

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 522**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/727** (2006.01)  
**A61K 35/28** (2006.01)  
**A61K 35/407** (2015.01)  
**A61K 38/58** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61P 7/02** (2006.01)  
**A61K 38/55** (2006.01)  
**A61K 31/737** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2012 E 12704242 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2667878**

54 Título: **Composiciones y métodos para el trasplante celular**

30 Prioridad:

**25.01.2011 EP 11152119**

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

**08.06.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN (100.0%)  
Place de l'Université 1  
1348 Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:

**STEPHENNE, XAVIER;  
SOKAL, ETIENNE;  
NAJIMI, MUSTAPHA;  
EECKHOUDT, STÉPHANE y  
HERMANS, CÉDRIC**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 573 522 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 y métodos para el trasplante celular

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la regeneración tisular y en particular al trasplante celular. La presente invención se dirige a composiciones y métodos para mejorar el trasplante celular y particularmente para inhibir la actividad procoagulante asociada con el trasplante celular.

10

**Antecedentes de la invención**

Diversas afecciones causadas por órganos enfermos o dañados de alguna otra forma o funcionalmente deteriorados pueden tratarse por medio de trasplantes de órganos. En particular, el trasplante de corazón, de riñones, de hígado, de pulmón, de páncreas, de intestino, y timo pueden realizarse rutinariamente con una tasa satisfactoria de éxito. Sin embargo, un inconveniente importante en el trasplante de órganos sigue siendo la necesidad de hallar un donante compatible para cada paciente receptor, puesto que la incompatibilidad entre el donante y el receptor puede provocar el rechazo del órgano trasplantado. El rechazo del trasplante puede minimizarse mediante la serotipificación que determina la compatibilidad entre el donante-receptor más adecuado y por el empleo de fármacos inmunosupresores, aunque la idoneidad de estos enfoques puede verse aminorada debido a la urgencia médica en algunos casos. Asimismo, el empleo permanente de fármacos inmunosupresores representa una carga sobre el paciente receptor en términos de efectos secundarios y cumplimiento.

15

20

25

30

En los últimos años, la terapia celular que emplea diversas fuentes de células se utiliza cada vez más en la medicina regenerativa en seres humanos. El trasplante de células puede proporcionar una valiosa terapia alternativa o adicional (adyuvante) para trasplantes de órganos. Además, como no todos los órganos pueden trasplantarse con eficacia, el trasplante celular se convierte con frecuencia en la única cura disponible. Ventajosamente, las complicaciones relacionadas con la compatibilidad en el trasplante celular pueden, al menos, en teoría, plantear cada vez menos problemas. Por ejemplo, las células que se van a trasplantar pueden aislarse en ocasiones u obtenerse del paciente (es decir, trasplante celular autólogo), reduciendo de este modo el riesgo de rechazo. Alternativamente, las células de trasplantes alogénicos o incluso xenogénicos pueden tipificarse fácilmente y almacenarse durante un periodo prolongado en bancos o inventarios celulares, a partir de los cuales puede obtenerse genéticamente una compatibilidad o al menos células compatibles para la mayoría de los receptores.

35

40

Cuando se contempla la administración de células a un paciente, puede resultar preferente que las células o los cultivos celulares se seleccionen de forma tal que se maximice la compatibilidad de los tejidos entre el paciente y las células administradas, reduciendo así las posibilidades de rechazo de las células administradas del sistema inmunitario del paciente (rechazo del injerto contra el huésped). Por ejemplo, de manera ventajosa, las células que pueden seleccionarse generalmente presentan cualquiera de los haplotipos de HLA idénticos (incluyendo uno o preferentemente más HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ; preferentemente uno o preferentemente todos los HLA-A, HLA-B y HLA-C) en el paciente, o poseen la mayoría de los alelos del antígeno de HLA comunes al paciente y ninguno o casi ninguno de los antígenos de HLA en los que el paciente contiene anticuerpos anti-HLA preexistentes.

45

50

Se pueden ejecutar procedimientos de regeneración tisular mediante el trasplante celular empleando una gran variedad de fuentes celulares, y utilizando normalmente células con capacidad proliferativa. Por ejemplo, en diversas enfermedades metabólicas congénitas humanas, el trasplante de células hepáticas puede recuperar como mínimo cierto grado de control metabólico. En otro ejemplo, el trasplante intraportal de islotes pancreáticos proporciona un mejor control glucémico e independencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo 1. Por ejemplo, pueden emplearse células madre pluripotentes capaces de diferenciarse en una plétora de linajes celulares, o células progenitoras comprometidas a uno o algunos linajes celulares (multipotentes) y de presentar diversos grados de diferenciación como fuente de células para el trasplante celular.

55

60

A pesar de algunos éxitos clínicos, las terapias actuales de trasplante celular requieren mejoras adicionales. Una inquietud entre los médicos y las autoridades sanitarias son las posibles consecuencias de la actividad procoagulante de determinadas células trasplantadas en el prendimiento de las células y otras complicaciones. Por ejemplo, se ha descrito que la actividad procoagulante de los trasplantes de islotes provoca la pérdida del injerto y acontecimientos trombóticos intraportales (Beuneu *et al.* Diabetes, 2004, vol. 53, 1407-11; Moberg *et al.* Lancet, 2002, vol. 360, 2039-45). La actividad procoagulante se ha apreciado también en hepatocitos primarios aislados (Stephene *et al.* Liver Transpl., 2007, vol. 13, 599-606).

65

Por consiguiente, persiste una necesidad urgente en la materia por mejorar el éxito en el trasplante celular y en el posible prendimiento celular, y en particular, reducir las complicaciones protrombóticas asociadas al trasplante de células.

Furlani *et al. Microvasc Res.*, 2009, vol. 77, 370-6 estudiaron la cinética de las células madre mesenquimales humanas tras la administración intravascular en la vasculatura del músculo cremáster en ratones con IDCS por microscopía intravital. Los autores propusieron que la infusión intraarterial de células madre mesenquimales puede dar lugar a la oclusión en la vasculatura distal debido al tamaño relativamente grande de las células.

5

### Sumario de la invención

Tras haber llevado a cabo exhaustivas evaluaciones *in vitro* y clínicas, los inventores han averiguado que la actividad procoagulante descrita previamente en las células primarias aisladas, tales como hepatocitos y células de los islotes, se observa igualmente en las células madre y en las células progenitoras, tales como células madre mesenquimales. La actividad procoagulante de las células madre y progenitoras puede ser motivo de preocupación en el trasplante de estas células, en particular, puede causar modificaciones no deseadas en el torrente sanguíneo, pérdida de las células trasplantadas, reducción del posible prendimiento celular y/o acontecimientos trombóticos. Además, esta actividad procoagulante no puede controlarse por la heparina no fraccionada, el anticoagulante convencional para el trasplante de hepatocitos.

Por tanto, los inventores investigaron maneras para contrarrestar la actividad procoagulante de las células trasplantadas y descubrieron que la administración concomitante o asociada de células que presentan actividad procoagulante con un activador de antitrombina y un inhibidor de la trombina proporciona una combinación particularmente eficaz y segura que previene los efectos deletéreos procoagulantes. Sorprendentemente, aunque la administración concomitante de células con actividad procoagulante, ya sea con el activador de antitrombina o solo un inhibidor de la trombina, no evita suficientemente los acontecimientos trombóticos en concentraciones fisiológicamente aceptables del activador de antitrombina e inhibidor de la trombina, respectivamente, la combinación del activador de antitrombina junto con el inhibidor de la trombina puede prevenir ventajosamente la trombosis inducida por el tratamiento celular y las complicaciones asociadas a la trombosis (p. ej., trombosis local e inducción de la inflamación local). Por consiguiente, los inventores se dieron cuenta de una terapia de combinación particularmente ventajosa e incluso sinérgica y protocolos clínicos útiles para reducir la actividad procoagulante de las células trasplantadas, en particular, células madre y progenitoras.

Por lo tanto, un aspecto se refiere a una combinación que comprende células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina.

Otro aspecto se refiere a una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos.

Cuando proceda, la combinación puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de las células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina. Es más, pueden mezclarse o separarse las células, al menos un activador de antitrombina, y/o al menos un inhibidor de la trombina en dicha combinación. Se desvela asimismo un método para producir dicha combinación que comprende mezclar las células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina.

Como se pretende a lo largo de la presente memoria descriptiva, cuando se hace referencia a una combinación que comprende las células descritas en el presente documento, especialmente las células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, o cuando se hace referencia a una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, o cuando se refiere a cualquier tema en cuestión que comprende o emplea dicha combinación, los constituyentes individuales de la combinación pueden configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden a un sujeto, o pueden administrarse a un sujeto por separado, simultánea o secuencialmente en cualquier orden. En un ejemplo, las células, al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina pueden incluirse en la suspensión celular que se va a administrar. En otro ejemplo, las células y al menos un activador de antitrombina pueden incluirse en la suspensión celular a administrar, mientras que al menos un inhibidor de la trombina puede separarse de dicha suspensión celular y se administrará al sujeto simultánea o secuencialmente con dicha suspensión celular. En otro ejemplo, las células y al menos un inhibidor de la trombina pueden incluirse en la suspensión celular que se va a administrar, mientras que al menos un activador de antitrombina puede separarse de dicha suspensión celular y se administrará al sujeto simultánea o secuencialmente con dicha suspensión celular. En un ejemplo adicional, tanto al menos un activador de antitrombina como al menos un inhibidor de la trombina pueden separarse de la suspensión celular y se administrarán al sujeto simultánea o secuencialmente con la suspensión celular, y de forma simultánea o secuencial entre sí. Cuando la administración de los constituyentes es secuencial, ha de entenderse que se seleccionará el momento de administración para permitir las acciones deseadas de los constituyentes producidas por su combinación.

Se desvela adicionalmente una composición farmacéutica que comprende (a) una combinación que comprende células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina y (b) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

65

Se desvela asimismo una composición farmacéutica que comprende (a) una combinación que incluye al menos un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, y (b) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 La composición farmacéutica puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de las células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina. Las células, al menos un activador de antitrombina, y/o al menos un inhibidor de la trombina en dicha composición farmacéutica pueden mezclarse o pueden separarse. También se desvela un método para producir dicha  
10 composición farmacéutica que comprende mezclar las células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, cada uno por separado o en una mezcla, con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 Además se proporciona un kit de diversos componentes o un artículo de fabricación que comprende una combinación que incluye células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, y que comprende además de forma opcional uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 Igualmente se proporciona un kit de diversos componentes o un artículo de fabricación que comprende una combinación que incluye al menos un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, y que comprende además de forma opcional uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 El kit de diversos componentes o artículo de fabricación puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de las células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina. Las células, al menos un activador de antitrombina, y/o al menos un inhibidor de la trombina en dicho kit de diversos componentes o artículo de fabricación pueden mezclarse o separarse, en particular, pueden separarse, por ejemplo, se contienen en recipientes separados. Se desvela incluso un método para producir dicho kit de diversos componentes o artículo de fabricación que comprende incluir las células, al menos un activador de  
30 antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en un kit de diversos componentes o un artículo de fabricación. También se proporciona el kit de diversos componentes o artículo de fabricación para su uso en todas y cada una de las indicaciones descritas en el presente documento.

35 Se describen además todos y cada uno de los siguientes aspectos:

- una combinación que comprende células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina para su uso como medicamento;
- 40 - una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, para su uso como medicamento;
- 45 - una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el trasplante de dichas células;
- 50 - uso de una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para el trasplante de dichas células;
- 55 - una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de la trombosis o complicaciones trombóticas, en particular trombosis o complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de dichas células;
- 60 - uso de una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la trombosis o complicaciones trombóticas, en particular trombosis o complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de dichas células;
- 65 - una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la

trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en inhibir la actividad procoagulante de dichas células *in vivo*;

- 5 - uso de una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad procoagulante de dichas células *in vivo*;
- 10 - uso de una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina para inhibir la actividad procoagulante de dichas células *in vitro*;
- 15 - un método para inhibir *in vitro* la actividad procoagulante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, que comprende proporcionar una combinación que comprende dichas células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina;
- 20 - un método para el trasplante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, a un sujeto en necesidad de dicho trasplante que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una combinación que comprende dichas células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables;
- 25 - un método para tratar la trombosis o complicaciones tromboticas, en particular trombosis o complicaciones tromboticas causadas por el trasplante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una combinación que comprende dichas células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables;
- 30 - un método para inhibir la actividad procoagulante de las células, tal como cualquier célula que se describe en el presente documento, *in vivo* en un sujeto en necesidad de dicha inhibición, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una combinación que comprende dichas células, al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 Se proporcionan también usos de una combinación que comprende cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, en todas y cada una de las indicaciones descritas previamente.

45 Un aspecto adicional se refiere a una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina. Cuando corresponda, la combinación puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina. Además, pueden mezclarse o pueden separarse al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina en dicha combinación. También se desvela un método para producir dicha combinación que comprende mezclar al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina.

50 Se desvela adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una combinación que incluye al menos un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina. Al menos pueden mezclarse o separarse un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina en dicha composición farmacéutica. Asimismo se desvela un método para producir dicha composición farmacéutica que comprende mezclar al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, cada uno por separado o en una mezcla, con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

60 De la misma manera, se proporciona un kit de diversos componentes o un artículo de fabricación que comprende una combinación con al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, y que comprende además de forma opcional uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El kit de diversos componentes o artículo de fabricación puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina. Al menos pueden mezclarse o separarse un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina en dicho kit de diversos componentes o artículo de fabricación, en particular pueden separarse, por ejemplo, se contienen en recipientes separados. También se desvela un método para producir dicho kit de diversos componentes o artículo de fabricación que comprende incluir al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en un kit de diversos componentes o un

artículo de fabricación. Incluso se proporciona el kit de diversos componentes o artículo de fabricación para su uso en todas y cada una de las indicaciones descritas en el presente documento.

