, del siguiente modo.

55 Se centrifugaron las muestras de sangre a 12.000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga y se recogió el suero para análisis. La cuantificación de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1ra) e IL-10 de rata se determinó usando ELISA según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

60 Como se muestra en las FIG. 11A-F, el análisis de los niveles sistémicos de citoquinas reveló una disminución no significativa para IL-1 β ($p = 0,054$), pero niveles significativamente disminuidos de TNF- α (64%) ($p = 0,0002$) e IL-6 (54%) ($p = 0,0002$), todas las cuales son citoquinas proinflamatorias que se sabe que están reguladas positivamente después de lesión hepática. Los niveles de IL-2 no cambiaron ($p = 0,43$). En contraste, la concentración de IL-1ra soluble fue un 87% inferior en animales tratados con MSC-CM ($p = 0,0002$). Los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 estaban aumentados 4 veces en animales tratados con MSC-CM ($p = 0,032$).

65 Estos estudios muestran que la infusión de sobrenadantes de MSC regula negativamente la inflamación sistémica típicamente asociada con FHF.

Ejemplo 8 - MSC-CM mejora la patología hepática

5 Treinta y seis horas después de tratamiento sistémico con MSC-CM concentrado o vehículo, se analizaron muestras de hígado de ratas Gal-N por tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones incrustadas en parafina.

10 La evaluación microscópica de secciones hepáticas teñidas con H&E reveló profunda muerte hepatocelular con vacuolización citoplasmática, infiltración panlobular de leucocitos mononucleares y deformación grave de la arquitectura tisular en animales tratados con vehículo. En contraste, los hígados de animales tratados con MSC-CM mostraron solamente infiltración minoritaria de células inmunitarias periportales con edema y deposición de fibrina, característica de la reparación de tejidos.

15 La FIG. 12A muestra un examen histológico semi-cuantitativo que confirmó diferencias significativas entre los grupos. El valor promedio en el grupo de MSC-CM fue $1,5 \pm 0,6$ y $3,0 \pm 0,8$ para animales tratados con vehículo ($p = 0,024$).

20 La cuantificación de células inmunitarias infiltrantes se realizó usando el software ImageJ disponible al público (rsb.info.nih.gov/ij/). Como se muestra en la FIG. 12B, se observó una disminución del 58% en la cantidad de células inmunitarias infiltrantes después de infusión con MSC-CM ($33 \pm 9,3$ en comparación con 84 ± 37 en controles) ($p = 0,004$).

Estos resultados demuestran que la terapia con MSC-CM inhibe el daño hepático y la infiltración de células inmunitarias en FHF inducida por Gal-N.

Ejemplo 9 - MSC-CM inhibe la apoptosis hepatocelular *in vivo*

Se analizó la apoptosis hepatocelular de acuerdo con los siguientes procedimientos.

30 Se desparafinizaron secciones de cuatro micrómetros de grosor de tejido hepático fijado en formalina y se rehidrataron después de cocerlas a 60°C durante 1 hora. Se bloqueó la actividad peroxidasa usando peróxido de hidrógeno al 3% en etanol durante 15 minutos.

35 Se realizó marcaje de extremo libre por desoxinucleotidil transferasa terminal Biotina-dUTP (TUNEL) usando el kit de detección de apoptosis *in situ* con peroxidasa APOPTAG (Chemicon International, Temecula, CA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las secciones se revelaron usando 3,3'-diaminobencidina y tinción de contraste con hematoxilina de Gill.

40 La cuantificación de reactividad a TUNEL y las células inmunitarias infiltrantes se realizó usando el software ImageJ disponible al público (rsb.info.nih.gov/ij/). Se analizaron diez imágenes aleatorias 40x por animal. Las partículas se cuantificaron usando criterios apropiados para los tamaños correspondientes de los núcleos. Se analizaron las partículas de área mayor de 700 μm^2 para identificar específicamente hepatocitos de células no del parénquima e inflamatorias.

45 Para determinar si la infusión de MSC-CM disminuye la muerte de células apoptóticas, se determinó la cantidad de núcleos reactivos a TUNEL en secciones hepáticas. En secciones de ratas tratadas con vehículo, se observaron muchos núcleos apoptóticos. En contraste, había pocos núcleos TUNEL-positivos presentes después de tratamiento con MSC-CM. La cuantificación reveló una reducción del 90% en núcleos TUNEL-positivos ($8,3 \pm 12/\text{campo de visión}$) cuando se comparaban con animales de control (81 ± 52) ($p = 0,009$). Estas observaciones confirman que la terapia con MSC-CM reduce de forma eficaz la muerte hepatocelular en este modelo de lesión hepática aguda.

Ejemplo 10 - MSC-CM inhibe la apoptosis de hepatocitos *in vitro*

55 La inhibición de la muerte hepatocelular por terapia con MSC-CM *in vivo* puede ser un efecto directo de moléculas tróficas con conservan las células hepáticas, o un efecto indirecto, por ejemplo, a través de la inhibición de la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, se ensayó la capacidad de MSC-CM de inhibir directamente la apoptosis en hepatocitos cultivados, del siguiente modo.

60 Se aislaron hepatocitos primarios de rata usando un procedimiento de perfusión de colagenasa de dos etapas como se ha descrito previamente (Dunn et al., FASEB J., 3:174-177, 1989). El rendimiento fue, de forma rutinaria, de 200-300 millones de hepatocitos con viabilidad mayor del 90% determinada por exclusión de azul tripán. El medio de cultivo de hepatocitos consistía en DMEM suplementado con FBS al 10%, 14 ng/ml de glucagón, 0,5 U/ml de insulina, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hidrocortisona, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 200 U/ml de penicilina. Las condiciones de cultivo fueron medio de hepatocitos para experimentos de control; medio de hepatocitos mezclado a una relación 50:1 con el MSC-CM concentrado 25 veces (2% de MSC-CM); y medio de hepatocitos mezclado a una relación 12,5:1 para un 8% de MSC-CM.

Se cultivaron hepatocitos primarios de rata aislados como se ha descrito anteriormente durante un total de 7 días en placas de 12 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/cm² en una configuración de tipo sándwich en gel de colágeno. Se indujo la apoptosis usando Actinomycin D (1 hora) y TNF- α (8 horas). Durante la exposición a TNF- α , los hepatocitos se cultivaron en medio de hepatocitos solamente o medio de hepatocitos suplementado con un 2% u 8% de MSC-CM concentrado 25x. Los hepatocitos se tiñeron usando un ensayo fluorescente Live Dead (Molecular Probes). La muerte celular se cuantificó usando análisis de imágenes digitales de 4 imágenes por pocillo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Como se muestra en la FIG. 14, se observó un aumento del 22% en la fracción de células viables cuando el medio de hepatocitos se suplementaba con un 2% de MSC-CM (46% viable en comparación con 38% viable en cultivos de control) ($p = 0,005$). No se observó aumento significativo en la viabilidad de los hepatocitos con un 8% de MSC-CM (43%) ($p = 0,15$). Estos experimentos demuestran que el MSC-CM a bajo nivel tiene un efecto anti-apoptótico directo sobre los hepatocitos. Por lo tanto, MSC-CM es directamente hepatoprotector. En otras palabras, MSC-CM tiene un efecto conservador directo sobre los hepatocitos.

La recuperación/protección de la apoptosis hepatocelular fue más prominente *in vivo* que *in vitro*. Esta observación se debe probablemente a inhibición local y sistémica de la respuesta apoptótica.

Ejemplo 11 - MSC-CM potencia la regeneración hepática

La estimulación de programas de reparación endógena también es un mecanismo potencial del efecto terapéutico inducido por MSC-CM descrito anteriormente.

Se analizaron muestras de hígado de ratas Gal-N 36 horas después de la inducción de FHF con MSC-CM o vehículo. Se realizó tinción con antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) tratando las secciones con tampón citrato 10 mM a pH 6,0 usando un horno digital de presión. Posteriormente, las secciones se bloquearon con suero de caballo al 1,5% durante 15 minutos y se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA (Clon 24, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA) a una dilución 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó el anticuerpo primario usando el kit Vectastain Elite ABC (Vector laboratories, Burlington, CA). Las secciones se revelaron usando 3,3'-diaminobencidina y se tiñeron con contraste con hematoxilina de Gill.

Se cuantificaron las células reactivas a PCNA y se compararon con animales tratados con vehículo. Como se muestra en la FIG. 15, se observaron 3 veces más células PCNA-activas en hígados tratados con MSC-CM que hígados de control.

Se realizaron perfiles de expresión de ARNm de 10 genes que se sabe que están regulados positivamente durante la regeneración hepática usando RT-PCR, como se describe en el Ejemplo 3E. Se muestran combinaciones de oligonucleótidos directos e inversos en la tabla 3.

Tabla 3: Oligonucleótidos de RT-PCR

Gen	SEQ ID NO:	Directo (5'-3')	SEQ ID NO:	Inverso (5'-3')	Amplicón (pb)
OSM	5	caactgggtgctttcagaca	6	aacctatgaagcgatggtag	253
AR	7	gtctttgtctccgccaag	8	ctgaactctggagccttcg	244
TGF- α	9	gcaagttctgcctgttctc	10	gcactgaaccaaccacttt	161
HGF	11	cgagctatcgcgtaagac	12	tgtagctttcaccgttgacag	165
TNF	13	actccagaaaagcaagcaa	14	cgcaggaatgagaagagg	211
EGF	15	acaccgaaggtggctatgtc	16	tagagtcagggcaaggcagt	195
IL-6	17	ccgeagaggaacttcacag	18	cagaattgccattgcacaac	134
SCF	19	caaaactggtggcgaatctt	20	gccacgaggtcatccactat	217
HG-EBF	21	gcctcctgtaattgctctgc	22	gccaaaaatcctggagcata	207
TIMP3	23	tgtaaccccagccttttc	24	cttctcgccaagacctcaac	182
18s	25	atgacatcaagaaggtggtg	26	cataccaggaaatgagcttg	177

Se observaron bandas visiblemente más fuertes para cada uno de los genes analizados. Como se muestra en la FIG. 16, esta observación se confirmó usando análisis cuantitativo. Los aumentos variaron de 4 veces a 27 veces.

Estos resultados demuestran que la administración de factores solubles derivados de MSC potencia los programas de regeneración hepática durante FHF.

Ejemplo 12 - MSC-CM estimula la proliferación de hepatocitos *in vitro*

La duplicación de hepatocitos, un componente principal de la regeneración hepática, está regulada por una interacción compleja de señales paracrinas y endocrinas que implican tipos de células no del parénquima del hígado, así como órganos extra-hepáticos. Para determinar si los factores derivados de MSC pueden potenciar directamente la replicación de hepatocitos, se exploró el efecto de MSC-CM sobre la proliferación *in vitro* de

hepatocitos primarios aislados.

Se aislaron hepatocitos primarios de rata como se ha descrito en el Ejemplo 9. Los hepatocitos posteriormente se sembraron a una baja densidad ($1,25 \times 10^3$ células/cm²) en una capa de alimentación de fibroblastos 3T3 J2 (8×10^4 células/cm²) previamente expuesta a 12 µg/ml de mitomicina-C durante 2,5 horas para detener el crecimiento. Se permitió que los hepatocitos proliferaran con cambios diarios de medio. El medio de cultivo de hepatocitos se describe en el Ejemplo 9.

Las células se cultivaron con bromodesoxiuridina (BrdU; Sigma) 10 µM. Después de 48 horas, los cultivos se fijaron en etanol al 70% durante 45 minutos y se trataron con HCl 4 N y TRITONX-10 al 0,2%. Las células después se incubaron en tampón de bloqueo durante 30 minutos y se incubaron durante 60 minutos con anticuerpo anti-BrdU-Alex594 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y de conejo anti-albúmina de rata (ICN Pharmaceuticals, Aurora, OH) a 37°C, seguido de anti-IgG de conejo conjugado con FITC (ICN Pharmaceuticals) a temperatura ambiente. Las células BrdU positivas en cada colonia de hepatocitos se contaron en imágenes de microscopía de fluorescencia. Se determinó el contenido de albúmina en muestras de sobrenadante mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando albúmina de rata purificada y un anticuerpo anti-albúmina conjugado con peroxidasa (MP Biomedicals, Aurora, OH). Se determinó el contenido de urea con un kit disponible en el mercado (StanBio Laboratory, Boerne, TX) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

La proliferación de colonias de hepatocitos de rata sobre una capa de alimentación de fibroblastos 3T3 de crecimiento inhibido se visualizó por tinción doble de inmunofluorescencia para BrdU y albúmina. Como se muestra en la FIG. 17A, con suplementación de un 2% de MSC-CM (representada en el gráfico como 2), se observó un aumento del 79% en los hepatocitos BrdU-positivos (93 ± 12 por campo de visión con MSC-CM frente a 52 ± 14 en cultivos de control) ($p = 0,001$). Cuando el medio se suplementó con un 8% de MSC-CM (mostrado en el gráfico como "8"), no se midió aumento significativo (59 ± 14 BrdU) ($p = 0,37$).

Como se muestra en la FIG. 17B, en paralelo a estos hallazgos, la cantidad total de albúmina secretada y urea sintetizada por pocillo estuvo aumentada en cultivos suplementados con un 2% de MSC-CM. Los niveles de albúmina fueron de $29 \pm 2,4$ µg/ml/día, en comparación con $20 \pm 1,2$ µg/ml/día en condiciones de control ($p = 0,006$). No se observó diferencia significativa en comparación con el control en condiciones de un 8% de MSC-CM ($23 \pm 2,2$ µg/ml/día) ($p = 0,14$).

Como se muestra en la FIG. 17C, la síntesis de urea se desplazó de $69 \pm 8,1$ µg/ml/día en los cultivos de control a 90 ± 10 µg/ml/día en condiciones de un 2% de MSC-CM ($p = 0,019$), pero no se alteró significativamente en presencia de un 8% de MSC-CM ($53,1$ µg/ml/día) ($p = 0,063$).

En general, por lo tanto, los marcadores de proliferación y función de hepatocitos estaban significativamente más elevados en presencia de un 2% de MSC-CM *in vitro*. Aunque un 8% de MSC-CM también tuvo un efecto sobre la proliferación y función de hepatocitos *in vitro*, no era tan pronunciado como los niveles observados con un 2% de MSC-CM.

Los datos presentados en este documento demuestran claramente que MSC-CM es capaz de aumentar la proliferación de hepatocitos. MSC-CM aumentó la cantidad de células en proliferación al menos 3 veces en el hígado lesionado, en regeneración. Las células MSC no son necesarias para las observaciones descritas anteriormente. Los factores secretados contenidos en MSC-CM son suficientes en la protección de los hepatocitos de la apoptosis y la promoción de la proliferación de hepatocitos. Por tanto, la infusión sistémica de MSC-CM representa una estrategia eficaz para la terapia con MSC.

Ejemplo 13 - Factores derivados de MSC revierten la insuficiencia hepática fulminante

Este ejemplo demuestra que moléculas derivadas de MSC proporcionan beneficios de supervivencia contra la pérdida de células del parénquima, donde la pérdida de células está integrada con una respuesta inmunitaria local y sistémica, después de administración en bolo intravenoso de MSC-CM y/o perfusión extracorpórea con un biorreactor que contiene MSC (por ejemplo, MSC indiferenciadas).

Se administró por vía intraperitoneal a ratas Sprague-Dawley un total de dos inyecciones de 1,2 g/kg de una hepatotóxina, D-galactosamina (Gal-N), cada una separada por 12 horas, como se ha descrito en el Ejemplo 5.

Los animales se trataron 24 horas después con inyecciones intravenosas en la vena del pene de (1) MSC completas o (2) lisados de MSC. Se aislaron las MSC y se caracterizaron como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2.

Se administró un total de 2×10^6 a cada sujeto para terapia con MSC de células completas. El volumen de MSC completas fue de 500 µl.

Los lisados celulares se prepararon por sonicación. La dosis de células sonicadas administrada fue de 2×10^6 células por sujeto. El volumen de lisado de MSC fue de 500 µl. A diferencia de MSC-CM, el lisado de MSC no está

concentrado.

Se administró vehículo (PBS) y lisado celular de fibroblastos NIH 3T3-J2 como controles. El volumen de cada control fue de 500 μ l.

Como se muestra en la FIG. 18, no se observó beneficio significativo después de la infusión intravenosa de 2×10^6 MSC humanas. Esta observación se debe muy probablemente a un mal implante, entrapamiento en el lecho capilar alveolar, y/o rechazo inmunológico de las células. En contraste, el tratamiento con lisados celulares, derivado de la misma masa celular usada para el trasplante, mostró una tendencia de supervivencia aumentada en comparación con controles de vehículo ($P < 0,47$) y lisado de fibroblastos ($P < 0,36$).

Ejemplo 14 - Componentes derivados de MSC revierten la FHF

Los experimentos descritos en este ejemplo demuestran que componentes derivados de MSC promueven la supervivencia en modelos de FHF y que este efecto no es específico de especie, por ejemplo, el potencial terapéutico de MSC-CM no es específico de especie.

Como se muestra en la FIG. 19A, un estudio longitudinal usando MSC-CM de 2×10^6 MSC humanas reveló un beneficio de supervivencia distinto en comparación con medio concentrado de vehículo ($P < 0,032$) y fibroblastos ($P < 0,026$).

Se controló la supervivencia de 72 horas de ratas con FHF inducida como una función de la masa de MSC de la que se recogió el MSC-CM. Como se muestra en la FIG. 19B, el MSC-CM fue más eficaz cuando derivada de una masa de MSC de 2×10^6 células.

La observación de que lisados y sobrenadantes de MSC xenogénicas disminuían la mortalidad animal sugiere que estos factores pueden cruzar las barreras de especie. Por tanto, el potencial terapéutico de MSC-CM no es específico de especie.

Ejemplo 15 - La función metabólica y secretora combinada en MSC-EB proporciona hepatoprotección y beneficio de supervivencia

Se reveló que un biorreactor extracorpóreo con MSC (MSC-EB) combina la eficacia de células completas MSC y MSC-CM en un único dispositivo.

Se informó previamente del funcionamiento de dispositivos extracorpóreos (Shinoda et al., J. Surg. Res., 137:130-140, 2007). En resumen, se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban entre 280 y 370 gramos usando inyecciones intraperitoneales de ketamina y xilazina a 110 y 0,4 mg/kg, respectivamente. Se canularon la arteria carótida izquierda y la vena yugular derecha y el animal se puso en una jaula metabólica. Veinticuatro horas después, se inyectaron i.p. 1,2 g/kg de Gal-N recién disuelto en solución salina fisiológica y ajustado a pH 7,3 con NaOH 1 N, seguido de una segunda inyección igual 12 horas después, como se ha descrito en el Ejemplo 5. Veinticuatro horas después de la primera inyección de Gal-N, se conectaron las líneas arterial y venosa a un circuito extracorpóreo. Se separó el plasma usando un separador de plasma (MicroKros, tamaño de poro de 0,2 micrómetros). El plasma se perfundió a través del biorreactor de placa plana de policarbonato y posteriormente se reunió con los componentes celulares de la sangre y se devolvió al animal. El biorreactor extracorpóreo se hizo funcionar durante 10 horas. Los animales que murieron durante el funcionamiento del reactor y no lograron recibir el tratamiento adecuado (MSC-EB, N = 3 y Fibroblasto-EB, N = 2) se censuraron del análisis. Se controló la supervivencia de los animales cada 12 horas. Se analizó el plasma o la sangre completa para biomarcadores de lesión hepática (por ejemplo, alanina aminotransferasa (ALT) en suero, aspartato aminotransferasa (AST) en suero) usando un ensayo metabólico microfluidic (Picollo, Abaxis, Union City, CA). Se muestra una representación esquemática ejemplar de un circuito extracorpóreo en la FIG. 20.

Los animales se trataron 24 horas después de la inducción de FHF con un MSC humana-EB conectado a la circulación sistémica del animal. Biorreactores sembrados con fibroblastos (fibroblasto-EB) y biorreactores acelulares (acelular-EB) sirvieron como controles. Después de 10 horas de perfusión extracorpórea, se animales se quitaron del soporte asistido y se controlaron para la supervivencia. Se obtuvo el plasma al inicio de, y 24 horas después de, el tratamiento con biorreactor y se analizó para la liberación de enzimas de hepatocitos. Como se muestra en las FIG. 21A-B, las serologías hepáticas, incluyendo aspartato aminotransferasa (AST; $P < 0,02$) y alanina aminotransferasa (ALT; $P < 0,001$) se mejoraron en animales tratados con el MSC-EB. Estos datos demuestran un efecto hepatoprotector de la terapia con el dispositivo como se muestra por la reducción en los marcadores bioquímicos de muerte de hepatocitos. Como se muestra en la FIG. 21C, el 71% de los animales tratados con el MSC-EB sobrevivieron, en comparación con el 14% en los controles tanto acelular ($P < 0,037$) como de fibroblastos ($P < 0,05$). La tabla 5 muestra las serologías hepáticas después de tratamiento con MSC-EB.

Tabla 5: Las serologías hepáticas están mejoradas después de tratamiento con MSC-EB

Parámetro	MSC	Pre MSC-EB	Post MSC-EB (24 h)	Post MSC-EB (48 h)	% de cambio
TB (mg/dl)	-	0,73 ± 0,75	0,9	N/A	+23
	+	0,76 ± 0,26	1,16 ± 0,83	1,2 ± 0,84	+58
AST (U/l)	-	2007 ± 837,4	1999	N/A	0
	+	1513,2 ± 513,2	888 ± 272,6	940,8 ± 330,53	-41
ALT (U/l)	-	1222,33 ± 710,4	1233	N/A	0
	+	859,2 ± 125,7	168 ± 61,9	358,8 ± 198,4	-80
ALP (U/l)	-	216 ± 39,1	106	N/A	-51
	+	192,8 ± 41	91,2 ± 23,2	98,4 ± 24,6	-53

Los datos se expresan como la media ± error típico de la media (SEM). El porcentaje de cambio se refiere a post MSC-EB (24 horas) respecto a pre MSC-EB. (-) es EB sin MSC. N = 5 para (-). N = 3 para (+). No hay datos adquiridos debido a la mortalidad (N/A).

5

Como se muestra en la tabla 5, las serologías hepáticas se mejoraron después de tratamiento con MSC-EB.

Ejemplo 16 - La terapia con MSC-CM inhibe la invasión panlobular de leucocitos, la duplicación del conducto biliar, y la muerte hepatocelular

10

Se evaluaron los cambios histopatológicos post MSC-CM usando un régimen subletal de Gal-N (0,6 g/kg) para inducir lesión hepática aguda, asegurando al mismo tiempo la supervivencia en el grupo tratado de control para la comparación. Debe apreciarse que a esta dosis de Gal-N, aparecía mortalidad en un grupo tratado con vehículo (N = 1). Esto confirma que el grado de lesión en este modelo aún puede ser letal. Las ratas lesionadas con Gal-N se trataron con vehículo (N = 4) o MSC-CM (N = 4) 24 horas después de la lesión y se recogieron sus hígados 36 horas después de ello para análisis patológico.

15

Se recogió tejido hepático de ratas inducidas con un régimen subletal de Gal-N (0,6 g/kg), 36 horas después de tratamiento con MSC-CM. El tejido se fijó en formalina tamponada al 10%, se incorporó en parafina, se seccionó a un grosor de 6 µm, y se tiñó con hematoxilina y eosina.

20

La evaluación microscópica del tejido hepático de las ratas tratadas con vehículo reveló una profunda apoptosis hepatocelular, duplicación del conducto biliar e infiltración panlobular de leucocitos mononucleares con vacuolización citoplasmática y distorsión grave de la arquitectura tisular. Las ratas tratadas con MSC-CM no mostraron signos de inflamación diseminada, aunque se observó infiltración periportal minoritaria con edema y deposición de fibrina coherente con la reparación del tejido.

25

La histopatología se valoró usando los criterios descritos en el Ejemplo 6 ("0" para histología normal, "1" para muerte e inflamación hepatocelular minoritaria, "2" para necrosis en parches ampliamente distribuida con inflamación, "3" para alteración lobular completa y necrosis difusa de hepatocitos con inflamación panlobular, y "4" para mortalidad). Claramente, los hígados tratados con MSC-CM presentaban un valor más bajo que los hígados tratados con vehículo.

30

Se observaron cantidades inferiores de leucocitos infiltrantes en hígados tratados con MSC-CM.

35

Ejemplo 17 - MSC-CM altera la migración de células inmunitarias al hígado

Para investigar si la ausencia de infiltración panlobular de leucocitos observada en hígados tratados con MSC-CM puede deberse a la desviación dependiente de MSC-CM de la migración de células inmunitarias desde un órgano diana inflamado, se transfirieron de forma adoptiva leucocitos radiomarcados directamente después del tratamiento con MSC-CM o vehículo, en ratas lesionadas con Gal-N (0,6 g/kg). En resumen, se aislaron los leucocitos de sangre completa de rata por lisis de eritrocitos con NH₄Cl. Las células se sedimentaron, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en solución salina al 0,9% que contenía el isótopo In111 oxina (GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ). Las células se marcaron a una eficacia del 92% con alta viabilidad. Se infundieron aproximadamente 15 x 10⁶ células en la vena del pene de ratas lesionadas con Gal-N (0,6 g/kg) directamente después del tratamiento con vehículo o MSC-CM.