También se describen todos y cada uno de los consiguientes aspectos:

- 5
- una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina para su uso como medicamento;
- 10
- una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el trasplante de células con actividad procoagulante (es decir; conjuntamente con el trasplante celular);
- 15
- una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el trasplante de células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos (es decir; conjuntamente con el trasplante celular);
- 20
- uso de una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para el trasplante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante;
- 25
- una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de la trombosis o complicaciones trombóticas, en particular trombosis o complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante;
- 30
- uso de una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la trombosis o complicaciones trombóticas, en particular trombosis o complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante;
- 35
- una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en inhibir la actividad procoagulante de dichas células, como por ejemplo cualquier célula que se describe en el presente documento, *in vivo*;
- 40
- uso de una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad procoagulante de dichas células, como por ejemplo cualquier célula que se describe en el presente documento, *in vivo*;
- 45
- uso de una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina para inhibir la actividad procoagulante de dichas células, como por ejemplo cualquier célula que se describe en el presente documento, *in vitro*;
- 50
- un método para inhibir *in vitro* la actividad procoagulante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, que comprende poner en contacto dichas células con una combinación con al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina;
- 55
- un método para tratar la trombosis o complicaciones trombóticas, en particular trombosis o complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de cualquier célula que se describe en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables;
- 60
- un método para inhibir la actividad procoagulante de las células *in vivo* en un sujeto en necesidad de dicha inhibición, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 65
- Preferentemente, cualquiera de los métodos previos puede comprender las etapas de: (a) preparar una composición que comprende una suspensión celular de las células descritas en el presente documento, especialmente células

con actividad procoagulante en una solución acuosa que contiene al menos un activador de antitrombina; (b) preparar una solución acuosa que contiene al menos un inhibidor de la trombina (es decir, distinto o separado de la composición (a)); y (c) administrar la composición definida en (a) y la solución definida en (b) de forma simultánea, por separado o secuencialmente al sujeto. Por consiguiente, preferentemente en los aspectos anteriores, (a) se preparará una composición que comprende una suspensión celular de las células que se describen en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante en una solución acuosa que contiene al menos un activador de antitrombina; (b) se preparará una solución acuosa que contiene al menos un inhibidor de la trombina (es decir, distinto o separado de la composición (a)); y (c) se administrará la composición definida en (a) y la solución definida en (b) de forma simultánea, por separado o secuencialmente a un sujeto.

Asimismo se proporcionan usos de una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina en todas y cada una de las indicaciones descritas previamente.

También se proporciona una distribución que comprende un instrumento quirúrgico o dispositivo para la administración de una composición a un sujeto, tal como, por ejemplo, por vía sistémica, tópica, en un órgano o tejido (p. ej., vena porta del hígado, bazo, páncreas, hígado, cápsula renal, peritoneo y bolsa omental), y que comprende además la combinación o composición farmacéutica que comprende las células que se describen en el presente documento, especialmente células procoagulantes, como se enseña en el presente documento, en el que la distribución se adapta a la administración de dicha combinación o composición farmacéutica, por ejemplo, por vía sistémica, tópica, en un órgano o tejido. Por ejemplo, un instrumento quirúrgico adecuado puede ser capaz de inyectar una composición líquida que comprende la combinación o composición farmacéutica ilustrada en el presente documento, por ejemplo, por vía sistémica, tópica, en un órgano o tejido.

Las células con actividad procoagulante que se pretenden a lo largo de la presente memoria descriptiva abarcan cualquier célula capaz de activar la cascada de coagulación e inducir coagulación o formación de coágulos. La actividad procoagulante puede determinarse oportunamente empleando cualquier ensayo de coagulación conocido, incluyendo, entre otros, tromboelastometría.

Por ejemplo, pueden señalarse células según tengan actividad procoagulante en el sentido de la presente invención cuando, en un ensayo de tromboelastometría convencional, las células muestran un tiempo de coagulación (TC) significativamente más breve ( $p < 0,05$  aplicación de un ensayo apto de significación estadística) que un control negativo sin adición de células. Considerando que la tromboelastometría representa una técnica convencional de laboratorio, los motivos de orientación adicional de tromboelastometría apropiada para ensayar la naturaleza procoagulante de las células que se pretende en el presente documento pueden ser los siguientes:

Se realizan mediciones en un analizador ROTEM® delta (Pentapharm, Munich, Alemania). ROTEM® evalúa la cinética, la calidad de formación de coágulos y la lisis de los coágulos en tiempo real. El tiempo de coagulación (TC) se define como el periodo de tiempo que va desde el comienzo del análisis al inicio de la formación de coágulos, hasta alcanzar la amplitud de 2 mm. Tras una breve pausa, se pipetea 300  $\mu$ l de sangre entera en un vaso precalentado a 37 °C. Las células suspendidas ( $5 \times 10^5$ ) se añaden posteriormente a la sangre entera (control negativo: volumen igual del medio de suspensión sin células en suspensión). Se añaden 20  $\mu$ l de reactivo desencadenante que contiene un factor tisular (FT) a una dilución final de 1:17.000/0,35 pM (por ejemplo, Innovin, Siemens, Marburg, Alemania) diluidos en tampón Owren (por ejemplo, disponible en Clin-Tech Ltd, R. U.) a la mezcla de células-sangre seguido del agregado de 20  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  0,2 M. Tras la adición de calcio, la medición se inicia automáticamente. Si no se observa coagulación alguna después de 1.800 s, se detiene la tromboelastometría.

Como se desvela en el presente documento, las células desveladas en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante, pueden presentar cualquier origen y/o estado de diferenciación. Las células desveladas en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, se seleccionan entre el grupo que consiste en células madre y células progenitoras. Las células desveladas en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, son las células madre mesenquimales. Preferentemente, además, las células que se pretenden en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, son las células progenitoras o madre hepáticas obtenidas del adulto.

En una realización, las células que se pretenden en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, son las células madre derivadas de hígado humano adulto descritas generalmente en el documento WO 2007/071339; más particularmente, las células progenitoras o madre humanas procedentes del hígado adulto que expresan alfa actina de músculo liso (AAML) y albúmina (ALB) y no expresan citoqueratina-19 (CK-19) como se describe en el mismo; aún más particularmente, las células progenitoras o madre humanas procedentes del hígado adulto que expresan CD90, CD73, CD44, vimentina, AAML y ALB y expresan opcionalmente CYP3A4 y no expresan CK-19 como se describe en el mismo; aún más particularmente, las células madre derivadas de hígado humano adulto (CMHHA) descritas en Najimi *et al.*, *Cell Transplant*, 2007, vol. 16, 717-28; y aún más particularmente las células depositadas por el solicitante del documento WO 2007/071339 el 20 de febrero de 2006 conforme al Tratado de Budapest con la Colección Coordinada Belga de Microorganismos (CCBM/PLBM) con número de acceso PLBM 6452CB.

En una realización, las células pretendidas en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, son las células progenitoras pluripotentes derivadas de hígado humano adulto no ovaladas descritas generalmente en el documento WO 2006/126236; más particularmente, una línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovaladas aisladas del tejido adulto que expresa marcadores celulares hepáticos y que es capaz de diferenciarse en células maduras hepáticas, en células productoras de insulina, en células osteogénicas y en células epiteliales, o también, en particular, una línea de células progenitoras pluripotentes hepáticas humanas no ovaladas aisladas del tejido adulto que expresa marcadores celulares hepáticos y que es capaz de diferenciarse en células maduras hepáticas, en células productoras de insulina, en células osteogénicas y en células endoteliales, descritas en el mismo; aún más particularmente las células madre hepáticas humanas (CMHH) descritas en Herrera *et al. Stem Cells*, 2006, vol. 24, 2840-50.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se considera que la expresión del factor tisular (también conocido como factor tisular plaquetario, factor III, tromboquinasa o CD142) mediante las células con actividad procoagulante es al menos en parte causante de la actividad procoagulante de dichas células (véanse, p. ej., Beuneu *et al.* 2004, Moberg *et al.* 2002 y Stephenne *et al.* 2007, *supra*). En consecuencia, en una realización, las células con actividad procoagulante expresan factor tisular.

Los inventores se han percatado además que las células procoagulantes particularmente preferentes empleadas en el presente documento pueden comprender un componente con actividad procoagulante independiente de la expresión del factor tisular (FT) en las células. Más específicamente, dichas células procoagulantes retendrán, al menos, en parte, (p. ej., solo en parte o totalmente) su actividad procoagulante medida por tromboelastometría en plasma deficiente en factor VII, o medida por tromboelastometría en plasma en sangre o normal cuando se bloquea la actividad del FT, mediante preincubación de las células con anticuerpo anti-FT. Sin desear quedar ligado a la teoría, la actividad procoagulante medible de las células en plasma deficiente en factor VII puede, al menos en parte, relacionarse también con pequeñas cantidades residuales del factor VII.

Los inventores realizaron además que las células procoagulantes particularmente preferentes utilizadas en el presente documento pueden comprender un componente con actividad procoagulante resistente a la heparina. Más específicamente, dichas células procoagulantes retendrán, al menos, en parte, (p. ej., solo en parte o totalmente) su actividad procoagulante medida por tromboelastometría en presencia de únicamente heparina (es decir, en ausencia del activador de la trombina), en particular en presencia de heparina no fraccionada, enoxaparina o fondaparinux, particularmente en concentraciones de 10 UI/ml, 1 UI/ml y 0,34 mg/l, respectivamente. Por tanto, en realizaciones preferentes adicionales, las células procoagulantes empleadas en el presente documento pueden comprender un componente con actividad procoagulante independiente de la expresión del factor tisular (FT) en las células y pueden comprender un componente con actividad procoagulante resistente a la heparina.

Un activador de antitrombina que se pretende a lo largo de la presente memoria descriptiva abarca cualquier agente definido en la reivindicación 1 capaz de aumentar la unión de la antitrombina a una cualquiera o más de sus dianas. El activador de antitrombina se selecciona entre el grupo que consiste en heparina, heparina no fraccionada y heparina de bajo peso molecular, preferentemente heparina no fraccionada y fondaparinux.

Un inhibidor de la trombina que se pretende a lo largo de la presente memoria descriptiva es un agente capaz de unirse directamente a la trombina e inhibir o prevenir la activación de fibrinógeno mediada por trombina.

El inhibidor de la trombina se selecciona entre el grupo que consiste en bivalirudina e hirudina, preferentemente bivalirudina. Ventajosamente, la bivalirudina tiene una semivida breve comparable de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 minutos, permitiendo de este modo una restitución inmediata de un sujeto a un estado normal de hemostasia.

Los aspectos anteriores y adicionales, realizaciones y características preferentes de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas. Cada aspecto, realización o característica descritos en el presente documento pueden combinarse con cualquier(cualesquiera) otro(s) aspecto(s), realización(es) o característica(s) a menos que se especifique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica especificada en el presente documento, y en particular cualquier característica indicada como preferente o ventajosa, puede combinarse con cualquier(cualesquiera) otra(s) característica(s) especificada(s) en el presente documento, y en particular con cualquier(cualesquiera) otra(s) característica(s) indicada(s) como preferente(s) o ventajosa(s). El tema en cuestión de las reivindicaciones adjuntas se incorpora específicamente por la presente en la presente memoria descriptiva.

#### 60 Breve descripción de las figuras:

**Figura 1:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con y sin factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5 %. Hep: hepatocitos (blanco), (CMMHHOA): células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (negro), A: albúmina humana al 5 %. CMMHHOA contra hepatocitos: ensayo de Mann-Whitney, \*p <0,05; CMMHHOA contra hepatocitos contra control: ensayo de Kruskal-Wallis, \*\*\* p <0,001.

**Figura 2:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5 % y 10 UI/ml de heparina (hepar). Hep: hepatocitos (blanco), CMMHHAO: células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (negro), A: albúmina humana al 5 %. CMMHHAO contra hepatocitos: ensayo de Mann-Whitney, \*\* p <0,01; CMMHHAO contra hepatocitos contra control: ensayo de Kruskal-Wallis, \*\*\* p <0,001.

**Figura 3:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de plasma (300 µl) obtenido después de 30 min de incubación de sangre citratada en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5 % y heparina (hepar) (10-50-100 UI/ml). Hep: hepatocitos (blanco), CMMHHAO: células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (negro), A: albúmina humana al 5 %.

**Figura 4:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM, tras recalcificación, con y sin factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células. Hep: hepatocitos (blanco), CMMHHAO: células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (negro), A: albúmina humana al 5 %, hir, hir2, hir5: hirudina a 1, 2, 5 veces la concentración en bolo de uso clínico (0,4 mg/kg); hepar: 10 UI/ml de heparina en suspensión celular; control: sangre entera.

**Figura 5:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con y sin factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células. Hep: hepatocitos (blanco), CMMHHAO: células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (negro), A: albúmina humana al 5 %, biv, biv2: bivalirudina a 1, 2 veces la concentración en bolo de uso clínico (0,75 mg/kg); hepar: 10 UI/ml de heparina en suspensión celular; control: sangre entera. CMMHHAO contra CMMHHAO biva: ensayo de Mann-Whitney, \*\* p <0,01; A contra CMMHHAO biva: ensayo de Mann-Whitney, \*\* p <0,01; CMMHHAO biva contra CMMHHAO biva hepar: ensayo de Mann-Whitney, \*\* p <0,01; CMMHHAO hepar contra CMMHHAO biva hepar: ensayo de Mann-Whitney, \*\*\* p <0,001; CMMHHAO contra CMMHHAO biva contra CMMHHAO biva hepar: ensayo de Kruskal-Wallis, \*\*\* p <0,001.

**Figura 6:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, sin factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células. Hep: hepatocitos (blanco), CMMHHAO: células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (negro), CMMMO: células madre mesenquimales de médula ósea, CMHMO: células madre hematopoyéticas de médula ósea, A: albúmina. CMMHHAO contra hepatocitos: ensayo de Mann-Whitney, \* p <0,05; A contra CMMHHAO: ensayo de Mann-Whitney, \*\*\* p <0,001.

**Figura 7:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células madre hematopoyéticas de médula ósea suspendidas en albúmina humana al 5 % y 10 UI/ml de heparina (hepar).

**Figura 8:** Factor tisular y expresión del ARNm del inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) en CMMHHAO evaluados por RT-PCR convencional. X = células CMMHHAO; H = hepatocitos; P = CMSP; C = control negativo; FT = factor tisular (primer conjunto de cebadores); TF= factor tisular (segundo conjunto de cebadores), IVFT= inhibidor de la vía del factor tisular =, GAPDH = gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (control técnico).

**Figura 9:** ARNm del factor tisular (FT y FTace) y expresión de IVFT de CMMHHAO evaluados por PCR cuantitativa. Expresión semicuantitativa del ARNm del gen del FT (A), forma cortada y empalmada alternativamente FTace (B) y gen de IVFT (C) entre las células CMMHHAO (X) y los hepatocitos. Las células CAPAN-2 y HUVEC resultan el control positivo para FT, y FTace e IVFT, respectivamente.

**Figura 10:** (A) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5 %. No se induce coagulación si existe ausencia de recalcificación. Hepatocitos (blanco), CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). Hepatocitos contra CPHHas, p <0,001; hepatocitos contra control, p <0,001; CPHHas contra control p <0,01; CPHHas contra hepatocitos contra control: ensayo de Kruskal-Wallis, \*\*\* p <0,001. (B) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de plasma (300 µl) obtenido a partir de sangre incubada en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5 %. Hepatocitos (blanco), CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). Hepatocitos contra CPHHas, p <0,05; hepatocitos contra control, p <0,01; CPHHas contra control, p <0,01; CPHHas contra hepatocitos contra control: ensayo de Kruskal-Wallis, \*\*\* p <0,001. La actividad procoagulante (APC) de las células (hepatocitos y CPHHas) en sangre y en plasma es comparable cuando no se añade Innovin.

**Figura 11:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, sin factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5 %. No se induce coagulación si existe ausencia de recalcificación. Hepatocitos (blanco), CPHHas

(negro).