40

45

Después se controló el tráfico de leucocitos en estos animales usando tomografía computarizada de emisión de un único fotón (SPECT) en el tiempo. Se capturaron imágenes SPECT usando un sistema de cámara M.CAM gamma (Siemens Medical Systems, Malvern, PA) a 0, 3 y 24 horas después de la infusión de leucocitos. Se proporciona una ilustración de este protocolo en la FIG. 22.

50

De forma cualitativa, se observaron más leucocitos migrando al hígado en los animales tratados con vehículo en el tiempo. En contraste, hubo una disminución distinta en la intensidad de señal en el hígado de animales tratados con MSC-CM en el tiempo. Estos resultados sugieren que había una presión selectiva sobre los leucocitos para que emigraran desde el hígado debido a MSC-CM, a diferencia de las condiciones de control donde los leucocitos

55

finalmente migraron al órgano lesionado.

Como se muestra en la FIG. 22B, en ratas a las que se administró una dosis subletal de Gal-N (0,6 mg/kg), se observaron cambios drásticos en los recuentos y diferenciales de leucocitos en poblaciones de células de sangre periférica en animales tratados con MSC-CM.

También se evaluó la distribución de leucocitos a nivel orgánico. Los animales se sacrificaron en los puntos temporales de 0,5 horas, 8 horas y 24 horas. Los niveles de leucocitos se determinaron para los órganos indicados usando recuentos de centelleo.

Como se muestra en FIG. 22C, los órganos linfoides y el hígado son los sitios principales de actividad de MSC-CM (50% de los órganos sólidos totales a las 24 horas). Se observó, sin embargo, actividad considerable de MSC-CM en cada órgano analizado.

Estos datos apoyan la idea de que la migración alterada de leucocitos puede ser una diana potencial de la terapia con MSC-CM. Estos datos también apoyan el uso sistémico de terapia con MSC-CM, por ejemplo, para el tratamiento de insuficiencia multiorgánica en un sujeto. Por tanto, la terapia con MSC-CM puede proporcionar un efecto beneficioso en los siguientes órganos, el pulmón, el corazón, el páncreas, el GI, el timo, el ganglio linfático, la médula ósea, el bazo, el hígado, y la sangre.

Ejemplo 18 - Caracterización de MSC-CM

En un esfuerzo por comprender los mediadores moleculares de los efectos observados de la terapia con MSC, se examinó el MSC-CM usando una serie de proteínas de alta densidad.

En resumen, se prepararon sobrenadantes de MSC recogiendo medio sin suero después de cultivo de 24 horas de aproximadamente 2×10^6 MSC. Los sobrenadantes se analizaron para un panel de proteínas especificadas usando una serie de anticuerpos (RAYBIO Human Cytokine Antibody Array C Series 2000, RayBiotech Inc., Norcross, GA) como se especifica por el proveedor.

Como se muestra en la FIG. 23A, el MSC-CM contenía 69 de las 174 proteínas ensayadas, que incluían un amplio espectro de moléculas implicadas en la inmunomodulación y la regeneración hepática. Como se muestra en la FIG. 23B, el análisis de grupos reveló que una fracción grande (30%) de MSC-CM estaba compuesta por quimioquinas, muchas de las cuales se expresaban a altos niveles.

El MSC-CM entonces se fraccionó basándose en la funcionalidad usando métodos basados en afinidad en lugar de otros criterios moleculares arbitrarios tales como el tamaño o hidrofobicidad, del siguiente modo. El MSC-CM se pasó sobre una columna de afinidad impregnada con sulfato de heparina, un ligando conocidos para todas las quimioquinas y se separó en fracciones unidas y no unidas. Cada fracción se infundió en ratas con FHF inducida con supervivencia global como criterio de valoración del estudio.

Como se muestra en la FIG. 23C, la actividad terapéutica de MSC-CM se restringió a la fracción unida a heparina, proporcionando una fuerte correlación en las quimioquinas y el beneficio de supervivencia después de infusión de MSC-CM en ratas con FHF inducida.

El MSC-CM no aumentaba los niveles de ARNm del factor de transcripción Foxp3 en células mononucleares de sangre periférica. La expresión de Foxp3 está restringida a células T reguladoras, una población de linfocitos supresores endógenos.

El MSC-CM es quimiotácticamente activo, mientras que Fibroblasto-CM es inerte. Esto se evaluó usando una cámara de quimiotaxis microfluidic previamente descrita (Jeon et al., Nat. Biotech., 20:826-830, 2002). Neutrófilos expuestos a Fibroblasto-CM no muestran cambios morfológicos implicados con la quimiotaxis, mientras que neutrófilos expuestos a MSC-CM tienen extensiones filopodiales prominentes y están quimiotácticamente sensibilizados.

Un componente de MSC-CM que puede ser responsable de la replicación aumentada de hepatocitos es SDF-1a. Se hicieron proliferar hepatocitos usando técnicas mencionadas anteriormente en medio convencional de cultivo en solitario o suplementado con 5 ng/ml de SDF-1a (FIG. 29B) o el antagonista del receptor de SDF-1a, AMD3100 a 1 μ M. Estimulación aumentada de SDF-1a condujo colonias más grandes, mientras que el bloqueo de la señalización de SDF-1a condujo a colonias más pequeñas. La FIG. 24 muestra la síntesis de urea en células tratadas con SDF-1a y AMD3100. La síntesis de urea es un biomarcador sustituto para la masa de hepatocitos; los resultados muestran diferencias significativas entre condiciones de control y modulación de la ruta de señalización de SDF-1a.

También se describe en este documento:

(1) Un sistema para tratar la sangre o el plasma de un mamífero, comprendiendo el sistema un biorreactor

- extracorpóreo (EB) que comprende un compartimento de tratamiento de fluido y un compartimento de células, y una barrera selectivamente permeable que separa el compartimento de tratamiento de fluido y el compartimento de células, donde el compartimento de células comprende una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas.
- 5 (2) El sistema de (1), donde el compartimento de células comprende adicionalmente una población de hepatocitos primarios.
- (3) El sistema de (1), donde la barrera selectivamente permeable comprende un haz de fibras huecas.
- 10 (4) El sistema de (1), donde el EB comprende adicionalmente una entrada de fluido biológico y una salida de fluido biológico, donde la entrada y la salida de fluido biológico permiten comunicación fluida entre el compartimento de tratamiento de fluido y el torrente sanguíneo de un mamífero.
- 15 (5) El sistema de (1), que comprende adicionalmente una pluralidad de bombas para hacer circular la sangre o el plasma a través del compartimento de tratamiento de fluido.
- (6) El sistema de (1), comprendiendo adicionalmente el sistema un cartucho de ultrafiltración en comunicación fluida con el compartimento de tratamiento de fluido.
- 20 (7) Un método de tratamiento de una enfermedad hepática en un sujeto, comprendiendo el método:
- (a) identificar a un sujeto que tiene una enfermedad hepática;
- (b) proporcionar un sistema para tratar la sangre o el plasma de un mamífero, comprendiendo el sistema un biorreactor extracorpóreo (EB) que comprende un compartimento de tratamiento de fluido y un compartimento de células, y una barrera selectivamente permeable que separa el compartimento de tratamiento de fluido y el compartimento de células, donde el compartimento de células comprende una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas; y
- 25 (c) exponer el plasma o la sangre del sujeto a las MSC en el EB.
- 30 (8) El método de (7), donde el sujeto se identifica evaluando el nivel de un marcador sérico de función hepática.
- (9) El método de (8), donde el marcador sérico de función hepática se selecciona del grupo que consiste en lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina sérica, albúmina y globulinas.
- 35 (10) El método de (7), donde el EB comprende adicionalmente una población de hepatocitos primarios.
- (11) Un método para tratar la sangre o el plasma de un sujeto que tiene una enfermedad hepática, comprendiendo el método:
- 40 (a) identificar a un sujeto que tiene una enfermedad hepática;
- (b) proporcionar un sistema que comprende un biorreactor extracorpóreo (EB) que comprende un compartimento de tratamiento de fluido y un compartimento de células, y una barrera selectivamente permeable que separa el compartimento de tratamiento de fluido y el compartimento de células, donde el compartimento de células comprende una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas;
- 45 (c) retirar la sangre o el plasma del sujeto;
- (d) introducir la sangre o el plasma en el compartimento de tratamiento de fluido del EB; y
- (e) permitir que la sangre o el plasma fluya a través de y salga del compartimento de tratamiento de fluido, tratando de ese modo la sangre o el plasma.
- 50 (12) El método de (11), donde el sujeto se identifica evaluando el nivel de un marcador sérico de función hepática.
- (13) El método de (12), donde el marcador sérico de función hepática se selecciona del grupo que consiste en lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina sérica, albúmina y globulinas.
- 55 (14) El método de (12), donde el EB comprende adicionalmente una población de hepatocitos primarios.
- (15) Un método de preparación de una composición para el tratamiento de una enfermedad hepática, comprendiendo el método:
- 60 (i) obtener una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas;
- (ii) cultivar las MSC en un medio;
- 65 (iii) obtener el medio;
- (iv) fraccionar el medio;

- (v) seleccionar una fracción del medio que tiene capacidad de una o ambas de promoción de la proliferación de hepatocitos o inhibición de la muerte de hepatocitos; y
 (vi) opcionalmente, formular la fracción seleccionada para su administración a un mamífero.
- 5 (16) El método de (15), donde la composición se concentra 25 veces.
- (17) El método de (16), donde el medio comprende un medio de cultivo tisular sin suero o solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- 10 (18) El método de (15), que comprende adicionalmente liofilizar la composición.
- (19) Una composición proporcionada por el método de (15).
- 15 (20) Un método de tratamiento de enfermedad hepática en un sujeto, comprendiendo el método identificar a un sujeto que necesita tratamiento, y administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende medio condicionado de MSC (MSC-CM).
- (21) El método de (20), donde el sujeto se identifica evaluando el nivel de un marcador sérico de función hepática.
- 20 (22) El método de (21), donde el marcador sérico de función hepática se selecciona entre el grupo que consiste en lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina sérica, albúmina y globulinas.
- 25 (23) El método de (21), donde el tratamiento continúa hasta que el nivel del sujeto de un marcador sérico de función hepática está dentro del intervalo normal determinado por el médico del sujeto.
- (24) El método de (21), donde la enfermedad hepática a tratarse es insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática fulminante, o fibrosis hepática.
- 30 (25) El método de (21), donde la composición se administra usando una técnica de bolo intravenoso.
- (26) El método de (21), donde el MSC-CM se obtiene por un método que comprende:
- 35 (a) obtener una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas;
 (b) cultivar las MSC en un medio;
 (c) obtener el medio;
 (d) opcionalmente, formular la fracción seleccionada para su administración al sujeto.
- 40 (27) El método de (21), donde el MSC-CM se obtiene por un método que comprende:
- (a) obtener una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas;
 (b) cultivar las MSC en un medio;
 (c) obtener el medio;
 (d) fraccionar el medio;
- 45 (e) seleccionar una fracción del medio que tiene capacidad de una o ambas de promoción de la proliferación de hepatocitos e inhibición de la muerte de hepatocitos; y
 (f) opcionalmente, formular la fracción seleccionada para su administración al sujeto.
- 50 (28) Un método para identificar un compuesto biológicamente activo para el tratamiento de una enfermedad hepática, comprendiendo el método;
- (a) obtener una o más fracciones de un medio que contiene factores secretado desde una población de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas;
 (b) ensayar la capacidad de una o más de las fracciones de promover una o ambas de la proliferación de hepatocitos o inhibición de la muerte de hepatocitos;
 (c) seleccionar una fracción del medio que promueve una o ambas de la proliferación de hepatocitos o inhibición de la muerte de hepatocitos; y
 (d) identificar una o más moléculas presentes en la fracción seleccionada.
- 60 (29) El método de (28), donde las fracciones se obtienen de acuerdo con el tamaño.
- (30) El método de (28), donde las fracciones se obtienen de acuerdo con la carga.
- 65 (31) El método de (28) donde la fracción del medio es una fracción de unión a sulfato de heparina del medio.

Otras realizaciones

Debe apreciarse que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo extracorpóreo de soporte hepático que comprende una población purificada de células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas.
2. Un dispositivo extracorpóreo de soporte hepático de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población purificada de MSC indiferenciadas
- 10 a. está esencialmente libre de material celular no MSC, o
b. es 100% MSC, o
c. permanece indiferenciada, o
d. está en solución que no comprende suero animal, o
e. deriva de médula ósea.
- 15 3. Un cartucho de biorreactor extracorpóreo que comprende células estromáticas multipotentes (MSC) indiferenciadas y una barrera semi-permeable que permite el paso de macromoléculas, pero no MSC.
4. Un cartucho de biorreactor extracorpóreo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el cartucho se suministra para un único uso con un paciente.
- 20 5. Un kit que comprende el cartucho de la reivindicación 3, uno o más tampones farmacéuticamente aceptables, e instrucciones para instalar el cartucho en un dispositivo extracorpóreo de soporte hepático.

FIG. 1

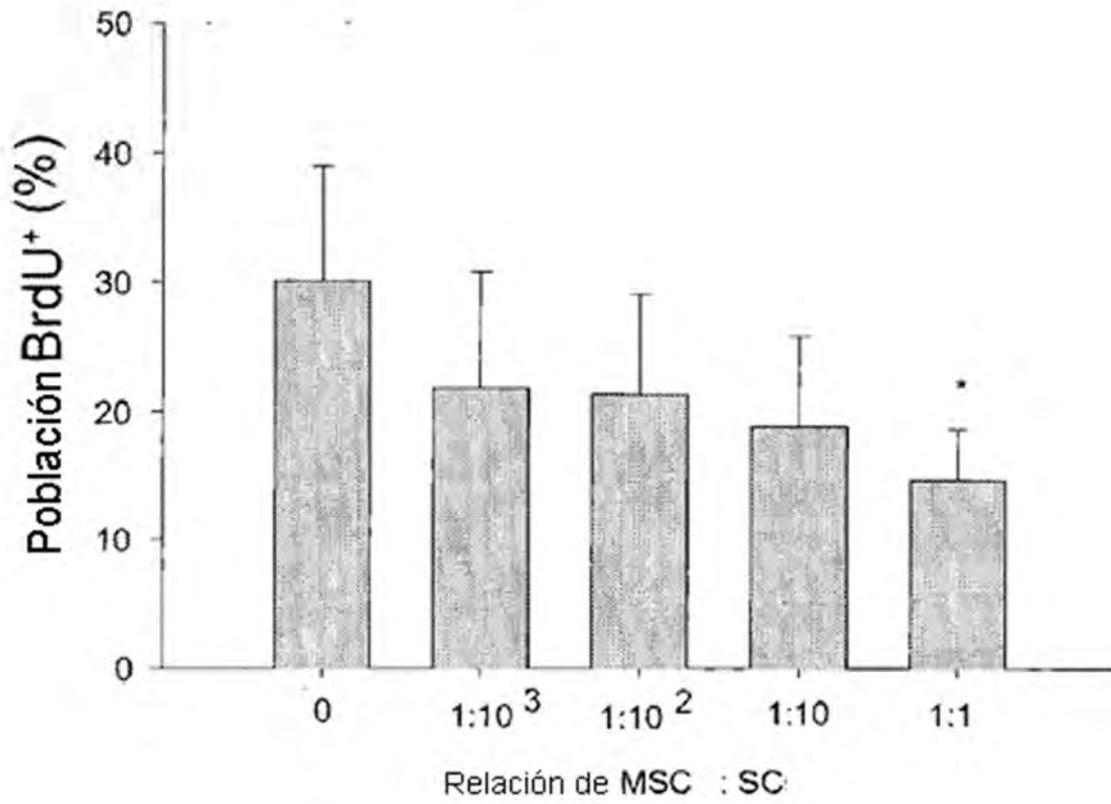


FIG. 2

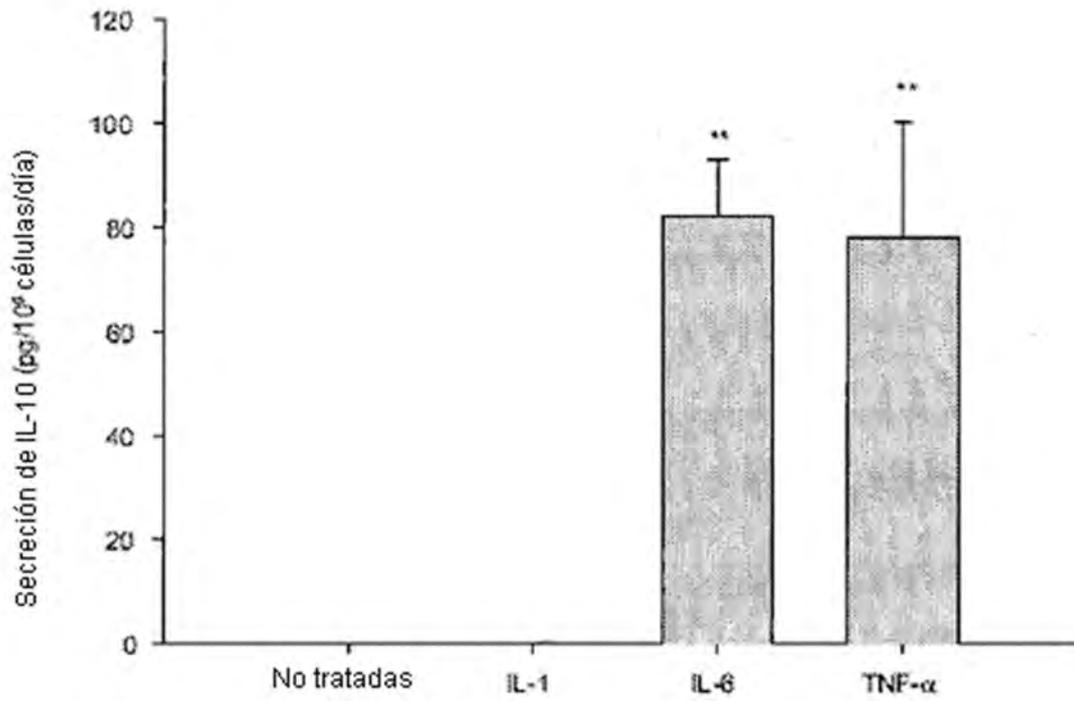
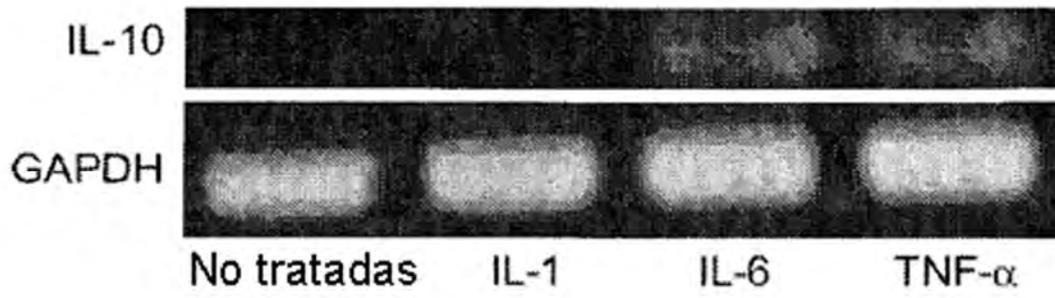


FIG. 3

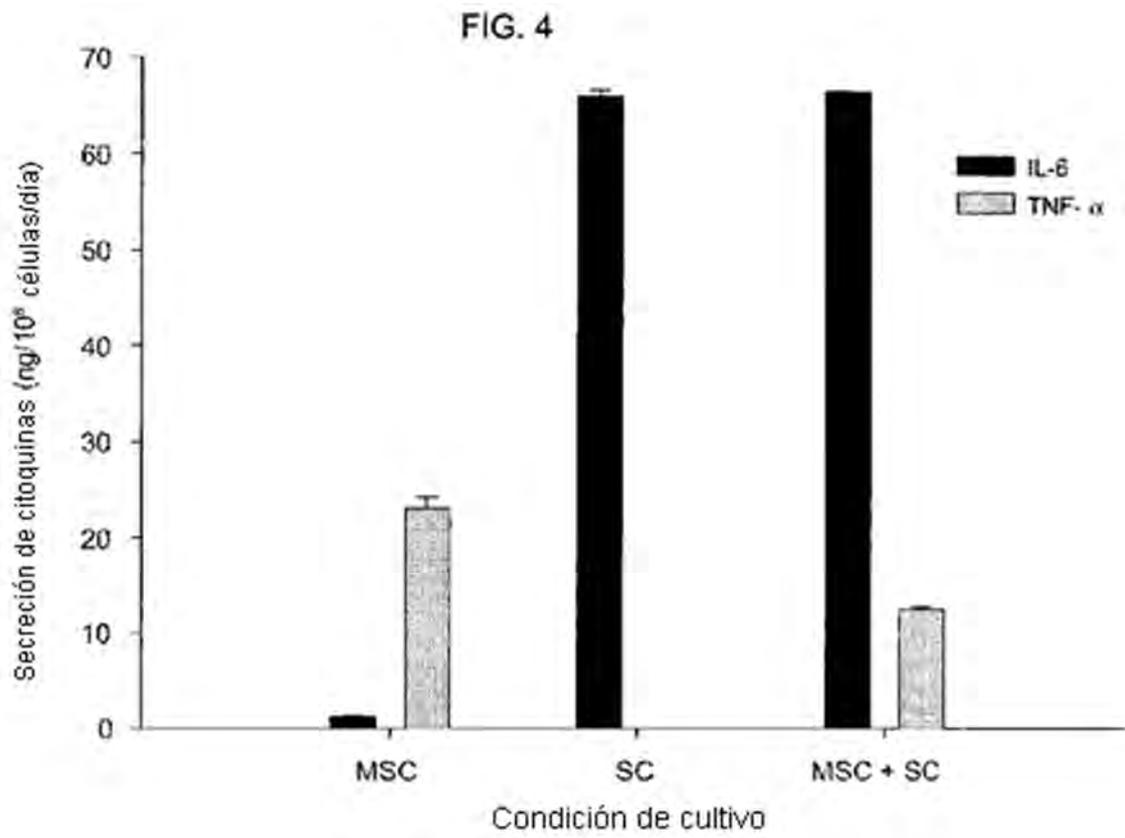


FIG. 5

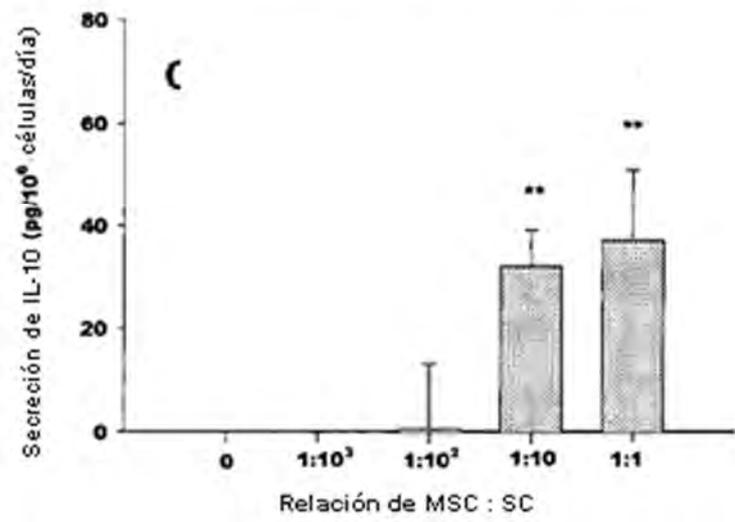
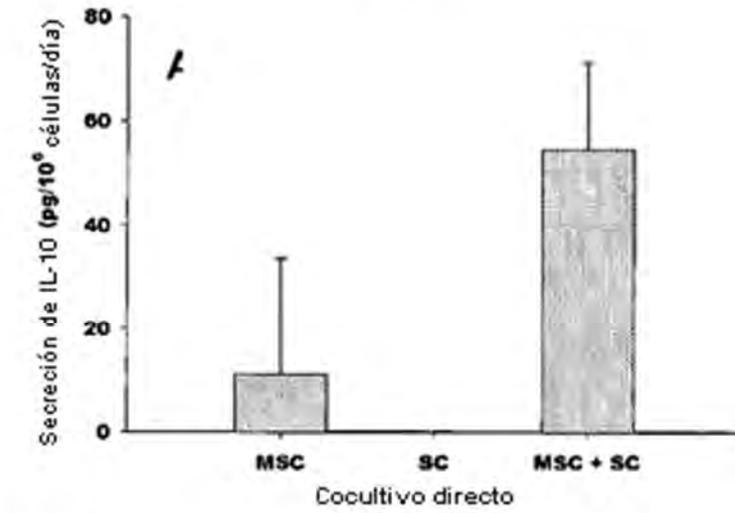