**Figura 12:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia de sobrenadante del cultivo de CPHHas. No se induce coagulación si existe ausencia de recalcificación.

**Figura 13:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de CPHHas, hepatocitos, fibroblastos cutáneos, células madre mesenquimales de médula ósea (CMMMO), células madre hematopoyéticas de médula ósea (CMHMO), miofibroblastos hepáticos suspendidos en albúmina humana al 5 %. Fibroblastos contra control,  $p < 0,01$ ; CMMMO contra control,  $p < 0,01$ ; miofibroblastos hepáticos contra control,  $p < 0,01$ .

**Figura 14:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de plasma (300 µl) deficiente en factor de coagulación VII, V, X y II (PI 7 d, PI 5 d, PI 10 d, PI 2 d) en presencia de células suspendidas en albúmina humana al 5 %. CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). PI nI (plasma normal) contra PI 7 d,  $p < 0,01$ ; PI 7 d contra control,  $p < 0,01$ ; PI nI contra PI 5 d,  $p < 0,01$ ; PI nI contra PI 10 d,  $p < 0,001$ ; PI nI contra PI 2 d,  $p < 0,001$ .

**Figura 15:** (A) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de CPHHas suspendidas en albúmina humana al 5 % con heparina (Hepar). Al contrario, se añadió enoxaparina (Eno) o fondaparinux (Fond) extemporáneamente a la sangre en contacto con las células suspendidas en la albúmina. CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). \* en comparación con CPHHas. f en comparación con el control. (B) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de CPHHas suspendidas en albúmina humana al 5 %. La bivalirudina (Biva) o hirudina (Hir) se añadió a la sangre de manera extemporánea. CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). \* en comparación con CPHHas. f en comparación con el control. (C) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de hepatocitos suspendidos en albúmina humana al 5 % con heparina (Hepar). Al contrario, se añadió enoxaparina (Eno) o fondaparinux (Fond) extemporáneamente a la sangre en contacto con las células suspendidas en albúmina. Hepatocitos (blanco), control (albúmina) (gris). \* en comparación con los hepatocitos. f en comparación con el control. (D) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de hepatocitos suspendidos en albúmina humana al 5 %. La bivalirudina (Biva) o hirudina (Hir) se añadió a la sangre de manera extemporánea. Hepatocitos (blanco), control (albúmina) (gris). \* en comparación con los hepatocitos. f en comparación con el control.

**Figura 16:** (A) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de CPHHas suspendidas en albúmina humana al 5 % con heparina (Hepar) o con enoxaparina (Eno) o fondaparinux (Fond) añadidos extemporáneamente a la sangre. Se obtuvo una combinación de fármacos anticoagulantes cuando la bivalirudina (Biva) se añadió a la sangre de manera extemporánea. CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). \* en comparación con CPHHas. f en comparación con el control. \$ en comparación con la bivalirudina. (B) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de hepatocitos suspendidos en albúmina humana al 5 % con heparina (Hepar) o con enoxaparina (Eno) o fondaparinux (Fond) añadidos extemporáneamente a la sangre. Se obtuvo una combinación de fármacos anticoagulantes cuando la bivalirudina (Biva) se añadió a la sangre de manera extemporánea. Hepatocitos (blanco), control (albúmina) (gris). \* en comparación con los hepatocitos. f en comparación con el control. \$ en comparación con bivalirudina.

**Figura 17:** Se realizó inmunofluorescencia para FT en CPHHas (A) colocadas en cubreobjetos y se fijan por paraformaldehído (amplificación 20x). Los núcleos se revelaron por DAPI (tinción azul). (B) Control negativo (sin anticuerpo primario).

**Figura 18:** Factor tisular y expresión de ARNm del inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) en CPHHas y hepatocitos evaluados por RT-PCR convencional. Factor tisular (FT), factor tisular cortado y empalmado alternativamente (FTace), inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (control técnico).

**Figura 19:** ARNm del factor tisular (FT y FTace) y expresión de IVFT de CPHHas y hepatocitos evaluados por PCR cuantitativa. Expresión semicuantitativa del ARNm del gen de FT (A), forma alternativa de corte y empalme FTace (B) y gen de IVFT (C) entre las células CPHHas y hepatocitos. Las células CAPAN-2 y HUVEC resultan el control positivo para FT, FTace e IVFT, respectivamente.

**Figura 20:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre entera citratada (300 µl) en presencia o no de células suspendidas en albúmina

humana al 5 % tras la incubación de las células con anticuerpo FT (FT+) o no (TF-). Hepatocitos (blanco), CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). CPHHas TF- contra CPHHas TF+,  $p < 0,01$ ; hepatocitos FT- contra hepatocitos FT+,  $p < 0,01$ ; CPHHas FT+ contra control  $p < 0,001$ ; hepatocitos contra control no significativo.

5 **Figura 21:** Tras 30 min de incubación de las células suspendidas en albúmina suplementada o no con heparina (Hepar) (10 UI/ml, 50 UI/ml, y 100 UI/ml) en sangre, la actividad anti-Xa (UI/ml) se midió en plasma obtenido tras la centrifugación de la sangre. CPHHas (negro), hepatocitos (Hep) (blanco), control (gris).

10 **Figura 22:** Durante la infusión celular, los pacientes reciben bivalirudina (1,75 mg/kg). Entre las infusiones celulares consecutivas, la dosis se redujo a 0,25 mg/kg durante 2 a 4 horas. Los ensayos de coagulación incluyen tromboelastometría (TC en la vena porta (port) o a través de la línea central (centr)), plaquetas (PT) (valores normales: 150-350  $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) y los niveles de dímero D (valores normales:  $< 500 \text{ ng/ml}$ ), el tiempo de trombina (TT, valores normales: 15-24 s), el tiempo de protrombina (TP, valores normales: 9-14 s) y el tiempo parcial de tromboplastina (TPT, valores normales: 20-33 s) se realizaron reiteradamente antes, 20 min después del inicio y al final de cada infusión. A paciente con Crigler Najjar; B paciente con glucogenosis tipo 1a.

15 **Figura 23:** (A) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu\text{l}$ ), de sangre entera citratada (300  $\mu\text{l}$ ) en presencia o no de CPHHas (negro) suspendidas en albúmina humana al 5 % con o sin heparina (Hepar) en varias concentraciones (10 UI/ml de hepar, 50 UI/ml de hepar 5x, 100 UI/ml de hepar 10x). Control (albúmina) (gris). Control contra CPHHas Hepar 5x,  $p < 0,01$ . (B) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu\text{l}$ ), de sangre entera citratada (300  $\mu\text{l}$ ) en presencia o no de CPHHas (negro) suspendidas en albúmina humana al 5 % con o sin fondaparinux (Fond), enoxaparina (Eno) a una concentración normal o a la concentración normal aumentada 5 veces. Control (albúmina) (gris). Control contra CPHHas Fond 5x,  $p < 0,01$ ; control contra CPHHas Eno 5x,  $p < 0,01$ ; Fond contra Fond 5x, n.s; Eno contra Eno 5x, n.s.

20 **Figura 24:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu\text{l}$ ), de sangre entera citratada (300  $\mu\text{l}$ ) en presencia o no de CPHHas suspendidas en albúmina humana al 5 %. El aumento de la concentración de hirudina (Hir) (2x (Hir 2x) o 5x (Hir 5x)) se añadió extemporáneamente a la sangre. CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). Control contra CPHHas Hir 2x,  $p < 0,01$ ; CPHHas contra CPHHas Hir 2x,  $p < 0,01$ ; CPHHas Hir contra CPHHas Hir 2x, n.s.

25 **Figura 25:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu\text{l}$ ), de sangre entera citratada (300  $\mu\text{l}$ ) en presencia o no de CPHHas suspendidas en albúmina humana al 5 %. El aumento de la concentración de la bivalirudina (Biva) (2x (Biva 2x)) se añadió a la sangre de manera extemporánea. CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). Control contra CPHHas Biva 2x,  $p < 0,01$ .

30 **Figura 26:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu\text{l}$ ), de sangre entera citratada (300  $\mu\text{l}$ ) en presencia o no de CPHHas suspendidas en albúmina humana al 5 % con o sin heparina (Hepar). La enoxaparina (Eno) o fondaparinux (Fond) se añade extemporáneamente a la sangre con células suspendidas o no en heparina CPHHas (negro), control (albúmina) (gris). Control contra CPHHas Hepar + Eno,  $p < 0,01$ ; Control contra CPHHas Hepar + Fond,  $p < 0,01$ .

35 **Figura 27:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu\text{l}$ ), de sangre entera citratada (300  $\mu\text{l}$ ) en presencia o no de CPHHas, hepatocitos, fibroblastos cutáneos, células madre mesenquimales de médula ósea (CMMMO), células madre hematopoyéticas de médula ósea (CMHMO), miofibroblastos hepáticos suspendidos en albúmina humana al 5 % con o sin heparina (10 UI/ml) (Hepar). Fibroblastos Hepar contra control n.s; miofibroblastos hepáticos Hepar contra control,  $p < 0,01$ .

40 **Figura 28:** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu\text{l}$ ), de sangre entera citratada (300  $\mu\text{l}$ ) en presencia o no de miofibroblastos hepáticos suspendidos en albúmina humana al 5 % con o sin heparina (10 UI/ml) (Hepar). Se obtuvo una combinación de fármacos anticoagulantes cuando se añadió bivalirudina (Biva) extemporáneamente a la sangre en contacto con las células suspendidas en heparina.

#### 55 Descripción detallada

60 Como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el" incluyen tanto los referentes en singular como en plural a menos que el contexto especifique claramente lo contrario.

65 El término "que comprende", "comprende" y "comprendido por" como se utiliza en el presente documento es sinónimo de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y es inclusivo o no concluyente y no excluye miembros, elementos o etapas del método no enumerados adicionales. El término también abarca "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

La lectura de intervalos numéricos por criterio de valoración incluye todos los números y fracciones incluidas dentro de los respectivos rangos, así como los criterios de valoración indicados.

5 Aunque el término "uno o más", tal como uno o más miembros de un grupo de miembros, resulta evidente *per se*, mediante la ejemplificación adicional, el término abarca, *inter alia*, una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o a dos cualquiera o más de dichos miembros, tales como, p. ej., cualquier  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  o  $\geq 7$  etc. de dichos miembros, y hasta todos los miembros mencionados.

10 El término "aproximadamente" como se utiliza en el presente documento cuando hace referencia a un valor cuantificable, tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, tiene por objeto abarcar variaciones de y a partir del valor especificado, en particular, variaciones de  $\pm 10\%$  o menos, preferentemente  $\pm 5\%$  o menos, más preferentemente  $\pm 1\%$  o menos, y aún más preferentemente  $\pm 0,1\%$  o menos de y desde el valor especificado, en la medida de dichas variaciones apropiadas para llevar a cabo la invención desvelada. Ha de entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" se desvela por sí mismo también  
15 específica, y preferentemente.

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, se entienden habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Por medio de orientaciones adicionales, las definiciones del término pueden incluirse para  
20 apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

Las células de las combinaciones, composiciones, kits, métodos y usos que se describen en el presente documento son células progenitoras hepáticas adultas o miofibroblastos hepáticos, más preferentemente células progenitoras hepáticas adultas.  
25

Como se utiliza en el presente documento, el término "células con actividad procoagulante" abarca células que son capaces o propensas a activar la cascada de coagulación e inducir la coagulación o la formación de coágulos.

30 Las células con actividad procoagulante que se pretenden en el presente documento pueden desencadenar la cascada de coagulación en cualquier etapa, por lo que en última instancia, el fibrinógeno se convierte en fibrina, que se reticula en un coágulo. A modo de ejemplo y sin limitación, las células con actividad procoagulante pueden expresar factor tisular, la expresión del cual puede desencadenar la activación del factor X en factor Xa, que a su vez, a través de la escisión de protrombina a trombina, lleva a la formación de coágulos a través de la conversión de fibrinógeno mediada por trombina en fibrina. El término "células con actividad procoagulante" puede utilizarse  
35 indistintamente con "células procoagulantes". El término "actividad procoagulante" puede utilizarse indistintamente con "actividad protrombótica". Mientras que la actividad procoagulante de las células puede determinarse por presencia (o ausencia) de características celulares específicas, como por ejemplo, entre otros, la expresión de marcadores específicos, tales como factor tisular, la actividad procoagulante de las células puede igualmente determinarse por técnicas tales como, por ejemplo, y sin limitación, tromboelastometría. En pocas palabras, la tromboelastometría es un método viscoelástico establecido para los ensayos de la hemostasia en sangre (o por extensión cualquier muestra que contiene los componentes de la cascada de coagulación, tales como plasma),  
40 mediante el cual los cambios de elasticidad en una muestra se correlacionan con la formación de coágulos. A modo de ejemplo, y sin limitación, las mediciones de tromboelastometría pueden realizarse en un analizador delta ROTEM® (Pentapharm, Munich, Alemania). Alternativamente, la actividad procoagulante puede medirse por el método de anillo tubular, descrito en Johansson *et al.* (Diabetes, 2005, 54:1755-1762). La actividad procoagulante también puede resultar, por ejemplo, evidente y determinarse por los perfiles específicos de citoquinas (revisado por ejemplo, en van der Poll *et al.* *Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation*. Semin Thromb Hemost. 2001, 27: 639-51.  
45

50 Las células con actividad procoagulante que se pretenden en el presente documento pueden resultar particularmente adecuadas o configurarse para el trasplante de las mismas. Las células pueden ser células alogénicas (es decir, aisladas de un sujeto diferente, aunque de la misma especie, según el sujeto al que las células se van a trasplantar) o, alternativamente pueden ser células autólogas (es decir, aisladas del mismo sujeto según el sujeto al que las células se van a trasplantar), o incluso pueden ser células xenogénicas (es decir, aisladas de un sujeto de una especie diferente al sujeto al que las células se van a trasplantar). Las células procoagulantes pueden ser células primarias o, alternativamente, pueden ser células que han sido objeto de manipulación *in vitro*. Como se utiliza en el presente documento, el término "manipulación *in vitro*" se refiere a cualquier tipo de manipulación de las células fuera del cuerpo. Ejemplos de tales manipulaciones son, entre otras, administración de fármacos u otros compuestos que provocan un efecto en las células; depleción de los constituyentes celulares específicos;  
60 manipulación genética; terapia génica; transfección estable o transitoria, infección (pseudo)viral, o transformación; diferenciación; desdiferenciación; subclonación etc. Puede resultar evidente que, independientemente del origen celular, las células pueden someterse a almacenamiento (p. ej., criopreservación) y/o proliferación o pases antes del trasplante. Las células pueden inducirse para expresar una o más proteínas específicas (sea o no propietario de la célula, es decir, autólogo) o para aumentar o disminuir (o bloquear completamente o sustancialmente por completo)  
65 la expresión de la misma. Alternativo a la manipulación *in vitro*, las células que se van a trasplantar pueden someterse a la manipulación antes del aislamiento del donante (p. ej., tratamiento farmacológico, terapia génica,

etc.). Asimismo, las células con actividad procoagulante pueden ser una línea celular.