FIG. 6

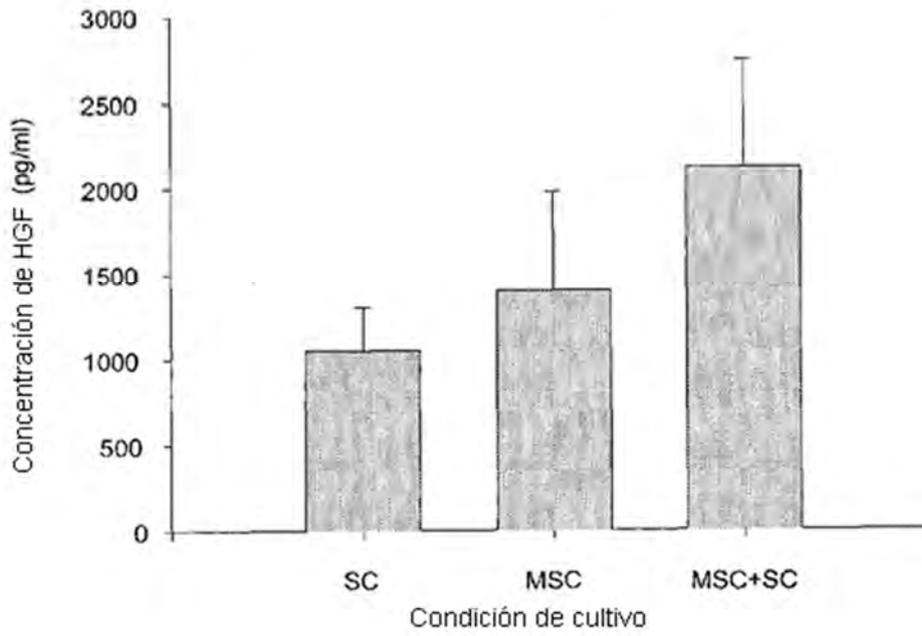
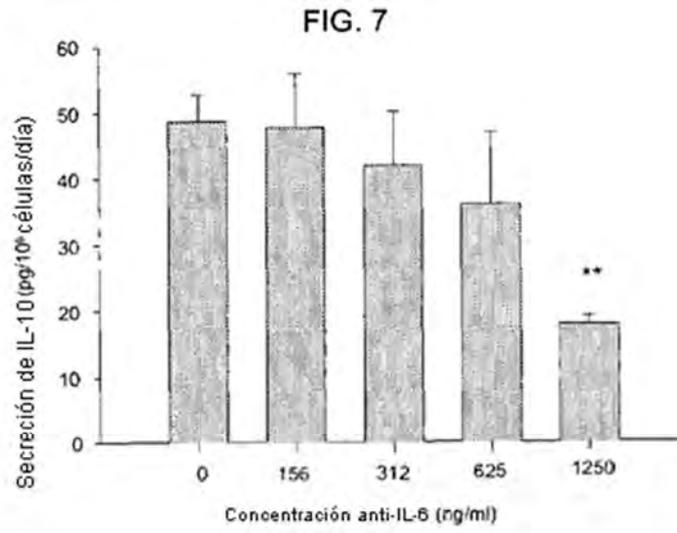


FIG. 8

FIG. 9

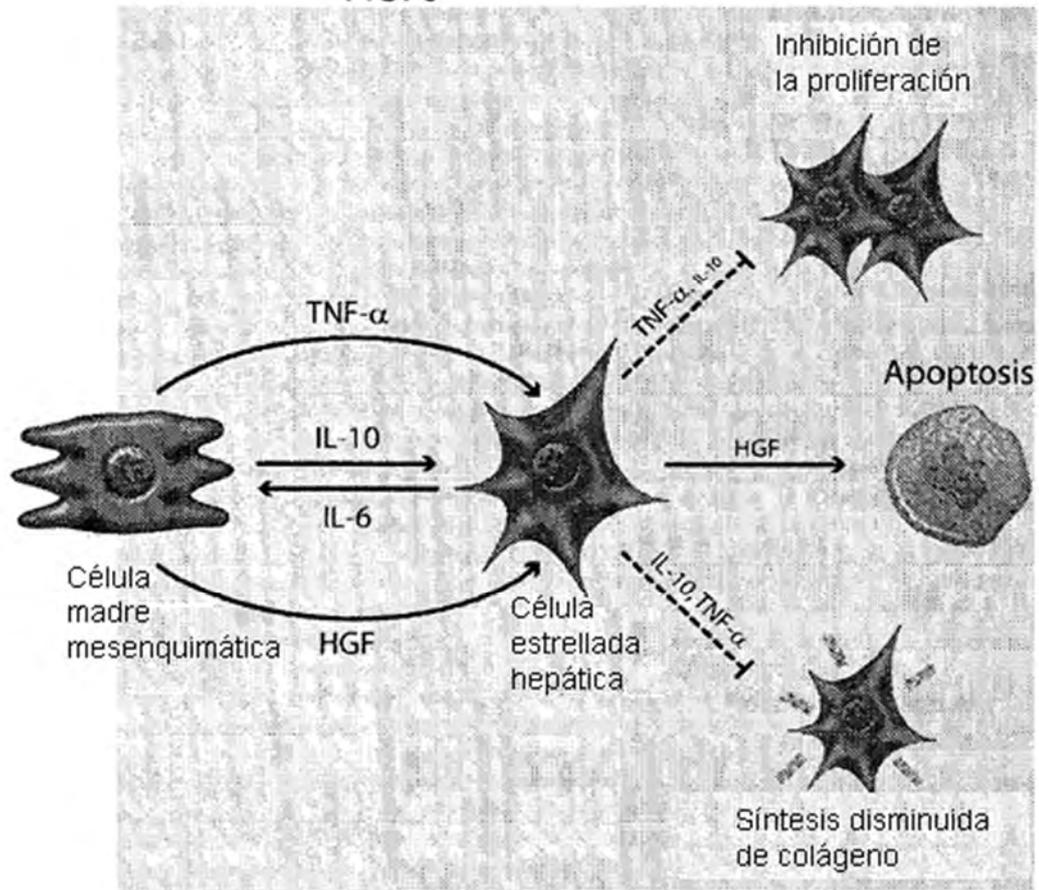


FIG. 10

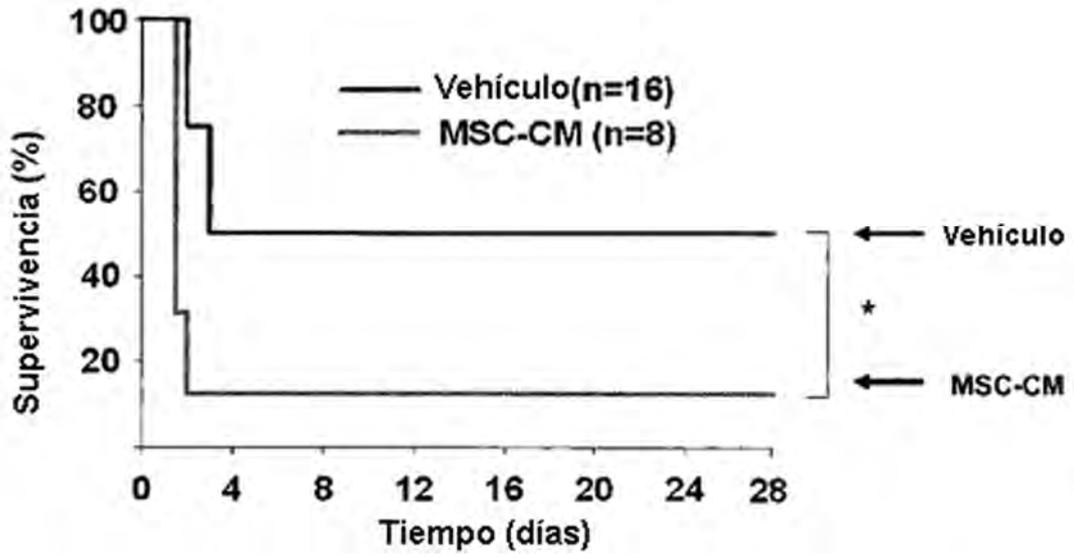


FIG. 11A

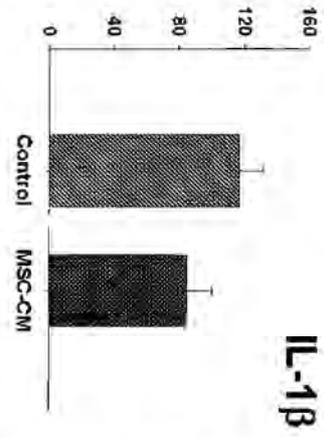


FIG. 11B

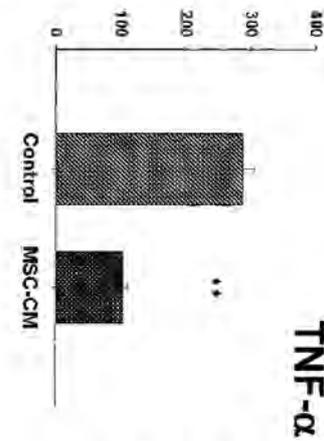


FIG. 11C

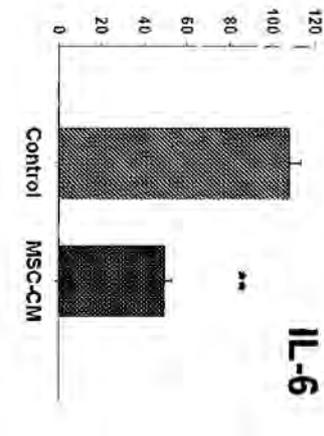


FIG. 11D

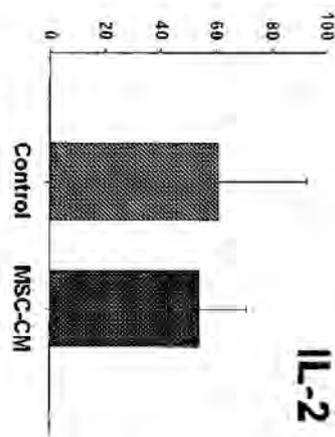


FIG. 11E

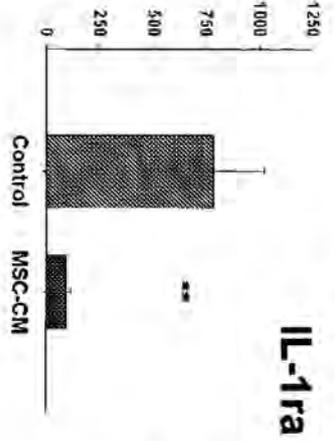


FIG. 11F

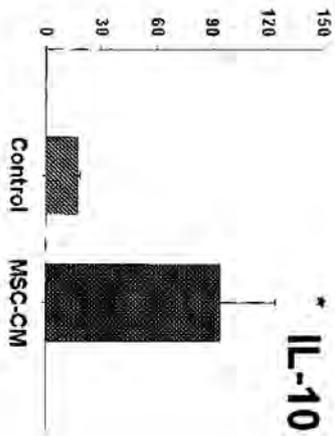


FIG. 12A

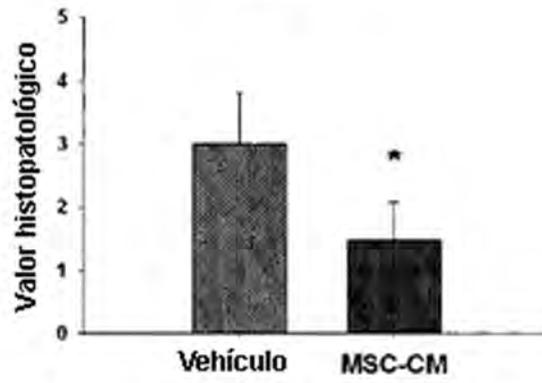


FIG. 12B

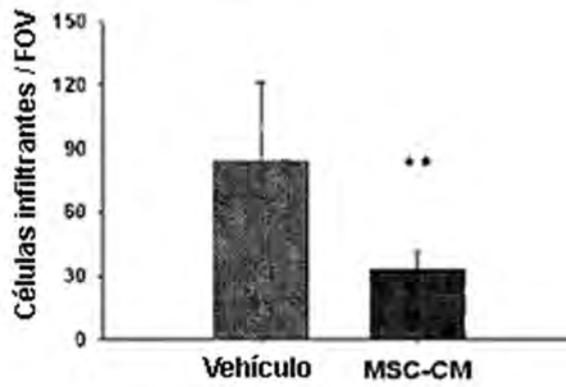


FIG. 13

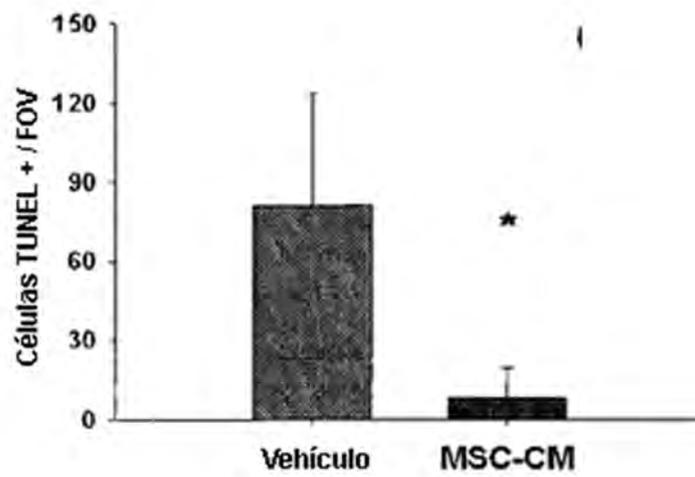


FIG. 14

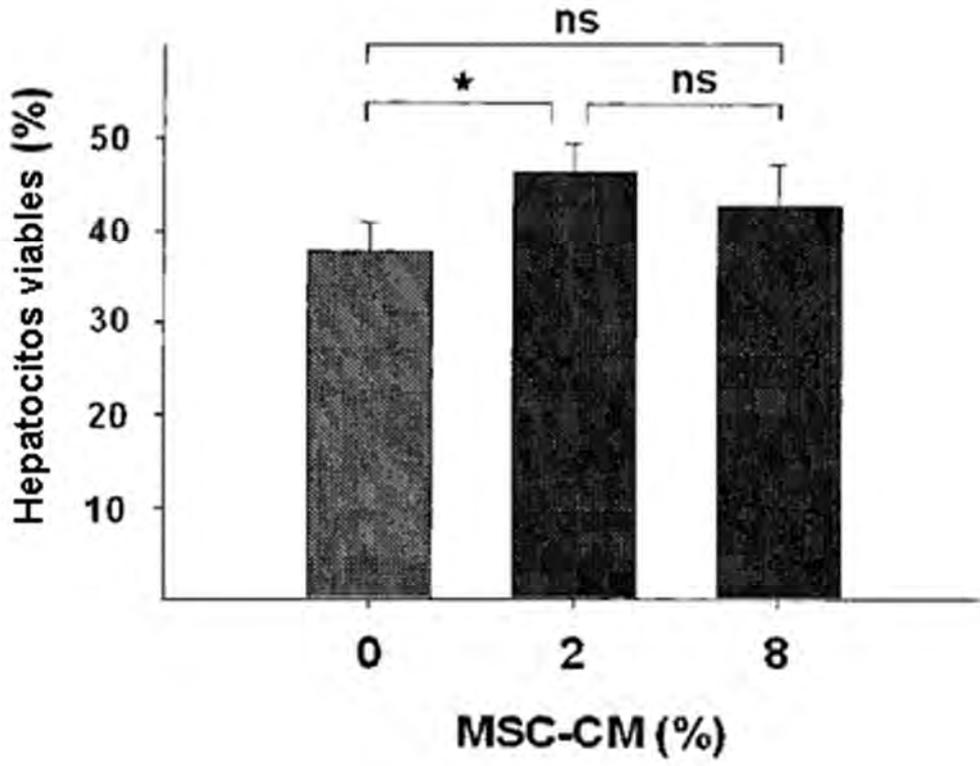


FIG. 15

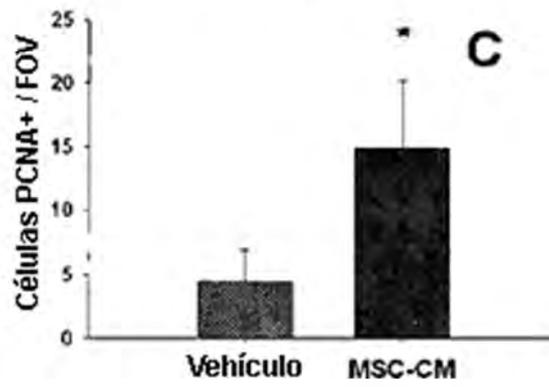
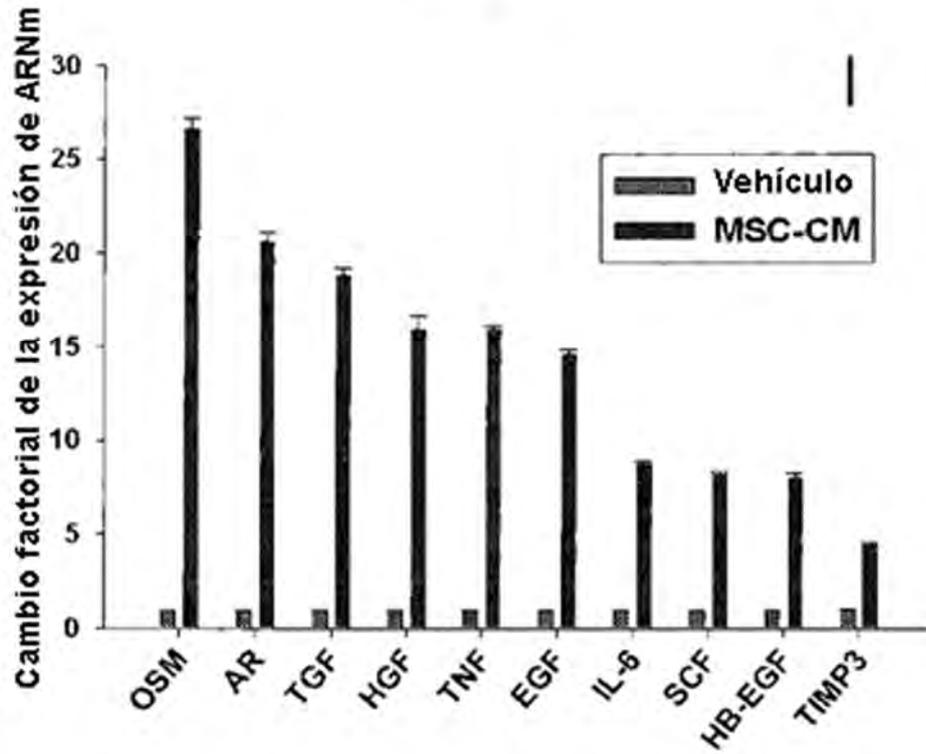


FIG. 16



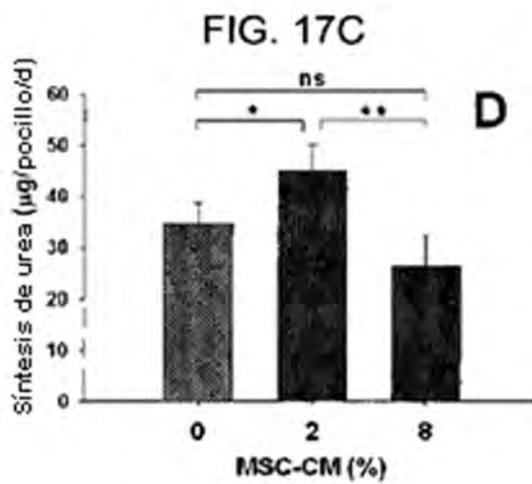
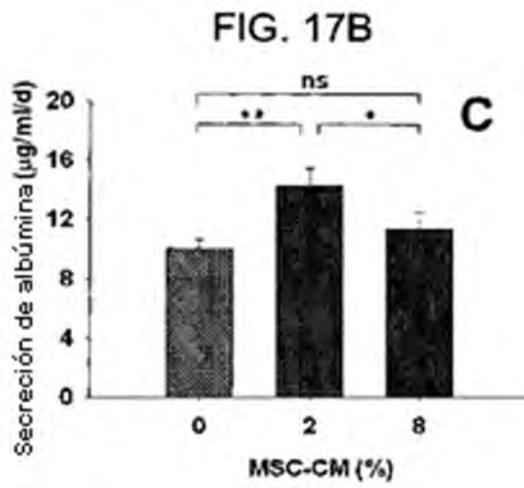
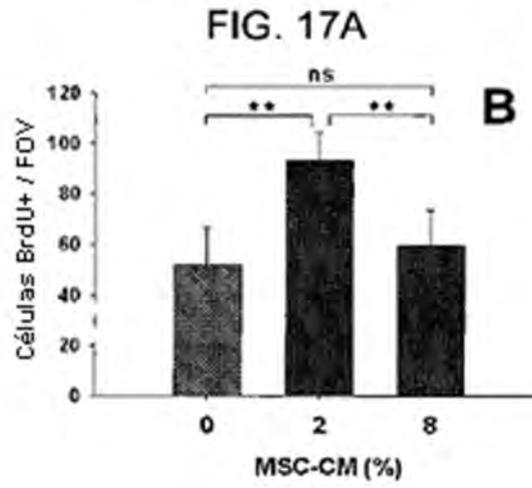
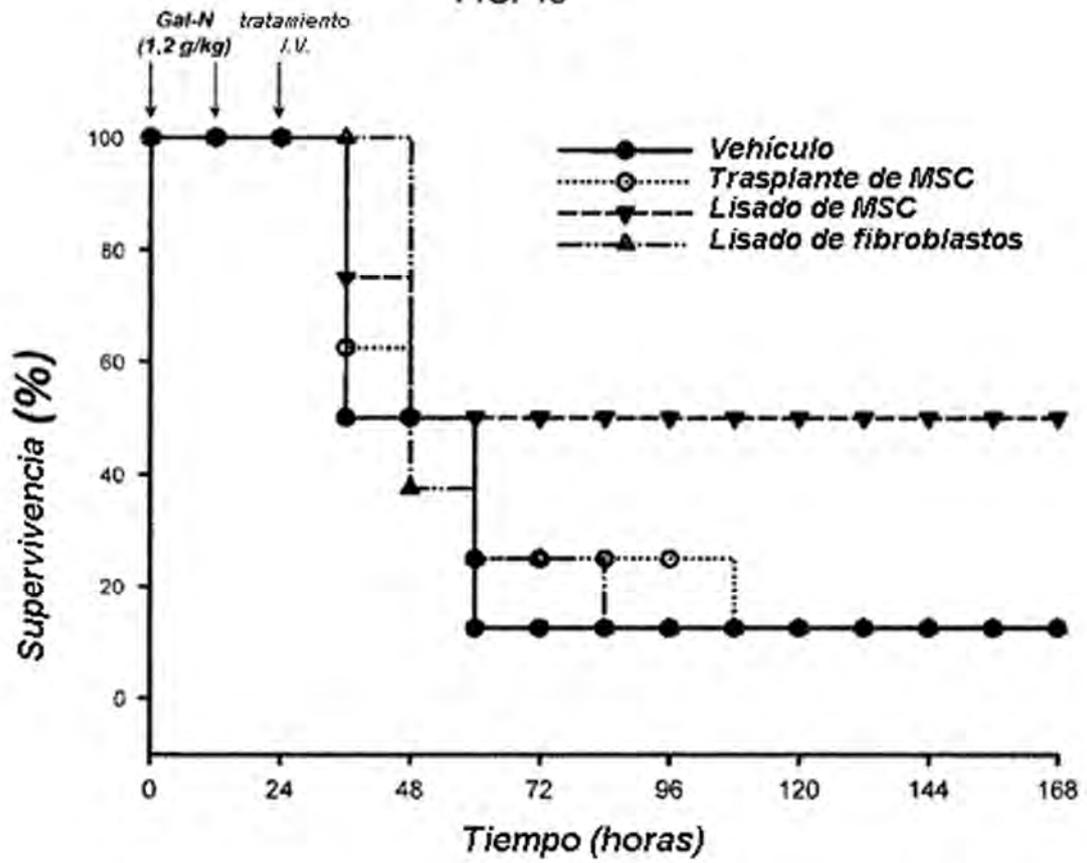