Las células procoagulantes desveladas en el presente documento pueden ser células (madre) no hematopoyéticas, dichas células tienden a no mostrar actividad procoagulante.

5 Además del trasplante de células para restaurar o mejorar la funcionalidad proporcionada de esta manera, en los ejemplos no limitantes, el producto celular que va a ser trasplantado puede incluir, entre otros, células cancerígenas (p. ej., para el estudio del cáncer en modelos animales), vacunas basadas en células o agentes inmunotolerantes, etc.

10 Cuando se desee, las células pueden transformarse de forma estable o transitoria con ácidos nucleicos de interés antes de la introducción al sujeto. Las secuencias de ácido nucleico de interés incluyen, entre otros, los productos génicos codificantes que potencian el crecimiento, la diferenciación y/o el funcionamiento de dichas células. Por ejemplo y sin limitación, un sistema de expresión para una proteína normalmente expresada por las células hepáticas puede introducirse de manera estable o transitoria a fin de tratar enfermedades o afecciones que se benefician de la expresión de dicha proteína empleando las células así transformadas (preferentemente hepáticas), p. ej., errores innatos del metabolismo hepático. Los expertos en la materia conocen métodos de transformación celular.

20 Las células que se pretenden en el presente documento, especialmente células procoagulantes que se pretenden en el presente documento, pueden ser preferentemente de origen animal, más preferentemente de animales de sangre caliente, incluso más preferentemente de vertebrados, aún más preferentemente de mamífero, y aún más preferentemente de origen primate, y específicamente incluyen células de mamífero humano o no humano o de origen primate. Las células preferentes tales como las células procoagulantes son de origen humano. El término "mamífero" como se utiliza en toda la presente memoria descriptiva incluye cualquier animal clasificado como tal, incluyendo, entre otros, seres humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, animales para deporte, mascotas, animales de compañía y animales de experimentación, tales como, por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, conejos, perros, gatos, cobayas, ganado, vacas, ovejas, caballos, cerdos y primates, p. ej., monos y simios.

30 Las células que se pretenden en el presente documento, especialmente células procoagulantes según se desvela en el presente documento, pueden abarcar entre otros células progenitoras, células madre o células en parte o completamente diferenciadas, como las células terminalmente diferenciadas (es decir, células completamente especializadas que pueden ser posmitóticas).

35 Preferentemente, según se pretende en el presente documento, las células tales como las células procoagulantes, y en particular las células progenitoras o células madre, pueden ser de origen adulto (p. ej., células progenitoras o madre adultas), es decir, presentes u obtenidas de (eliminadas o aisladas a partir de) un organismo en el estadio fetal o más preferentemente después del parto (posparto).

40 A modo de ejemplo y sin limitación, el origen adulto de las células pretendido en el presente documento, tal como por ejemplo células progenitoras hepáticas adultas, puede referirse al origen a partir de tejido neonato o del tejido en cualquier etapa de desarrollo posterior, tal como, *inter alia*, etapas indicadas de manera convencional en el desarrollo humano como la infancia, niñez, juventud, adolescencia o adulto. Por ejemplo, para células humanas (tales como células progenitoras hepáticas humanas del adulto), origen adulto pueden referirse al origen de un tejido (tal como tejido hepático) en cualquier momento después del nacimiento, término preferentemente completo, y puede ser, p. ej., al menos un mes de edad después del nacimiento, p. ej., al menos 2 meses, al menos 3 meses, p. ej., al menos 4 meses, al menos 5 meses, p. ej., al menos 6 meses de edad después del nacimiento, tal como, por ejemplo, 1 año o más, 5 años o más, al menos 10 años o más, 15 años o más, 20 años o más, o 25 o más años de edad después del nacimiento.

55 El término "progenitora" o "célula progenitora" es sinónimo y se refiere en general a una célula no especializada o relativamente menos especializada y a la proliferación celular competente que en condiciones apropiadas da lugar al menos a un tipo de células relativamente más especializadas, tales como, *inter alia*, células progenitoras relativamente más especializadas o eventualmente células terminalmente diferenciadas. Una célula progenitora puede "dar lugar" a otra célula relativamente más especializada cuando, por ejemplo, la célula progenitora se diferencia para convertirse en dicha otra célula sin someterse previamente a la división celular, o si dicha otra célula se produce después de una o más rondas de división celular y/o diferenciación de la célula progenitora.

60 El término "célula madre" se refiere generalmente a una célula progenitora capaz de autorrenovación, es decir, que puede, en condiciones apropiadas, proliferar sin diferenciación. El término abarca células madre capaces de autorrenovación sustancialmente ilimitada, es decir, en la que al menos una parte de la progenie de células madre retiene sustancialmente el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, la posible diferenciación, y la capacidad de proliferación de las células madre; así como las células madre que muestran la autorrenovación limitada, es decir, en la que la capacidad de la progenie de las células madre para la proliferación y/o diferenciación adicional se reduce manifiestamente en comparación con la célula madre.

Las células progenitoras o madre desveladas en el presente documento pueden ser pluripotentes (es decir, capaces en condiciones apropiadas de producir progenie de diferentes tipos celulares que se obtienen a partir de las tres capas germinales, es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo, según un ensayo convencional aceptado en la materia, como, *inter alia*, la capacidad de formar un teratoma en ratones con IDCs, o la capacidad para formar células identificables de las tres capas germinales en el cultivo tisular), multipotentes (es decir, capaces, en condiciones apropiadas, de producir progenie en al menos tres tipos celulares a partir de cada uno de dos o más órganos o tejidos diferentes de un organismo, en los que dichos tipos celulares pueden proceder de la misma o de diferentes capas germinales, pero no son capaces de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo), o se han comprometido a un solo o a unos pocos (p. ej., uno, dos o tres) linajes celulares.

El prototipo de células madre pluripotentes de mamífero (MPm) pueden obtenerse a partir de cualquier tipo de tejido embrionario de mamífero, p. ej., tejido embrionario fetal (no reivindicado) o tejido prefetal. Se incluyen en la definición de las células MPm células madre embrionarias de diversos tipos, ejemplificadas sin limitación por las células madre embrionarias murinas, p. ej., descritas en Evans y Kaufman 1981 (*Nature* 292:154-6) y Martin 1981 (*PNAS* 78:7634-8); células madre pluripotentes de rata, p. ej., descritas en Iannaccone *et al.* 1994 (*Dev Biol* 163:288-292); células madre embrionarias de hámster, p. ej., descritas en Doetschman *et al.* 1988 (*Dev Biol* 127:224-227); células madre embrionarias de conejo, p. ej., descritas en Graves *et al.* 1993 (*Mol Reprod Dev* 36:424-433); células madre pluripotentes porcinas, p. ej., descritas en Notarianni *et al.* 1991 (*J Reprod Fertil Suppl* 43:255-60) y Wheeler 1994 (*Reprod Fertil Dev* 6:563-8); células madre embrionarias de oveja, p. ej., descritas en Notarianni *et al.* 1991 (*supra*); células madre embrionarias bovinas, p. ej., descritas en Roach *et al.* 2006 (*Methods Enzymol* 418:21-37); células madre embrionarias humanas (MEh), p. ej., descritas en Thomson *et al.* 1998 (*Science* 282:1145-1147); células germinales embrionarias humanas (GEh), p. ej., descritas en Shambloott *et al.* 1998 (*PNAS* 95:13726); células madre embrionarias de otros primates, tales como las células madre de Rhesus, p. ej., descritas en Thomson *et al.* 1995 (*PNAS* 92:7844-7848) o células madre de tití, p. ej., descritas en Thomson *et al.* 1996 (*Biol Reprod* 55:254-259).

Como se ha señalado, el prototipo de "células ME humanas" (no reivindicadas) se describen en Thomson *et al.* 1998 (*supra*) y en el documento US 6.200.806. El alcance del término incluye células madre pluripotentes que se obtienen a partir de un embrión humano en el estadio de blastocisto, o antes de la diferenciación sustancial de las células en las tres capas germinales. Las células ME, en particular las células MEh, se obtienen normalmente a partir de la masa celular interna de blastocistos o de blastocistos enteros. Se ha documentado la obtención de líneas celulares de MEh del estadio de mórula y las células ME obtenidas de este modo pueden utilizarse también en la invención (Strelchenko *et al.* 2004. *Reproductive BioMedicine Online* 9:623-629). Como se ha indicado, el prototipo de "células GE humanas" se describe en Shambloott *et al.* 1998 (*supra*). Dichas células se pueden obtener a partir de, p. ej., crestas gonadales y mesenterios que contienen las células germinales primordiales de fetos. En los seres humanos, los fetos pueden tener generalmente 5-11 semanas posfertilización.

Excepto cuando se requiera expresamente lo contrario, el término células de MPm puede incluir células tisulares primarias y líneas establecidas que portan las características fenotípicas de las respectivas células, y derivados de dichas células primarias o líneas celulares que todavía tienen la capacidad de producir progenie de cada una de las tres capas germinales.

Las líneas establecidas de células ME humanas (sin reivindicar) incluyen las líneas que se enumeran en el Registro de células madre embrionarias humanas del INS (<http://stemcells.nih.gov/research/registry>), y sublíneas de las mismas, tales como, líneas hESBGN-01, hESBGN-02, hESBGN-03 y hESBGN-04 de Bresagen Inc. (Atenas, GA), líneas de Sahlgrenska 1 y Sahlgrenska 2 de Cellartis AB (Gotemburgo, Suecia), líneas HES-1, HES-2, HES-3, HES-4-HES, HES-5 y HES-6 de ES Cell International (Singapur), línea Miz-hES1 del hospital MizMedi (Seúl, Corea), líneas I 3, I 3.2, I 3.3, 4, I 6, I 6.2, J 3 y J 3.2 de Technion - Instituto de Tecnología de Israel (Haifa, Israel), líneas HSF-1 y HSF-6 de la Universidad de California (San Francisco, CA), líneas H1, H7, H9, H13, H14 de la Fundación de Investigación de los alumnos de Wisconsin/Instituto de Investigación WiCell (Madison, WI), líneas CHA-hES-1 y CHA-hES-2 del Instituto de Investigación Terapéutica Cell & Gene/Facultad de medicina de la Universidad de Pochon CHA (Seúl, Corea), líneas H1, H7, H9, H13, H14, H9.1 y H9.2 de Geron Corporation (Menlo Park, CA), líneas de Sahlgrenska 4 a Sahlgrenska 19 de la Universidad de Gotemburgo (Gotemburgo, Suecia), líneas MB01, MB02, MB03 de Maria Biotech Co. Ltd. (Seúl, Corea), líneas FCNCBS1, FCNCBS2 y FCNCBS3 del Centro Nacional de Ciencias Biológicas (Bangalore, India), y líneas RLS ES 05, RLS ES 07, RLS ES 10, RLS ES 13, RLS ES 15, RLS ES 20 y RLS ES 21 de Reliance Life Sciences (Mumbai, India). Otras líneas celulares establecidas MEh (no reivindicadas) incluyen las depositadas en el banco de células madre del R. U. (<http://www.ukstemcellbank.org.uk/>), y sublíneas de las mismas, p. ej., línea WT3 del King's College de Londres (Londres, R. U.) y línea hES-NCL1 de la Universidad de Newcastle (Newcastle, R. U.) (Strojkoovic *et al.* 2004. *Stem Cells*. 22:790-7). Líneas de células ME a modo de ejemplo adicionales (no reivindicadas) incluyen líneas FC018, AS034, AS034.1, AS038, SA111, SA121, SA142, SA167, SA181, SA191, SA196, SA203 y SA204, y sublíneas de las mismas, de Cellartis AB (Gotemburgo, Suecia).

Además dentro del término de células madre pluripotentes de mamífero se encuentran dichas células MPm que pueden obtenerse mediante manipulación, como, *inter alia*, el factor genético y/o de crecimiento y/o manipulación mediada por moléculas pequeñas, de células de mamífero no pluripotentes, tales como células de mamíferos somáticas y especialmente somáticas adultas, incluyendo el uso de células madre pluripotentes inducidas (MPi),

como se enseña, *inter alia*, en Yamanaka *et al.* 2006 (*Cell* 126:663-676), Yamanaka *et al.* 2007 (*Cell* 131:861-872) y Lin *et al.* 2009 (*Nature Methods* 6:805-808).

5 Las células preferentes que se pretenden en el presente documento, tales como células procoagulantes desveladas en el presente documento, pueden incluir células madre mesenquimales. El término "células madre mesenquimales" o "CMM" como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula madre de mesoderma obtenida del adulto que es capaz de generar células de linajes mesenquimales, normalmente células de tres o más linajes mesenquimales, p. ej., linaje osteocítico (hueso), condrocítico (cartílago), miocítico (músculo), tendocítico (tendón), fibroblástico (tejido conectivo), adipocítico (grasa), estromogénico (estroma de médula). Comúnmente, pero sin limitación, una célula puede considerarse CMM si es capaz de formar células de cada uno de los linajes adipocíticos, condrocíticos y osteocíticos, utilizando condiciones de diferenciación convencionales aceptadas en la materia y métodos de evaluación para el fenotipo celular, p. ej., descritos en Pittenger *et al.* 1999 (*Science* 284:143-7) o Barberi *et al.* (*PLoS Med* 2: e161, 2005). La células CMM pueden aislarse de, p. ej., la médula ósea, sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, dermis especialmente de la piel fetal y adolescente (Young *et al.* 2001 *Anat Rec* 264:51-62), perostio, y tejido adiposo (Zuk *et al.* 2001. *Tissue Eng.* 7:211-28). CMM humanas, su aislamiento, expansión *in vitro*, y diferenciación, se han descrito en, p. ej., Pittenger *et al.* 1999 (*supra*), patente de Estados Unidos n.º 5.486.359; patente de Estados Unidos n.º 5.811.094; patente de Estados Unidos n.º 5.736.396; patente de Estados Unidos n.º 5.837.539; o patente de Estados Unidos n.º 5.827.740.

20 El término también abarca CMM obtenidas a partir de la médula ósea, que se denominan comúnmente como "células madre mesenquimales de médula ósea", "células estromales de médula ósea" o "CEMO". Una muestra de médula ósea para el aislamiento de CEMO se puede adquirir, p. ej., de la cresta iliaca, fémures, tibias, columna vertebral, costillas u otros espacios medulares. En una realización preferente de CMM o poblaciones de CMM utilizadas en el presente documento pueden proceder de la médula ósea, p. ej., se pueden aislar y, opcionalmente, expandir a partir de una muestra de médula ósea. Las poblaciones de CMM y CMM originadas a partir de la médula ósea pueden presentar características (p. ej., perfil de marcador, función, expansión, diferenciación, etc.) diferentes y/o favorables sobre CMM originadas a partir de otros tejidos, tales como y sin limitación pueden diferenciarse de manera más eficaz y/o más controlable en linajes celulares determinados. El término CMM y CEMO también abarca la progenie de CMM o CEMO, p. ej., la progenie obtenida por la propagación *in vitro* o *ex vivo* de CMM o CEMO obtenida a partir de una muestra biológica de un sujeto.