FIG. 18



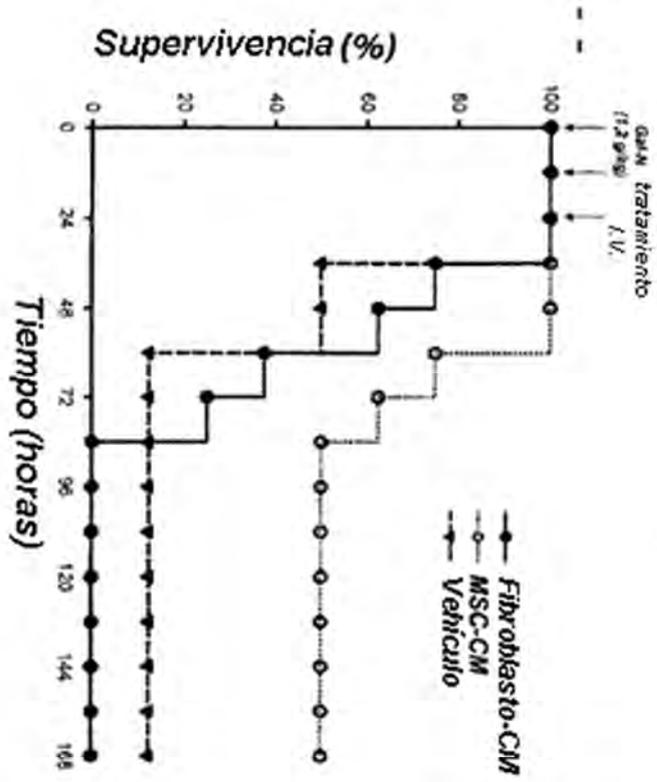


FIG. 19A

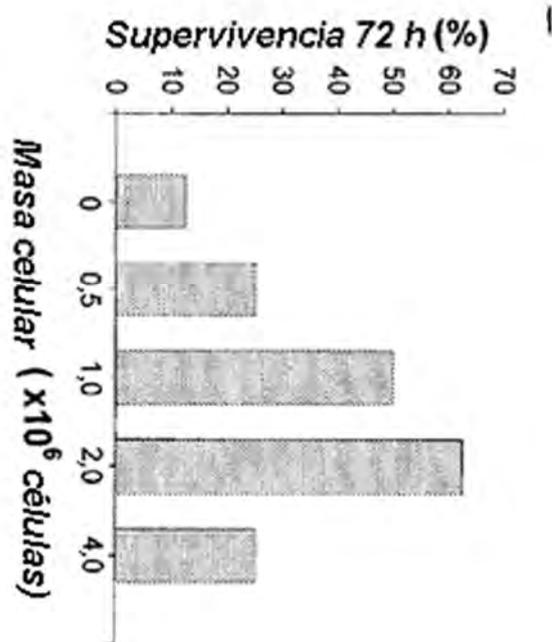
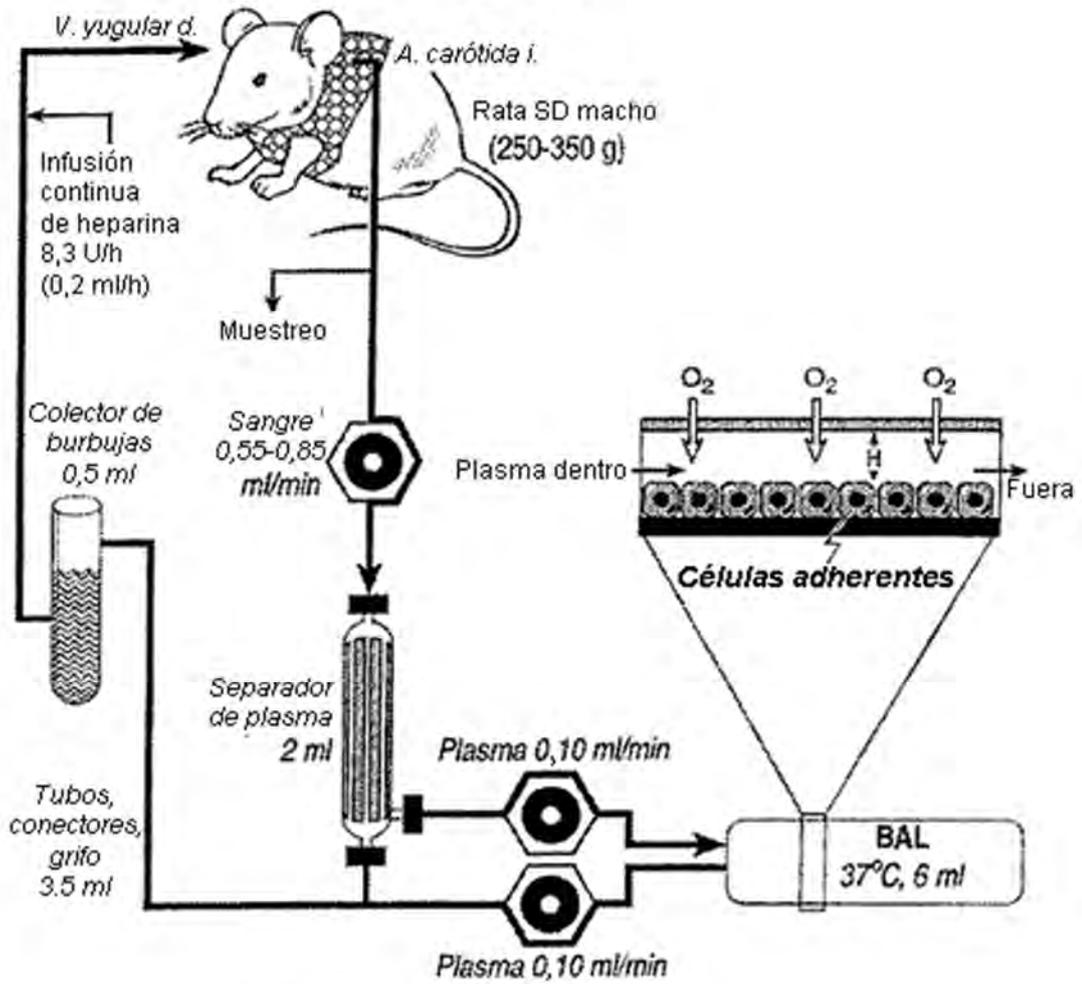


FIG. 19B

FIG. 20



Inducción con D-galactosamina

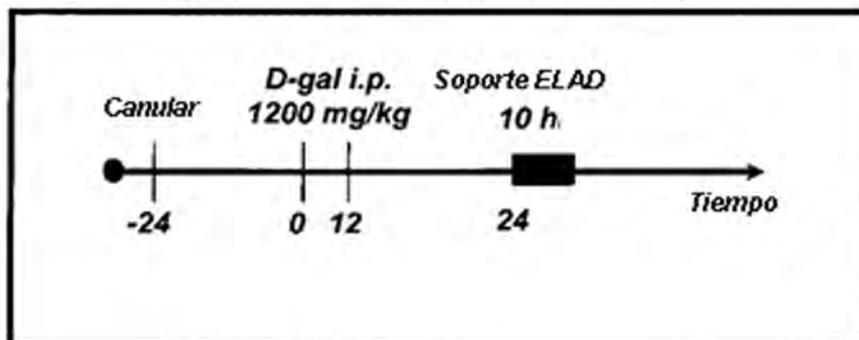


FIG. 21A

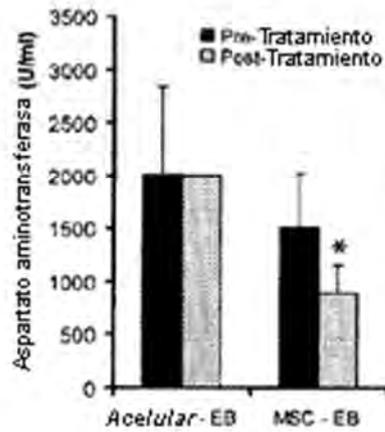


FIG. 21B

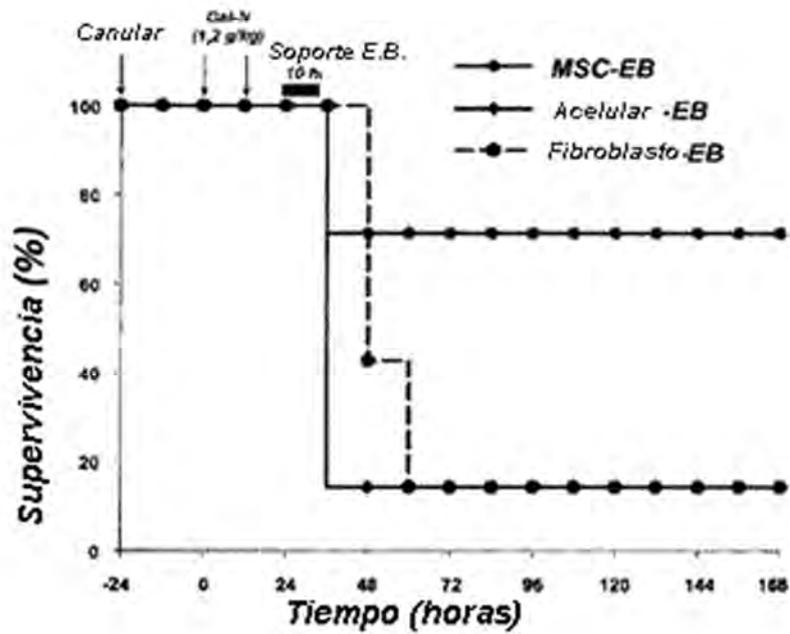
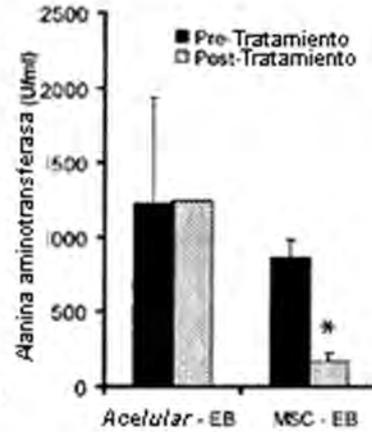


FIG. 21C

FIG. 22A

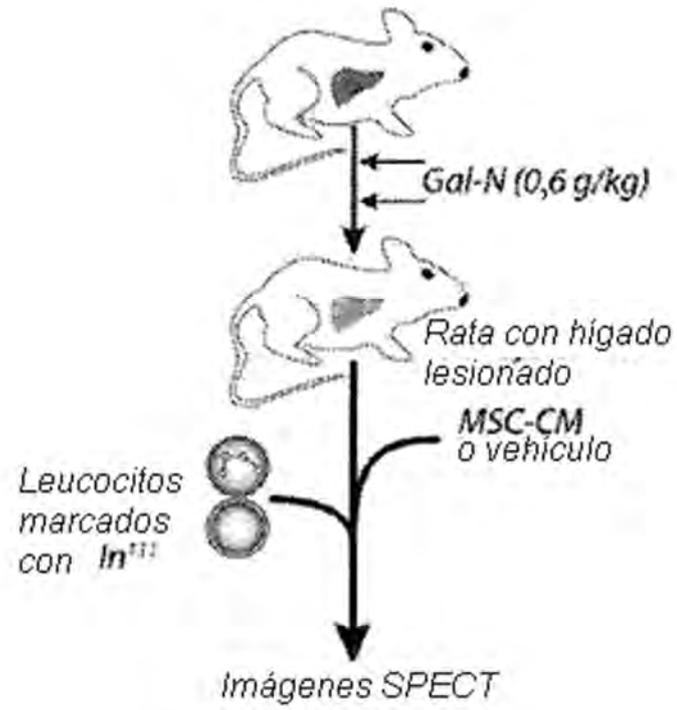


FIG. 22B

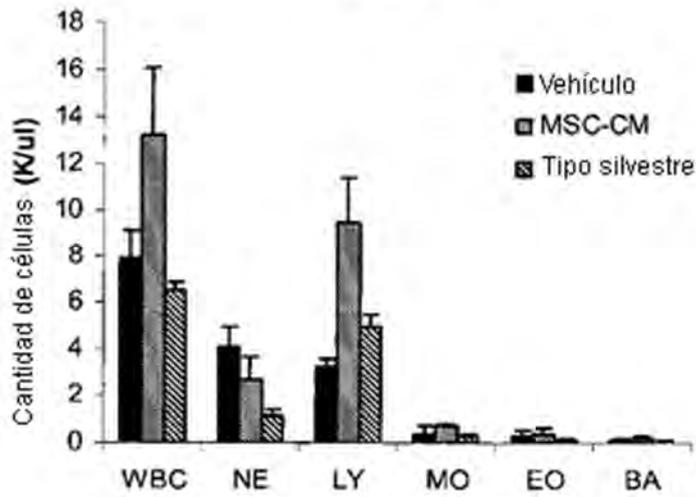


FIG. 22C

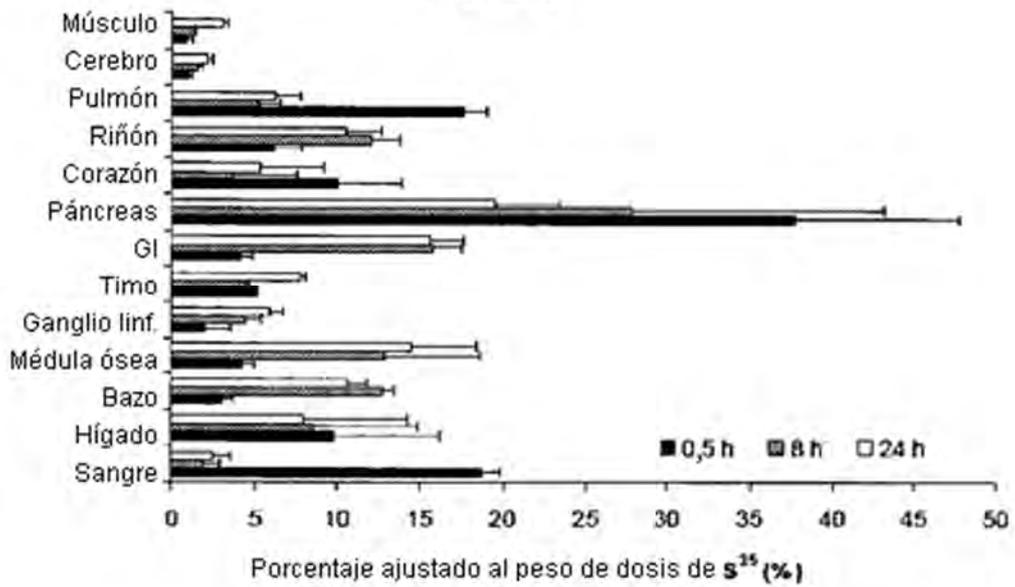


FIG. 23A

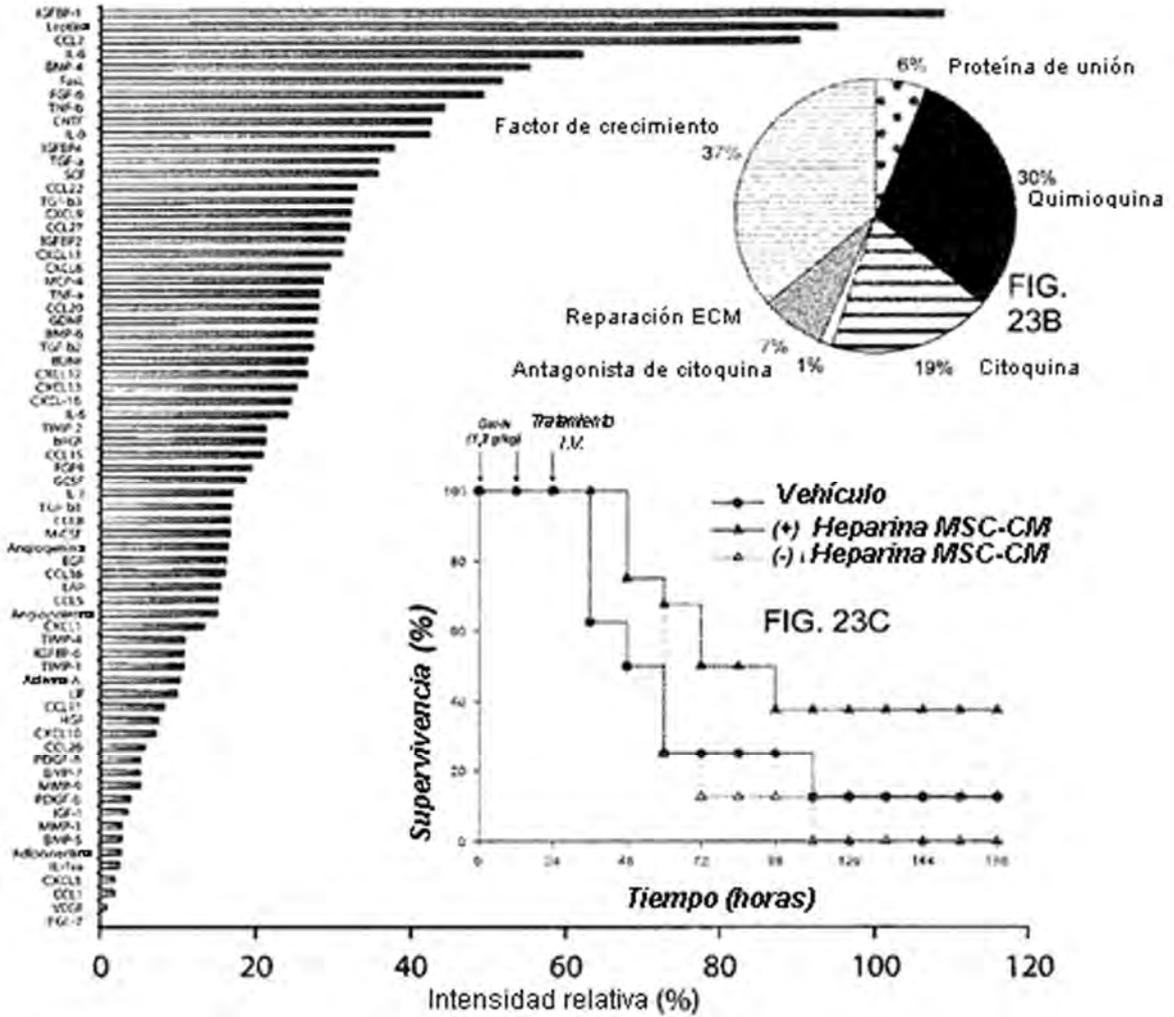


FIG. 24

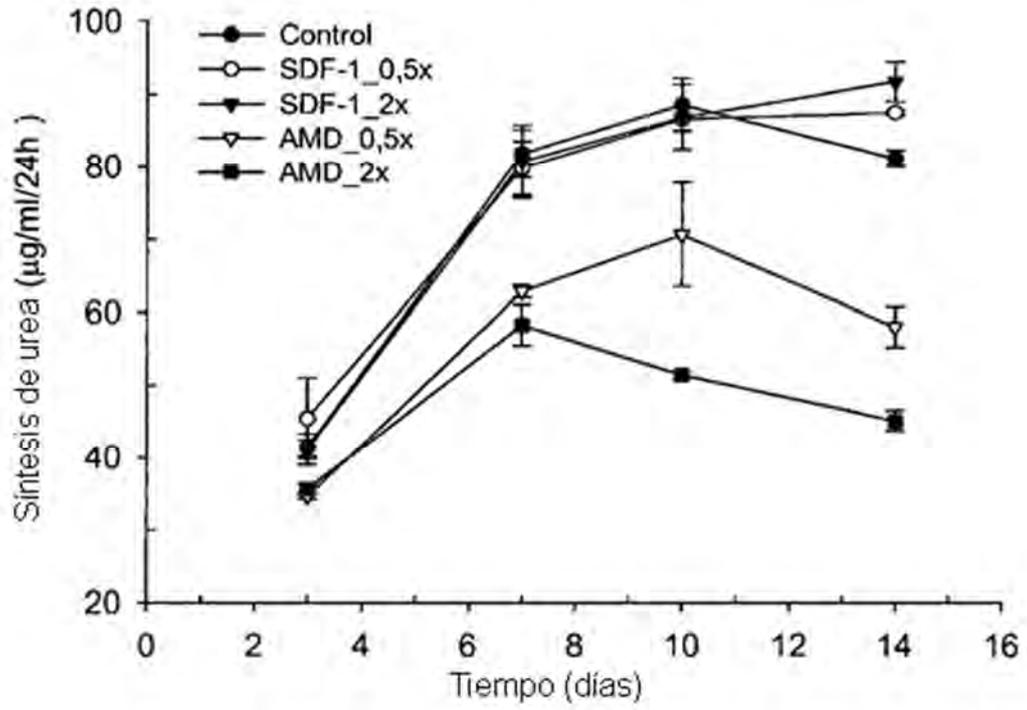


FIG. 25

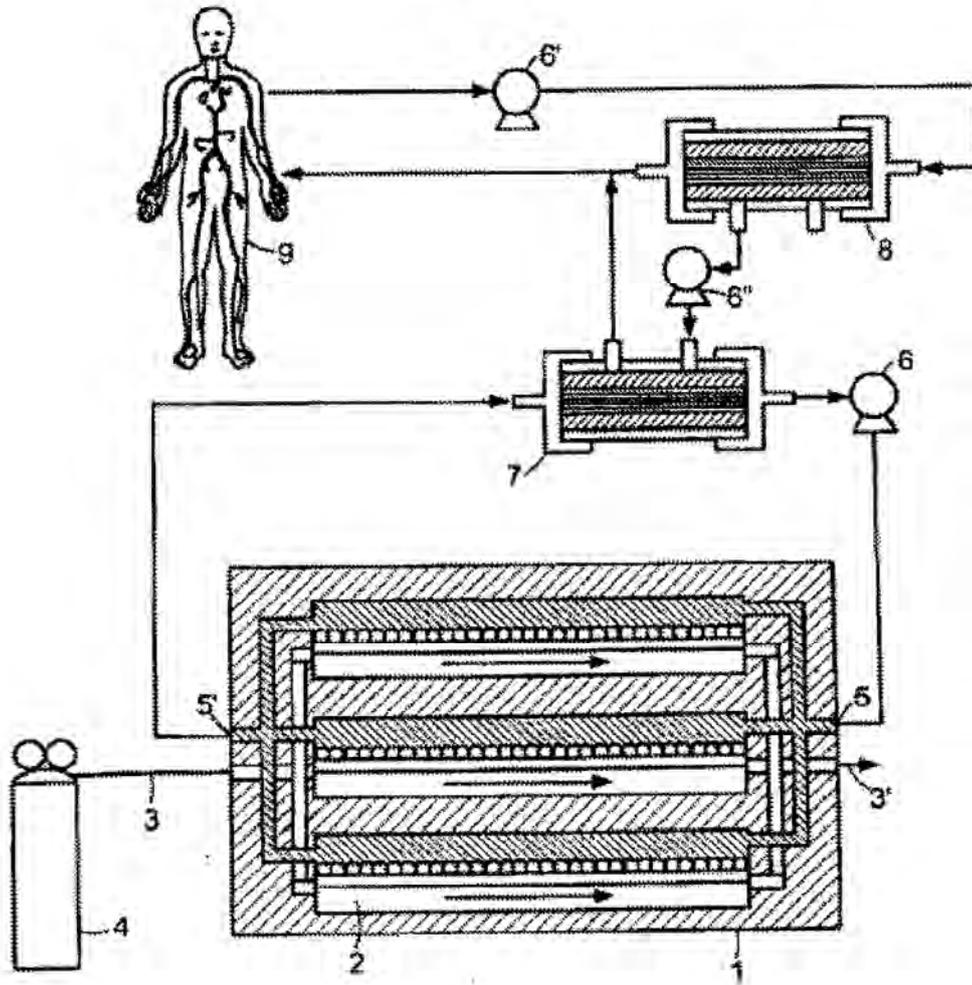


FIG. 26

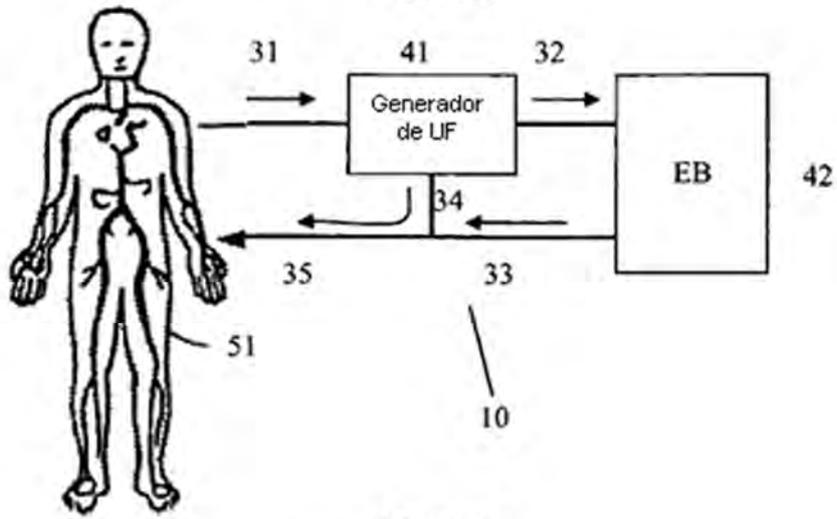


FIG. 27

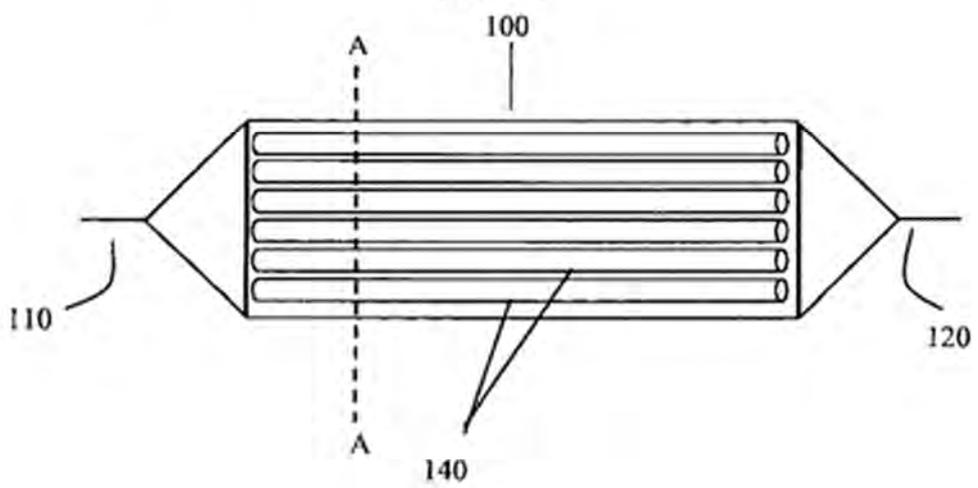


FIG. 28

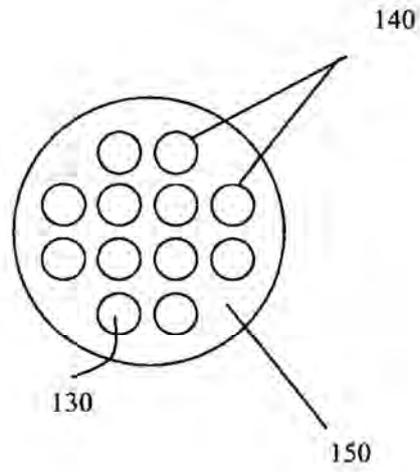


FIG. 29