Otras células desveladas en el presente documento, tales como células procoagulantes descritas en el presente documento, pueden incluir entre otras células progenitoras o madre adultas obtenidas o procedentes de (p. ej., eliminadas o aisladas de) tejidos, incluyendo tejido muscular (p. ej., células satélite), tejido endocrino (p. ej., páncreas, gónadas, glándula suprarrenal, glándula pineal, glándula pituitaria, tiroides y paratiroides), tejido nervioso (p. ej., tejido neuronal o glial), sangre y tejidos del sistema inmunitario, epitelial, hígado, hueso, cartílago, tejidos adiposo o endotelial.

40 Las células particularmente preferentes se describen en el presente documento, especialmente células con actividad procoagulante que son células progenitoras o madre hepáticas obtenidas del adulto, más concretamente dichas células se detallan en la sección del sumario.

45 Como se utiliza en el presente documento, las células progenitoras o madre hepáticas obtenidas del adulto o las células progenitoras hepáticas adultas o similares pueden señalar generalmente las células originarias del hígado con características de las células progenitoras o madre y son capaces de diferenciarse hacia uno o más tipos celulares hepáticos, como por ejemplo capaces de al menos o solo diferenciación hepática (es decir, diferenciación hacia hepatocitos o células similares a hepatocitos).

50 Las células que se pretenden en el presente documento como las células procoagulantes que son parcialmente o totalmente diferenciadas o maduras, tales como células terminalmente diferenciadas (es decir, células totalmente especializadas que pueden ser posmitóticas), pueden incluir, entre otros, células musculares (p. ej., cardiomiocitos, miocitos, miotubos, mioblastos, células del músculo liso vascular), células pancreáticas endocrinas (p. ej., células beta, células alfa, células delta, células productoras PP o células épsilon), células nerviosas (p. ej., neuronas, células gliales, tales como astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann), células de sangre y sistemas inmunitarios (p. ej., linfocitos B o T, células dendríticas, granulocitos, macrófagos, etc.), células epiteliales (p. ej., queratinocitos, melanocitos, células renales, células pulmonares), células hepáticas (p. ej., hepatocitos, células ovales), células óseas (osteoblastos, osteocitos, odontoblastos), condrocitos, adipocitos, células endoteliales (p. ej., células del músculo liso vascular). Además, se pretenden células fusionadas, p. ej., híbridos celulares.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término "activador de antitrombina", se refiere a un agente (p. ej., un compuesto, sustancia o molécula) que activa directamente la antitrombina. Como tal, un activador de antitrombina aumenta la actividad catalítica (antagonista) (es decir, aumento de la constante de velocidad) de antitrombina hacia su(s) diana(s), tal como por ejemplo trombina, factor Xa y/o factor IXa. Particularmente preferente, un activador de antitrombina aumenta la actividad catalítica (antagonista) de la antitrombina hacia al menos el factor Xa. En otra realización preferente, un activador de antitrombina puede aumentar la actividad catalítica (antagonista) de antitrombina específicamente hacia el factor Xa, tal como por ejemplo aunque sin limitación fondaparinux. La

activación de antitrombina por un activador de antitrombina puede realizarse por cualquier medio, por ejemplo, y sin limitación, por unión directa e inducción de cambios conformacionales de antitrombina, dando lugar a un aumento de la accesibilidad y/o actividad del sitio catalítico (unión a la diana). Como se utiliza en el presente documento, "antitrombina" se refiere a cualquiera de las antitrombinas conocidas, preferentemente antitrombina III (símbolo génico SERPINC1). Por consiguiente, como se utiliza en el presente documento, "activador de antitrombina" se refiere preferentemente a un activador de antitrombina III.

En una realización, el activador de antitrombina según la invención es heparina. En otra realización, el activador de antitrombina según la invención se selecciona entre el grupo que consiste en heparina no fraccionada y heparina de bajo peso molecular. En una realización adicional, el activador de antitrombina según la invención es fondaparinux, que puede representarse como 2-desoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-glucopiruranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-desoxi-3,6-di-O-sulfo-2-(sulfoamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-idopiruranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-metil-2-desoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosido, sal decasódica. En una realización preferente, el activador de antitrombina según la invención es heparina no fraccionada. Como se utiliza en el presente documento, "heparina no fraccionada", se refiere en particular a la heparina natural, que es polidispersa consistente en cadenas moleculares de longitud variable (por lo general oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 kDa). Como se pretende en el presente documento, se puede emplear cualquier tipo de heparina. Normalmente, la heparina de calidad farmacéutica se obtiene a partir de los tejidos mucosos de los animales sacrificados para carne, tales como intestino porcino o pulmón bovino. Como se utiliza en el presente documento, "heparina de bajo peso molecular" (HBPM) se refiere a la heparina que presenta en general un peso molecular medio inferior a aproximadamente 8 kDa y para la que al menos aproximadamente el 60 % de todas las cadenas presentan un peso molecular inferior a aproximadamente 8 kDa. HBPM se obtiene mediante varios métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Ejemplos de HBPM incluyen, entre otros, ardeparina, certoparina, enoxaparina, parnaparina, tinzaparina, dalteparina, reviparina y nadroparina.

Como contemplan los inventores, determinados activadores de antitrombina pueden actuar mediante el aumento de la actividad catalítica (antagonista) de la antitrombina (específicamente) hacia el factor Xa. Por consiguiente, en algunos aspectos y realizaciones contemplados son combinaciones, composiciones, kits, métodos y usos descritos en el presente documento empleados como alternativa al activador de antitrombina o además del activador de antitrombina, un inhibidor del Factor Xa, en particular, un inhibidor del Factor Xa que no sea un activador de la antitrombina. Dicho inhibidor del Factor Xa puede ser un inhibidor indirecto o alternativamente directo del Factor Xa. Los inhibidores indirectos del Factor Xa incluyen, por ejemplo, sustancias que inhiben la conversión del Factor X en Factor Xa. Un inhibidor directo del Factor Xa puede actuar directamente sobre el Factor Xa en la cascada de coagulación, sin necesidad de utilizar antitrombina como mediador, evitando de este modo la conversión mediada por el Factor Xa de protrombina en trombina. A modo de ejemplo, y sin limitación, los inhibidores directos del Factor Xa incluyen Apixabán, Edoxabán, Otamixabán, Rivaroxabán, DX9065a e YM466.

Como se utiliza en el presente documento, el término "inhibidor de la trombina" se refiere a un compuesto que se une directamente e inactiva la trombina. Como tal, un inhibidor de la trombina disminuye significativamente o bloquea perfectamente por completo o sustancialmente por completo la actividad catalítica de la trombina medida convenientemente por una disminución de la constante de velocidad para su(s) diana(s) catalítica(s), particularmente fibrinógeno. La inhibición de la trombina por un inhibidor de la trombina puede ser reversible o irreversible, preferentemente reversible. La inhibición de la trombina por un inhibidor de la trombina puede llevarse a cabo por cualquier medio, por ejemplo, y sin limitación, por la unión directa al sitio catalítico de la trombina.

El inhibidor de la trombina según la invención se selecciona entre el grupo que consiste en bivalirudina e hirudina. Químicamente, la bivalirudina (nº de registro CAS 128270-60-0) es un congénere sintético del fármaco de hirudina presente de manera natural. La hirudina presente naturalmente contiene generalmente una mezcla de varias isoformas de esta proteína. Por tanto, el término "hirudina" utilizado en el presente documento incluye particularmente cualquier proteína con la secuencia primaria de aminoácidos de una isoforma de hirudina presente de manera natural, tal como, *inter alia*, HV1, HV2, HV3, P1 o P2. Se puede fabricar hirudina recombinante para producir preparaciones homogéneas de hirudina, tales como por ejemplo, y sin limitación, lepirudina y desirudina. La hirudina que se pretende en el presente documento también abarca derivados adecuados o análogos de hirudina, p. ej., mediante sustitución, delección, inserción, extensión, funcionalización o modificación química de aminoácidos, dicho derivado presenta actividad inhibidora de la trombina; y además abarca híbridos de más de una hirudina, que pueden generarse por ingeniería genética. Por ejemplo, el documento WO 91/17250 describe una hirudina compuesta por los primeros 46 residuos de HV1 seguidos por los aminoácidos 47 a 65 de HV2.

En una realización preferente, el inhibidor de la trombina es bivalirudina (por ejemplo, fabricada por The Medicines Company como Angiomax® o Angiox®). Considerando que los expertos conocen la hirudina (natural o recombinante) y los derivados de hirudina así como bivalirudina, para mayor orientación consulte, *inter alia*, Fenton *et al. Semin Thromb Hemost.*, 1998, vol. 24, 87-91.

Combinaciones o composiciones particularmente preferentes que incorporan los principios de la invención pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en un activador de antitrombina seleccionado entre el grupo que consiste en heparina, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular y fondaparinux, preferentemente

5 heparina no fraccionada, un inhibidor de la trombina seleccionado entre el grupo que consiste en bivalirudina e hirudina, preferentemente bivalirudina, y células seleccionadas opcionalmente entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas, células madre mesenquimales (preferentemente células madre mesenquimales de médula ósea), fibroblastos cutáneos, o miofibroblastos hepáticos, preferentemente células progenitoras hepáticas adultas o miofibroblastos hepáticos, más preferentemente células progenitoras hepáticas adultas.

Otras combinaciones o composiciones particularmente preferentes que incorporan los principios de la invención se desvelan en la Tabla 1, es decir, combinaciones o composiciones que comprenden, que consisten esencialmente, o consisten en la sustancia 1, sustancia 2, y opcionalmente células.

10

Tabla 1

sustancia 1	sustancia 2	células
heparina	hirudina	
heparina	bivaliriduna	
heparina no fraccionada	hirudina	
heparina no fraccionada	bivaliriduna	
HBPM <sup>1</sup>	hirudina	
HBPM <sup>1</sup>	bivaliriduna	
fondaparinux	hirudina	
fondaparinux	bivaliriduna	
heparina	hirudina	células procoagulantes
heparina	bivaliriduna	células procoagulantes
heparina no fraccionada	hirudina	células procoagulantes
heparina no fraccionada	bivaliriduna	células procoagulantes
HBPM <sup>1</sup>	hirudina	células procoagulantes
HBPM <sup>1</sup>	bivaliriduna	células procoagulantes
fondaparinux	hirudina	células procoagulantes
fondaparinux	bivaliriduna	células procoagulantes
heparina	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
heparina	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
heparina no fraccionada	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
heparina no fraccionada	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
HBPM <sup>1</sup>	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
HBPM <sup>1</sup>	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
fondaparinux	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
fondaparinux	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
heparina	hirudina	células madre mesenquimales (médula ósea)
heparina	bivaliriduna	células madre mesenquimales (médula ósea)
heparina no fraccionada	hirudina	células madre mesenquimales (médula ósea)
heparina no fraccionada	bivaliriduna	células madre mesenquimales (médula ósea)
HBPM <sup>1</sup>	hirudina	células madre mesenquimales (médula ósea)
HBPM <sup>1</sup>	bivaliriduna	células madre mesenquimales (médula ósea)
fondaparinux	hirudina	células madre mesenquimales (médula ósea)

fondaparinux	bivaliriduna	células madre mesenquimales (médula ósea)
heparina	hirudina	fibroblastos cutáneos
heparina	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
heparina no fraccionada	hirudina	fibroblastos cutáneos
heparina no fraccionada	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
HBPM <sup>1</sup>	hirudina	fibroblastos cutáneos
HBPM <sup>1</sup>	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
fondaparinux	hirudina	fibroblastos cutáneos
fondaparinux	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
heparina	hirudina	miofibroblastos hepáticos
heparina	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
heparina no fraccionada	hirudina	miofibroblastos hepáticos
heparina no fraccionada	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
HBPM <sup>1</sup>	hirudina	miofibroblastos hepáticos
HBPM <sup>1</sup>	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
fondaparinux	hirudina	miofibroblastos hepáticos
fondaparinux	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
1 HBPM incluye ardeparina, certoparina, enoxaparina, parnaparina, tinzaparina, dalteparina, reviparina y nadroparina, preferentemente HBPM es enoxaparina.		

El término "trasplante celular" conlleva su significado normal y en particular se refiere a la administración de células a un sujeto. El término "trasplante celular" se puede emplear indistintamente con "terapia celular". El trasplante celular puede realizarse por medio de cualquier técnica conocida en la materia. A modo de ejemplo, y sin limitación, las células pueden trasplantarse por infusión en un sujeto. Normalmente, la infusión de células puede llevarse a cabo parenteralmente, p. ej., por vía intravascular, subcutánea, intradérmica, o intramuscular, preferentemente por vía intravascular. Las células pueden administrarse, por ejemplo, entre otros, por vía sistémica, tópica o en el sitio de una lesión. En consecuencia, puede resultar evidente que, en función de la aplicación específica, los tejidos diana, el fin terapéutico o el tipo celular, puede realizarse un ajuste en relación a las vías de administración, así como formulaciones, concentraciones, etc.

Como se utiliza en el presente documento, el término "complicaciones trombóticas" o "complicaciones procoagulantes" puede referirse particularmente a efectos deletéreos o complicaciones asociadas con el trasplante de células con actividad procoagulante, aparte de la formación de coágulos *per se*. Dichos efectos pueden ser, por ejemplo, entre otros, pérdida celular, rechazo celular o inflamación. Por pérdida celular o rechazo celular se entiende la pérdida o el rechazo de las células trasplantadas. El resultado de estos efectos es una disminución de la eficacia en el trasplante de células o posible prendimiento celular, inferior a, o en casos extremos, ninguna cantidad total administrada de las células está disponible para realizar su función prevista tras el trasplante. La pérdida de células puede ocurrir por ejemplo debido a la inclusión de las células trasplantadas en coágulos. El rechazo celular puede por ejemplo ocurrir debido a una respuesta inmunológica del huésped. Una respuesta inflamatoria puede por ejemplo asociarse, o ser resultado de la activación de la cascada de coagulación. Alternativamente, o además, la inflamación puede asociarse con, o ser resultado de, o causar rechazo celular.

Se proporcionan igualmente composiciones que comprenden las combinaciones enseñadas en el presente documento y que comprenden además uno o varios componentes. Por ejemplo, los componentes que pueden incluirse pueden mantener o mejorar la viabilidad de las células. Como ejemplo y sin limitación, tales componentes pueden incluir sales para garantizar sustancialmente condiciones isotónicas, estabilizadores del pH tales como sistema(s) tampón (p. ej., para garantizar un pH sustancialmente neutro, tal como el sistema tampón fosfato o carbonato), proteínas transportadoras, tales como por ejemplo albúmina, medios que incluyen medios basales y/o suplementos de medios, suero o plasma, nutrientes, fuentes de carbohidratos, conservantes, estabilizadores, antioxidantes u otros materiales adecuadamente conocidos por los expertos en la materia. Asimismo se desvelan métodos de producción de dichas composiciones mezclando los respectivos componentes de las combinaciones enseñadas en el presente documento con dichos o más componentes adicionales indicados. Las composiciones pueden ser, por ejemplo líquidas o pueden ser semisólidas o sólidas (p. ej., pueden ser composiciones congeladas o pueden existir como geles o existir en el apoyo o armazón sólido, etc.). Los crioconservantes, tales como, *inter alia*,

DMSO se conocen muy bien en la materia.

Como se ha señalado previamente, las composiciones farmacéuticas enseñadas en el presente documento comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 El término "farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en el presente documento es consistente con la materia y significa compatible con los otros ingredientes de una composición farmacéutica y no es perjudicial para el receptor de los mismos.

10 Como se utiliza en el presente documento, "transportador" o "excipiente" incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, tampones (tales como, p. ej., solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada fosfato), solubilizantes, coloides, medios de dispersión, vehículos, materiales de relleno, agentes quelantes (tales como, p. ej., EDTA o glutatión), aminoácidos (tales como, p. ej., glicina), proteínas, agentes disgregantes, aglutinantes, lubricantes, humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, aromatizantes, espesantes, agentes para alcanzar un efecto de liberación prolongada, revestimientos, agentes antifúngicos, conservantes, estabilizadores, antioxidantes, agentes que controlan la tonicidad, agentes retardantes de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la materia. Estos materiales han de ser no tóxicos y no deben interferir con la actividad de las células.

20 La naturaleza precisa del transportador o excipiente u otro material dependerá de la vía de administración. Por ejemplo, la composición puede encontrarse en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que está libre de pirógenos y posee un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Para principios generales de la formulación medicinal, se remite al lector a *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, de G. Morstyn y W. Sheridan eds., Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister y P. Law, Churchill Livingstone, 2000.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir generalmente un transportador líquido tal como agua o una solución acuosa farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, pueden incluirse solución salina fisiológica, medios de cultivo tisulares o celulares, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

30 La composición puede incluir una o más moléculas protectoras de células, moléculas de regeneración celular, factores de crecimiento, factores antiapoptóticos o factores que regulan la expresión génica en las células. Dichas sustancias pueden hacer que las células sean independientes de su entorno.

35 Dichas composiciones farmacéuticas pueden contener otros componentes que garantizan la viabilidad de las células en las mismas. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un sistema tampón adecuado (p. ej., sistema tampón fosfato o carbonato) para alcanzar el pH deseable, más habitualmente próximo al pH neutro, y pueden comprender sal suficiente para garantizar las condiciones isoosmóticas de las células que previenen el estrés osmótico. Por ejemplo, una solución adecuada para estos fines puede ser una solución salina tamponada fosfato (STF), solución de cloruro sódico, inyección de Ringer o inyección láctica de Ringer, conocidos en la materia. Además, la composición puede comprender una proteína transportadora, p. ej., albúmina (p. ej., bovina o albúmina humana), que puede aumentar la viabilidad de las células.

40 Otros transportadores o aditivos farmacéuticamente aceptables de forma adecuada se conocen bien por los expertos en la materia y, por ejemplo, pueden seleccionarse entre proteínas tales como colágeno o gelatina, carbohidratos, tales como almidón, polisacáridos, azúcares (dextrosa, glucosa y sacarosa), derivados de celulosa como carboximetilcelulosa sódica o cálcica, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa, almidones pregelatinizados, agar de pectina, carragenina, arcillas, gomas hidrófilas (goma acacia, goma guar, goma arábiga y goma xantano), ácido alginico, alginatos, ácido hialurónico, ácido poliglicólico y poliláctico, dextrano, pectinas, polímeros sintéticos, tales como polímero acrílico soluble en agua o polivinilpirrolidona, proteoglicanos, fosfato cálcico y similares.

55 Si se estima conveniente, la preparación celular puede administrarse en un soporte, armazón, matriz o material para proporcionar una mejor regeneración tisular. Por ejemplo, el material puede ser un material cerámico granular, o un biopolímero, tal como gelatina, colágeno, o fibrinógeno. Las matrices porosas pueden sintetizarse según técnicas convencionales (p. ej., Mikos *et al.*, *Biomaterials* 14:323, 1993; Mikos *et al.*, *Polymer* 35:1068, 1994; Cook *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 35:513, 1997). Dicho soporte, armazón, matriz o material pueden ser biodegradables o no biodegradables. Por consiguiente, las células pueden transferirse y/o cultivarse en un sustrato adecuado, tal como un sustrato poroso o no poroso, para proporcionar implantes. Por ejemplo, las células que han proliferado, o que se están diferenciando en placas de cultivo, pueden transferirse en soportes sólidos tridimensionales con el fin de que se multipliquen y/o continúe el proceso de diferenciación mediante la incubación del soporte sólido en un medio nutriente líquido de la invención, si fuera necesario. Las células pueden transferirse a un soporte sólido tridimensional, p. ej., al impregnar dicho soporte con una suspensión líquida que contiene dichas células. Los soportes impregnados obtenidos de esta manera pueden implantarse en un sujeto humano. Tales soportes impregnados también se pueden volver a cultivar al inmergirlos en un medio de cultivo líquido, antes de implantarse

finalmente. El soporte sólido tridimensional debe ser biocompatible con el fin de que pueda implantarse en un ser humano. Puede ser biodegradable o no biodegradable.

- 5 Las células o poblaciones celulares pueden administrarse de manera que les permitan sobrevivir, crecer, propagarse y/o diferenciarse con respecto a tipos de células deseadas, tales como, p. ej., hepatocitos. Las células o poblaciones celulares pueden injertarse o pueden migrar e injertarse en el órgano deseado, tal como, p. ej., hígado. Puede concebirse el prendimiento de las células o las poblaciones celulares en otros lugares, tejidos u órganos, como hígado, bazo, páncreas, cápsula renal, peritoneo o epiplón.
- 10 En una realización, la preparación celular farmacéutica definida previamente puede administrarse en forma de composición líquida. En realizaciones, la composición celular o farmacéutica que comprende esto puede administrarse por vía sistémica, tópica, en un órgano o a un sitio de la disfunción o lesión orgánica.
- 15 Preferentemente las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de las células deseadas. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que puede provocar una respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o ser humano que se está buscando por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico, y en particular puede prevenir o aliviar uno o más de los síntomas locales o sistémicos o características de una enfermedad o afección que se está tratando.
- 20 Las combinaciones, composiciones farmacéuticas presentes y otros aspectos relacionados son particularmente útiles para el trasplante de células descritas en el presente documento, tales como en particular células procoagulantes, incluso más particularmente para el tratamiento de enfermedades o afecciones que pueden beneficiarse del trasplante de dichas células en sujetos.
- 25 A excepción de lo establecido, "sujeto" o "paciente" se utiliza indistintamente y se refiere a animales, preferentemente vertebrados y más preferentemente mamíferos, e incluye específicamente pacientes humanos y mamíferos no humanos. Por consiguiente, "sujeto" o "paciente", utilizado en el presente documento se refiere a cualquier paciente o sujeto animal, mamífero o humano a los que se pueden administrar las combinaciones o composiciones que se enseñan en el presente documento. Resultan preferentes los pacientes sujetos humanos.
- 30 Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto se emplea para prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad
- 35 (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad y manifestación de complicaciones, mejora o paliación del estado de la enfermedad. "Tratamiento" también puede entenderse como la prolongación de la supervivencia en comparación con la expectativa de supervivencia si no se recibe tratamiento.
- 40 Como se utiliza en el presente documento, una expresión tal como "un sujeto en necesidad de tratamiento" incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos o humanos, que se beneficiará del tratamiento de una afección obtenida, preferentemente una afección o enfermedad previa. Dichos sujetos incluyen generalmente, entre otros, aquellos que se han diagnosticado con la afección, aquellos propensos a padecer o desarrollar dicha afección y/o aquellos en los que la afección se prevendrá.
- 45 Las combinaciones y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden emplearse solas o en combinación con cualquiera de las terapias conocidas o compuestos activos para los trastornos respectivos. La administración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden.
- 50 En caso de que las células se obtengan a partir de una fuente heteróloga (es decir, no autóloga), puede administrarse normalmente terapia inmunosupresora concomitante, p. ej., utilizando agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina o tacrolimus (FK506).
- 55 A modo de ejemplo y sin limitación, cuando las combinaciones o composiciones farmacéuticas pretendidas en el presente documento contengan células hepáticas, tales como células progenitoras o madre hepáticas, (p. ej., células CMHHA) o hepatocitos, estas pueden emplearse para el tratamiento, *inter alia*, de enfermedades asociadas al hígado incluyendo, entre otros, disfunción o insuficiencia hepática, hepatitis y errores congénitos del metabolismo.
- 60 Los ejemplos no exhaustivos de deficiencias metabólicas congénitas hepáticas incluyen fenilcetonuria y otras aminoacidopatías, hemofilia y otras deficiencias de factores de coagulación, hipercolesterolemia familiar y otros trastornos del metabolismo lipídico, trastornos del ciclo de la urea, glucogenosis, galactosemia, fructosemia, tirosinemia, deficiencias del metabolismo de proteínas y carbohidratos, aciduria orgánica, enfermedades mitocondriales, trastornos peroxisomales y lisosomales, alteraciones en la síntesis de proteínas, anomalías de los transportadores celulares hepáticos, anomalías de glicosilación y similares.
- 65 Otras enfermedades o afecciones asociadas al hígado incluyen, entre otros, enfermedades degenerativas hepáticas progresivas adquiridas, insuficiencia hepática fulminante e insuficiencia hepática aguda o crónica, infecciones por

virus hepatotrópicos humanos (VHB, VHA, VHC, VHE, VHD,...).

Otros estados de enfermedad o deficiencias tipificadas por la pérdida de masa y/o función hepática, y que podrían beneficiarse de combinaciones o una composición farmacéutica que comprende células hepáticas descritas en el presente documento incluyen, entre otros, síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica (cirrosis inducida por alcohol), deficiencia antitripsina a1 (todos los fenotipos), hiperlipidemias y otros trastornos del metabolismo de lípidos, hepatitis autoinmune, síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, colestasis familiar progresiva tipo I, II y III, cáncer de hígado, enfermedad de Caroli, síndrome de Crigler-Najjar, fructosemia, galactosemia, alteraciones de glicosilación deficiente en carbohidratos, otros trastornos del metabolismo de carbohidratos, enfermedad de Refsum y otras enfermedades peroxisomales, enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Wolman y otros trastornos lisosomales, tirosinemia, síndrome de la triple H, y otros trastornos metabólicos de aminoácidos, síndrome de Dubin-Johnson, hígado graso (esteatohepatitis no alcohólica), síndrome de Gilbert, glucogenosis I y III, hemocromatosis, hepatitis A-G, porfiria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, tirosinemia, deficiencias de factores de coagulación, hemofilia B, fenilcetonuria, enfermedad de Wilson, insuficiencia hepática fulminante, insuficiencia hepática posthepatectomía, enfermedades de la cadena respiratoria mitocondrial.

A modo de ejemplo y sin limitación, las combinaciones o composiciones farmacéuticas, en particular aquellas que comprenden células hepáticas, pueden administrarse ventajosamente a través de una inyección (abarcan también la administración por catéter) o implante, p. ej., inyección localizada, inyección sistémica, inyección intraesplénica (véase también Gupta *et al.*, *Seminars in Liver Disease* 12:321, 1992), inyección a una vena porta, inyección a la pulpa hepática, p. ej., bajo la cápsula hepática, administración parenteral, o inyección intrauterina en un embrión o feto. Por ejemplo, las combinaciones o composiciones farmacéuticas que comprenden las células hepáticas o las células obtenidas del hígado descritas en el presente documento pueden utilizarse para la ingeniería tisular y terapia celular mediante trasplante celular hepático (TCH). El trasplante celular hepático, y el trasplante de células madre hepáticas (TCMH) se refiere a la técnica de infusión de hepatocitos maduros o células progenitoras hepáticas que produce de esta manera un acceso hepático y prendimiento de las células, preferentemente a través de la vena porta, pero también por inyección hepática directa, o por inyección intraesplénica. En otro ejemplo, las combinaciones o composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre mesenquimales descritas en el presente documento pueden utilizarse para cualquier reparación de órganos sólidos (cerebro, corazón, hígado, riñón, páncreas, bazo, pulmón, intestino, vejiga, vesícula biliar), para controlar el trastorno inmunitario, para controlar la enfermedad de Crohn y otras enfermedades autoinmunitarias, para controlar la enfermedad injerto contra huésped, para controlar el rechazo de órganos tras el trasplante. En otro ejemplo, las combinaciones o composiciones farmacéuticas que comprenden los fibroblastos cutáneos descritos en el presente documento pueden utilizarse para la reparación de la piel o formación de la matriz ósea. En un ejemplo adicional, las combinaciones o composiciones farmacéuticas que comprenden miofibroblastos hepáticos descritos en el presente documento se pueden utilizar para tratar o reparar los daños causados por las enfermedades del tejido conectivo o para crear armazones en combinación con otras células.

En estudios humanos actuales de células mononucleares autólogas de médula ósea, se han utilizado dosis empíricas que van desde 1 a  $4 \times 10^7$  células con resultados alentadores. Sin embargo, diferentes escenarios pueden requerir la optimización de la cantidad de células administradas. Por consiguiente, la cantidad de células a administrar variará dependiendo del sujeto que se está tratando. En una realización preferente, pueden administrarse entre  $10^2$  a  $10^{10}$ , o entre  $10^2$  a  $10^9$ , o entre  $10^3$  a  $10^{10}$ , o entre  $10^3$  a  $10^9$ , o entre  $10^4$  a  $10^{10}$  o entre  $10^4$  a  $10^9$ , tal como entre  $10^4$  y  $10^8$ , o entre  $10^5$  y  $10^7$ , p. ej., aproximadamente  $1 \times 10^5$ , aproximadamente  $5 \times 10^5$ , aproximadamente  $1 \times 10^6$ , aproximadamente  $5 \times 10^6$ , aproximadamente  $1 \times 10^7$ , aproximadamente  $5 \times 10^7$ , aproximadamente  $1 \times 10^8$ , aproximadamente  $5 \times 10^8$ , aproximadamente  $1 \times 10^9$ , aproximadamente  $2 \times 10^9$ , aproximadamente  $3 \times 10^9$ , aproximadamente  $4 \times 10^9$ , aproximadamente  $5 \times 10^9$ , aproximadamente  $6 \times 10^9$ , aproximadamente  $7 \times 10^9$ , aproximadamente  $8 \times 10^9$ , aproximadamente  $9 \times 10^9$  o aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células a un sujeto humano. En realizaciones adicionales, pueden administrarse entre  $10^6$  a  $10^8$  células por kg de peso corporal o entre  $1 \times 10^7$  a  $9 \times 10^7$  células por kg de peso corporal, p. ej., aproximadamente  $1 \times 10^7$ , aproximadamente  $2 \times 10^7$ , aproximadamente  $3 \times 10^7$ , aproximadamente  $4 \times 10^7$ , aproximadamente  $5 \times 10^7$ , aproximadamente  $6 \times 10^7$ , aproximadamente  $7 \times 10^7$ , aproximadamente  $8 \times 10^7$ , aproximadamente  $9 \times 10^7$  o aproximadamente  $1 \times 10^8$  células por kg de peso corporal a un sujeto humano. Por ejemplo, tal número de células o tal número de células por kg de peso corporal pueden en particular hacer referencia al número total de células que va a administrarse a un sujeto, cuya administración puede distribuirse adecuadamente en una o más dosis (p. ej., distribuidas en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más dosis) administradas durante uno o más días (p. ej., más de 1, 2, 3, 4 o 5 o más días). No obstante, la determinación precisa de una dosis terapéuticamente eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, tamaño del daño tisular, y plazo desde que se produce el daño, y puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia a partir de la presente divulgación y conocimiento en la materia.

Adecuadamente, en una composición que se administrará, las células pueden estar presentes en una concentración entre aproximadamente  $10^4$ /ml a aproximadamente  $10^8$ /ml, preferentemente entre aproximadamente  $10^5$ /ml y aproximadamente  $10^7$ /ml, aún más preferentemente entre aproximadamente  $1 \times 10^6$ /ml y aproximadamente  $1 \times 10^7$ /ml, tal como, p. ej., aproximadamente  $5 \times 10^6$ /ml.

La dosis o cantidad de sustancias activas desveladas en el presente documento utilizada (p. ej., activador de antitrombina, inhibidor de la trombina), opcionalmente en combinación con uno o diversos ingredientes farmacéutica o biológicamente activos definidos previamente, depende del caso individual y, como es habitual, debe adaptarse a las circunstancias individuales para lograr un efecto óptimo. Por consiguiente, depende de la naturaleza y la gravedad del trastorno a tratar, y también del sexo, edad, peso corporal, dieta, salud general, grado de respuesta individual del ser humano o animal a tratar, eficacia, estabilidad metabólica y duración de la acción de los compuestos utilizados, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, si la terapia es aguda o crónica o profiláctica, o si se administran otros ingredientes farmacéutica o biológicamente activos, u otras terapias aplicadas, además de la(s) sustancia(s) activa(s) de la invención.

Sin limitación, una dosis única típica podría oscilar desde aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal o más, preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aún más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, y aún más preferentemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, en función de los factores mencionados previamente.

Para administraciones repetidas durante varios días o más, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación preferente del agente puede fluctuar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por consiguiente, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) pueden administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse como una única dosis diaria, dividida en una o más dosis diarias, o esencialmente de forma continua, p. ej., utilizando una infusión por goteo, o de forma intermitente, p. ej., cada semana o cada tres semanas.

En las realizaciones, el activador de antitrombina y en particular heparina no fraccionada se pueden administrar a un sujeto a través de una suspensión de células que comprende en general aproximadamente 5-15 UI/ml, más generalmente aproximadamente 8-12 UI/ml, e incluso más generalmente aproximadamente 10 UI/ml. Cuando se indica la administración intravenosa del activador de antitrombina y heparina no fraccionada en particular, la dosis típica puede ser de aproximadamente 10-30 UI/kg/h, más generalmente de aproximadamente 15-25 UI/kg/h, e incluso más generalmente de aproximadamente 20 UI/kg/h. Lógicamente, la dosis puede adaptarse según los ensayos de coagulación.

Preferentemente, el inhibidor de la trombina puede administrarse a un sujeto entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, más preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, incluso más preferentemente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal; más preferentemente para la bivalirudina entre aproximadamente 0,50 y aproximadamente 3,00 mg/kg de peso corporal, y aún más preferentemente entre aproximadamente 0,50 y aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal, o también preferentemente entre aproximadamente 0,75 y aproximadamente 1,75 mg/kg de peso corporal, o también preferentemente entre aproximadamente 1,75 y aproximadamente 3,00 mg/kg de peso corporal o más preferentemente entre aproximadamente 2,25 y aproximadamente 2,75 mg/kg de peso corporal, como por ejemplo aproximadamente 2,50 mg/kg peso corporal; y más preferentemente para la hirudina entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,6 mg/kg de peso corporal, y aún más preferentemente entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal, y aún más preferentemente aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corporal.

La invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos, que no limitan en modo alguno el alcance de la invención.

### **Ejemplo 1: Materiales y métodos**

#### Preparaciones celulares

Las células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (CMMHHOA, CMHHOA) se obtuvieron de donantes de hígado sanos como se ha descrito previamente (Najimi *et al. Cell Transplant*, 2007, vol. 16:717-28). Las células se suspendieron en una solución de albúmina que contiene o no heparina a una concentración de 10 U/ml (o más cuando corresponda). Se utilizaron como control hepatocitos humanos criopreservados/descongelados. Los procedimientos de aislamiento hepático y criopreservación/descongelación de hepatocitos se publicaron previamente con más detalle (Sokal *et al. Transplantation*, 2003, vol. 76, 735-738). Los fibroblastos humanos se recogieron por biopsia cutánea (cara medio-anterior del antebrazo) de voluntarios con edades comprendidas entre 8 años y 35 años tras un consentimiento informado por escrito descrito previamente (Lysy *et al. Hepatology*, 2007, vol. 46, 1574-1585). Las muestras de médula ósea se recogieron por aspiración de vértebras o crestas ilíacas de donantes post mortem de 8 a 67 años. Los aspirados se recogieron en jeringas heparinizadas que contienen solución salina equilibrada de Hanks al 10 % (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) y se procesaron dentro de las 48 h según un protocolo previamente descrito (Lysy *et al. Cell Prolif.*, 2008, vol. 41, 36-58).

Expresión del factor tisular de la suspensión con células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto

La presencia de la forma del FT unida a la membrana clásica y de IVFT se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Se extrajo ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de  $0,5 \times 10^6$  células utilizando el kit de reactivos de aislamiento Tripure (Roche Applied Science, Bruselas, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una etapa por RT-PCR en un instrumento termociclador (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica) con los cebadores sintetizados en Invitrogen. Se realizó RT-PCR para FT o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con los cebadores detallados en la Tabla 2.

Tabla 2

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO
Cebador sentido FT	5-TGAATGTACCGTAGAAGATGA-3	1
Cebador antisentido FT	5-GGAGTTCTCCTTCCAGCTCT-3	2
Cebador sentido IVFT	5-GGAAGAAGATCCTGGAATATCGAGG-3	3
Cebador antisentido IVFT	5-CTTGTTGATTGCGGAGTCAGGGAG-3	4
Cebador sentido GAPDH	5-CGGACTCAACGGATTTGGTCGTAT-3	5
Cebador antisentido GAPDH	5-AGCCTTCTCCATGGTGGT-3	6
Cebador sentido FTace	5-TCTTCAAGTTCAGGAAAGAAATATTCT-3	7
Cebador antisentido FTace	5-CCAGGATGATGACAAGGATGA-3	8

Los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se mostraron con bromuro de etidio en una lámpara ultravioleta.

RT-PCR cuantitativa para FT, FTace, IVFT, y ciclofilina A también se realizó en un sistema de PCR cuantitativa StepOnePlus (Applied Biosystems, California, EE. UU.), utilizando ensayos de expresión génica TaqMan®, enumerados en la Tabla 3. Para la expresión de FT, se utilizaron dos ensayos, uno (FT común) amplificando una región presente tanto en la membrana como en la forma soluble (corte y empalme alternativo, FTace), y el otro (membrana de FT) amplificando una región presente solo en la forma de la membrana (clásica). El parámetro Ct se obtuvo para cada muestra de Ct de ADNc y el par de cebadores y la ciclofilina A se sustrajo para obtener  $\Delta$ Ct. A continuación, el  $\Delta\Delta$ Ct se obtuvo restando el Ct de gen calibrador, y los resultados se expresaron como el cambio múltiplo de la cantidad de ARNm (Figura 9). La expresión TFace se calculó como la diferencia entre el  $\Delta\Delta$ Ct del FT común y la membrana de FT. Después, los cebadores (obtenidos en Applied Biosystems) eran tal como se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3

Gen	Referencia del análisis de la expresión génica de TaqMan®	Longitud del amplicón
FT común	Hs01076032_m1	69
Membrana FT	Hs01076029_m1	85
IVFT	Hs01041344_m1	78
Ciclofilina A	Hs99999904_m1	98

Actividad procoagulante de la suspensión con células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto

Se realizaron mediciones en un analizador ROTEM® delta (Pentapharm, Munich, Alemania). ROTEM evalúa la cinética y la calidad de la formación de coágulos y la lisis de coágulos en tiempo real. El tiempo de coagulación (TC) se define como el periodo de tiempo desde el comienzo del análisis hasta el inicio de la formación de coágulos, normalmente hasta que se alcanza la amplitud de 2 mm. El tiempo de formación de coágulos se define como el periodo hasta que se alcanza la amplitud de 20 mm. El ángulo alfa se define como el ángulo entre la línea central y una tangente a la curva a través del punto de amplitud de 2 mm, que es el final del TC. La amplitud máxima de la curva se define como la máxima firmeza del coágulo. La lisis máxima representa la fibrinólisis máxima detectada durante la medición.

En pocas palabras, tras una breve pausa, se pipetearon 300  $\mu$ l de sangre entera en un vaso precalentado a 37 °C. Las células suspendidas se añadieron posteriormente a la sangre entera ( $5 \times 10^5$  células si no se establece

especificación alguna). Se añadieron a continuación 20 µl del reactivo desencadenante que contiene el factor tisular (Innovin, Siemens, Marburg, Alemania. Dilución final 1:17.000/0,35 pM) diluidos en tampón Owren (Siemens, Marburg, Alemania), en caso de especificación, a la mezcla de células-sangre seguido de la adición necesaria de 20 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M. Tras la adición de calcio, las mediciones comenzaron automáticamente. Para los ensayos en plasma, se incubaron células (5x10<sup>5</sup> células si no se establece especificación alguna) en 3,8 ml de sangre citratada a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, la sangre entera se centrifugó a 4.500 rpm durante 10 minutos. A continuación se prepararon 300 µl del plasma obtenido para el protocolo, se pipetearon en el vaso seguido del agregado o no del factor tisular y CaCl<sub>2</sub>.

#### 10 Datos estadísticos

Las diferencias estadísticamente significativas (\*P <0,05, \*\*P <0,01, \*\*\*P <0,001) se evaluaron por medio de ensayos de Mann-Whitney. Se aplicó el ensayo de Kruskal-Wallis para el análisis de ANOVA de una vía.

#### 15 **Ejemplo 2: Actividad procoagulante de las células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto**

La actividad procoagulante de las células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (CMMHHA, CMHHA) se demostró mediante un método por tromboelastometría. Esta actividad procoagulante es más importante que la de los hepatocitos maduros evaluados mediante el tiempo de coagulación en el ensayo realizado en el tromboelastógrafo (Figura 1). Es más, y al contrario a la actividad procoagulante de los hepatocitos, se muestra que la actividad procoagulante de CMMHHA no se inhibe completamente por la heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular (no se muestran datos), fármacos anti-vitamina K (no se muestran datos) o fármacos anti-trombina utilizados solo (hirudina, bivalirudina) (Figuras 2-3). Se halló que el uso concomitante de heparina no fraccionada e hirudina o bivalirudina es una combinación específica y sinérgica original que permite modular la actividad procoagulante de las células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (Figuras 4-5). Se demostró asimismo una actividad procoagulante de fibroblastos, de células madre mesenquimales de médula ósea, pero no para las células madre hematopoyéticas de médula ósea (Figuras 6-7). Empleando experimentos análogos, el uso concomitante de la heparina no fraccionada e hirudina o bivalirudina se muestra también para modular la actividad procoagulante de los fibroblastos y las células madre mesenquimales de médula ósea.

#### **Ejemplo 3: Las células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto expresan FT**

Se evaluó la expresión de FT y su inhibidor natural IVFT a nivel de ARNm mediante RT-PCR (Figura 8). Tanto la forma de membrana como la variante cortada y empalmada alternativamente del ARNm de FT (FTace) se expresaron en células madre mesenquimales derivadas de hígado humano adulto (CMMHHA). En experimentos adicionales, RT-PCR cuantitativa se utilizó para cuantificar los niveles de FT, FTace, ARNm de IVFT mostrados en la Figura 9.

#### 40 **Ejemplo 4: Trasplante celular**

Las CMMHHA se suspenden en una concentración de 5x10<sup>6</sup> células/ml en una solución de Hibumin (5 %), que contiene bicarbonato (0,84 g/l), glucosa (2,5 g/l) y heparina no fraccionada (10 UI/ml). La suspensión de CMMHHA se infunde parenteralmente en un sujeto. Durante la infusión celular, el sujeto recibe bivalirudina (1,75 mg/kg). Entre las infusiones celulares consecutivas, el sujeto recibe bivalirudina (0,25 mg/kg) durante 2 a 4 horas, en función del ensayo por tromboelastometría.

Resulta evidente que la administración concomitante de un activador de antitrombina (p. ej., heparina) y un inhibidor de la trombina (p. ej., bivalirudina) en el trasplante celular mejora la eficacia del trasplante celular y posible prendimiento celular. La administración concomitante de un activador de antitrombina y un inhibidor de la trombina en el trasplante celular reduce la actividad procoagulante de las células y evita la trombosis asociada al trasplante celular así como complicaciones asociadas con el trasplante celular, tales como pérdida celular, rechazo celular e inflamación.

#### 55 **Ejemplo 5: La combinación de bivalirudina y heparina evita el riesgo de trombosis inducida por células progenitoras hepáticas humanas**

##### Métodos

60 El protocolo, incluyendo todos los experimentos con muestras humanas, el uso del protocolo no prescrito del anticoagulante humano, y los consentimientos informados, se aprobaron por el comité de revisión de la institución ética.

Preparaciones celulares

Las células CPHHas se obtuvieron del hígado de donantes sanos (n=6, edades comprendidas entre 9 y 44 años) como se ha descrito previamente (Najimi *et al.*, *Cell Transplant.* 2007; 16:717-728). Las células se estudiaron recién tripsinizadas o tras la criopreservación/descongelación en 4 a 6 pases. Las células se suspendieron en una solución de albúmina que contiene o no contiene heparina a una concentración de 10 UI/ml (o más en caso de especificarse). Se utilizó igualmente, como control, hepatocitos humanos criopreservados/descongelados (n=5, edades comprendidas entre 16 y 44 años). Los procedimientos de aislamiento hepático y criopreservación/descongelación de hepatocitos se publicaron previamente con más detalle (Sokal *et al.*, *Transplantation.* 2003; 76:735-738).

Las muestras de médula ósea se recogieron por aspiración de vértebras o crestas ilíacas de 3 donantes de órganos post mortem con edades comprendidas entre 8 y 67 años. Los aspirados se recogieron en jeringas heparinizadas que contienen solución salina equilibrada de Hanks al 10 % (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) y se procesaron dentro de las 48 h según un protocolo descrito previamente (Lysy *et al.*, *Cell Prolif.* 2008; 41:36-58).

Los fibroblastos humanos se recogieron por biopsia en la piel (cara media-anterior del antebrazo), de voluntarios de 18 años a 35 años (n=3) tras el consentimiento informado por escrito descrito previamente (Lysy *et al.*, *Hepatology.* 2007; 46:1574-1585).

Las células no parenquimales hepáticas humanas se obtuvieron tras el aislamiento hepático realizado en nuestro banco de tejidos, filtración y 2 centrifugaciones a baja velocidad de la suspensión celular de tres donantes diferentes (hígado de un neonato y dos donantes de 12). A continuación, las células estrelladas humanas se aislaron por centrifugación en gradiente Nicodenz (Myegaard, Oslo, Noruega) según los protocolos establecidos (Guimarães *et al.*, *J Hepatol.* 2010; 52(3):389-397). Los miofibroblastos activados se obtuvieron de las células estrelladas aisladas.

Sangre

La sangre se obtuvo de donantes varones con edades comprendidas entre 29 y 40 años (n=5).

Actividad procoagulante de la suspensión de CPHHas

Se realizaron mediciones en un analizador ROTEM® delta (Pentapharm, Munich, Alemania). ROTEM® evalúa la cinética y la calidad de la formación de coágulos y la lisis de coágulos en tiempo real. El tiempo de coagulación (TC) se define como el periodo de tiempo desde el comienzo del análisis hasta el inicio de la formación de coágulos, normalmente hasta que se alcanza la amplitud de 2 mm. El tiempo de formación de coágulos se define como el periodo hasta que se alcanza la amplitud de 20 mm. El ángulo alfa se define como el ángulo entre la línea central y una tangente a la curva a través del punto de amplitud de 2 mm, que es el final del TC. La amplitud máxima de la curva se define como la máxima firmeza del coágulo. La lisis máxima representa la fibrinólisis máxima detectada durante la medición. Centro de atención en TC.

En pocas palabras, tras una breve pausa, se pipetearon 300 µl de sangre entera en un vaso precalentado a 37 °C. Las células suspendidas se añadieron posteriormente a la sangre entera (5x10exp5 células si no se establece especificación alguna). Se añadieron a continuación veinte µl del reactivo desencadenante que contiene el factor tisular (FT) (Innovin, Siemens, Marburg, Alemania. Dilución final 1:17.000/0,35 pM) diluidos en tampón Owren (Siemens, Marburg, Alemania), a la mezcla de células-sangre seguido de la adición necesaria de 20 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M. Tras el agregado de calcio, las mediciones comenzaron automáticamente. La actividad procoagulante (APC) de las células se determinó también sin adición de Innovin. Para determinar el papel de FT en este modelo de coagulación, las células se preincubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, ya sea con 0,2 mg/ml de AM IgG1 anti-humana de FT (American Diagnostica) o 0,2 mg/ml de AM IgG1 de ratón (clon 11711.11; RnD Systems, Abingdon, Reino Unido) antes de un lavado exhaustivo en albúmina al 5 % y del análisis por tromboelastometría.

Para los ensayos en plasma, se incubaron células (5x10exp5 células si no se establece especificación alguna) en 3,8 ml de sangre citratada a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, la sangre entera se centrifugó a 4.500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se prepararon tres cientos µl del plasma obtenido para el protocolo, se pipetearon en el vaso seguido del agregado o no de Innovin y CaCl<sub>2</sub>.

Para los ensayos deficientes en plasma, se añadieron células en suspensión (5x10exp5 células si no se establece especificación alguna) a 300 µl de plasma antes de añadir Innovin y CaCl<sub>2</sub>.

Para la modulación de los ensayos de la APC, las células se suspendieron en albúmina al 5 % con o sin heparina no fraccionada (heparina Leo®, Leo) a una concentración de 10 UI/ml. Se añaden enoxaparina (Clexane®, Aventis Pharma) a una concentración de 1 UI/ml según las publicaciones (Guimarães *et al.*, *J Hepatol.* 2010;52(3):389-397), fondaparinux (Arixtra®, GSK) a una concentración de 0,34 mg/l (extrapolación de dosis clínica, 2,5 mg para peso adulto) y de publicaciones (Feng *et al.*, *Clin Ther.* 2009; 31:1559-1567), hirudina (Refludan®, Celgène Europe Limited) a una concentración de 5,7 µg/ml (extrapolación de dosis clínica, 0,4 mg/kg), bivalirudina (Angiox®, The Medicines Company) a una concentración de 10,7 µg/ml (extrapolación de dosis clínica, 0,75 mg/kg) a la sangre o

plasma. La extrapolación de dosis se basó en el volumen de sangre circulante según el peso (70 ml/kg).

Si no se observó coagulación alguna tras 1.800 s, se detuvo arbitrariamente la tromboelastometría.

## 5 Anillo tubular

Un protocolo experimental de sangre entera se adaptó a partir de un modelo descrito previamente (Johansson *et al.*, *Diabetes*. 2005; 54:1755-1762). Los anillos se fabricaron de tubos de polivinilcloruro (diámetro interno 6,3 mm, longitud 390 mm) y se trataron con una superficie de heparina Corline adquirida en Corline (Uppsala, Suecia). Los anillos se suplementaron con muestras de células (5x10<sup>5</sup>) suspendidas en solución salina tamponada fosfato antes de la adición de sangre. Cinco ml de sangre no anticoagulada de voluntarios sanos se añadieron a continuación a cada anillo. Para generar un flujo sanguíneo de aproximadamente 45 ml/minuto, los dispositivos de anillo se colocaron en un agitador de plataforma basculante dentro de una incubadora a 37 °C. Las muestras sanguíneas se recogieron en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (concentración final, 4,1 mmol/l) y citrato (concentración final, 12,9 mmol/l) antes y 30 minutos posteriores al inicio. Las plaquetas se contaron en un XE-2100 automate (Sysmex, Japón) y los dímeros D se evaluaron mediante el ensayo inmunoturbidimétrico (Innovance D-Dimer, Siemens, Marburg, Alemania) en un CA-7000 (Sysmex, Japón).

## Medición de la actividad anti-Xa

La medición de la actividad anti-Xa se realizó utilizando el kit de heparina Biophen (LRT) adaptado en un CA7000 (Siemens, Marburg, Alemania). En pocas palabras, el ensayo es un método cinético cromogénico basado en la inhibición de una cantidad constante del factor Xa, por medio de la heparina ensayada (u otra sustancia anti-Xa) en presencia de antitrombina endógena, e hidrólisis de un sustrato cromogénico específico del factor Xa mediante el factor Xa en exceso. Tras 30 min de incubación de las células suspendidas en albúmina suplementadas o no con heparina (10 UI/ml, 50 UI/ml, y 100 UI/ml) en sangre, se midió la actividad anti-Xa en plasma obtenida tras la centrifugación de la sangre.

## Expresión de FT e IVFT de la suspensión de CPHHas

Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron para evaluar la presencia de FT. Para ello, se colocaron células madre derivadas de hígado humano adulto en un cubreobjetos y se fijaron por paraformaldehído al 4 % (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 20 minutos. Entonces, estas células se incubaron con Triton X-100 (Sigma, Bornem, Bélgica) al 1 % en tampón Tris base sodio (50 mmol/l Tris-HCl pH 7,4 y 150 mmol/l NaCl) (Organics [VWR], Lovaina, Bélgica) durante 15 minutos y luego con leche al 3 % en tampón Tris base sodio durante 1 hora. El anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal (AM) IgG1 anti-FT murino (inmunoglobulina [Ig]G1 n4508; American Diagnostica, Andresy, Francia) se diluyó (1/50) en Tris base sodio y se incubó con las células durante 1 hora. El anticuerpo secundario utilizado era IgG anti-ratón conjugada a fluoresceína isotiocianato (Sigma). Los núcleos se revelaron por tinción 4-, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI Sigma). Se realizaron controles experimentales negativos (ausencia de anticuerpos primarios o secundarios). La presencia de FT también se confirmó por análisis de citometría de flujo. Con el fin de detectar la forma unida a la membrana de FT, las células se lavaron en solución salina tamponada fosfato suplementada con seroalbúmina bovina al 0,5 % (tampón ACAF) y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C con AM IgG1 conjugada a fluoresceína isotiocianato (FITC) contra FT n.º 4508CJ (American Diagnostica) o el correspondiente AM de control de isotipo comparable (BD Biosciences, Erembodedem, Bélgica) diluido en tampón ACAF que contiene suero humano agrupado descomplementado al 10 %. Para detectar la forma citosólica de FT, las células se incubaron con Cytifix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 20 min a temperatura ambiente y se lavaron con PermWash (BD Biosciences). Las muestras se incubaron a continuación durante 20 minutos a temperatura ambiente con AM anti-FT conjugada a FITC o el correspondiente AM de control de isotipo comparable (BD Biosciences) diluido en permwash. La fluorescencia celular se midió utilizando un citómetro de flujo BD FACS CANTO II y se analizó utilizando el software BD FACS Diva.

No se obtuvo anticuerpo anti-IVFT alguno para evaluar la expresión del inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) por inmunocitoquímica o análisis por citometría de flujo.

La presencia de las 2 formas de FT y de IVFT se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Se extrajo ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de 0,5x10<sup>6</sup> células utilizando el kit de reactivos de aislamiento Tripure (Roche Applied Science, Bruselas, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una etapa por RT-PCR en un instrumento termociclador (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica) con cebadores sintetizados en Invitrogen. Se realizó RT-PCR para FT o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con los cebadores detallados en la Tabla 2.

Los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se mostraron con bromuro de etidio en una lámpara ultravioleta.

RT-PCR cuantitativa para FT, FTace, IVFT, y ciclofilina A también se realizó en un sistema de PCR cuantitativa StepOnePlus (Applied Biosystems, California, EE. UU.), utilizando ensayos de expresión génica TaqMan®,

enumerados en la Tabla 3. Para la expresión de FT, se utilizaron dos ensayos, uno (FT común) amplificando una región presente tanto en la membrana como en la forma soluble (corte y empalme alternativo, FTace), y el otro (membrana de FT) amplificando una región presente solo en la forma de la membrana (clásica). El parámetro Ct se obtuvo para cada muestra de ADNc y el Ct del par de cebadores y la ciclofilina A se sustrajo para obtener  $\Delta$ Ct. A continuación, el  $\Delta\Delta$ Ct se obtuvo restando el Ct del gen calibrador, y los resultados se expresaron como el cambio múltiplo de la cantidad de ARNm. La expresión TFace se calculó como la diferencia entre el  $\Delta\Delta$ Ct del FT común y la membrana de FT. Los cebadores eran tal como se detalla en la Tabla 3.

La línea celular CAPAN se utilizó como control positivo de FT mientras que la línea celular HUVEC se utilizó como control positivo de IVFT.

#### Infusiones de pacientes y protocolo anticoagulación

Una niña de 3 años, que padece una severa deficiencia de OTC (actividad < 1 %), era el primer receptor de CPHHas. El momento del diagnóstico se estableció a los 12 días después del nacimiento y se confirmó mediante análisis de ADN al indicar una mutación de novo de los exones 6 y 8 en el alelo paterno del gen OTC.

Recibió 2 infusiones separadas de 30 millones de CPHHas por kg de peso corporal, de un donante varón, con un intervalo de 2 semanas entre las infusiones. En total, la paciente recibió 0,9 mil millones de células progenitoras. Las células se suspendieron en albúmina al 5 % y heparina (10 UI/ml).

La infusión de las primeras CPHHas se realizó con anestesia general sin ninguna premedicación. Se colocó un catéter transcutáneo en la rama principal de la vena porta con guía fluoroscópica y ecografía tras la inyección de una dosis de cefazolina (40 mg/kg). La infusión celular se realizó mediante una jeringa de 50 ml a un caudal de 100 cc/h. La inmunosupresión se administró a la paciente utilizando tacrolimus (Prograft®, Astellas Pharma) en monoterapia (0,1 mg/kg) que corresponde a 2 mg por día en 2 dosis divididas para alcanzar concentraciones mínimas de 6-7 ng/ml. Se administró antibioterapia profiláctica con cefazolina (40 mg/kg) 2 veces tras la infusión con intervalos de 8 horas entre las 2 dosis. La infusión y el ciclo postinfusión se realizaron sin complicaciones y la niña recibió el alta hospitalaria al tercer día tras la infusión.

La segunda infusión de CPHHas se realizó dos semanas más tarde. En ese momento, se produjo una trombosis parcial de una rama de la vena porta intrahepática y se procedió a la detención de la infusión. Este acontecimiento adverso se trató mediante heparina y anticoagulante cumarínico (5 mg/día).

La concentración de Dímero D se eleva notablemente después de ambos ciclos de infusión celular. Este acontecimiento adverso no tuvo consecuencias para la paciente pero se decidió investigar más a fondo el efecto procoagulante de las células progenitoras.

El segundo paciente era un hombre de 24 años, con síndrome de Crigler-Najjar tipo intermedio I/II que no responde a fenobarbital. El momento del diagnóstico se estableció un mes después del nacimiento y se confirmó mediante análisis de ADN al indicar una mutación en el gen UDP-glucuronosiltransferasa 1A1 con presencia del estado homocigoto de la mutación L443P. El paciente recibió un total de 2,2 mil millones de CPHHas administradas en 7 infusiones durante 2 días. Antes de la colocación del catéter en la porta, el paciente recibió premedicación incluyendo cefazolina (1 gr). El catéter se colocó bajo control de la ecografía en el sistema porta. Se inyectó solumedrol (80 mg) antes de la infusión. El tratamiento inmunosupresor consistió en tacrolimus (Prograft®, Astellas Pharma), dirigiendo selectivamente las concentraciones sanguíneas de 6-8 ng/ml. Se prescribió profilaxis de coagulación específica; las células se suspendieron en albúmina al 5 % y en heparina a una concentración de 10 UI/ml. Durante la infusión celular, el sujeto recibió bivalirudina (1,75 mg/kg). Entre las infusiones celulares consecutivas, el sujeto recibió bivalirudina (0,25 mg/kg) durante 2 a 4 horas, en función del ensayo por tromboelastometría. Los ensayos de coagulación incluyen tromboelastometría (EC), recuento plaquetario (valores normales: 150-350  $10^9$ / $\mu$ l) y concentraciones de dímeros D (valores normales: <500 ng/ml), tiempo de la trombina (TT, valores normales: 15-24 s), tiempo de protrombina (TP, valores normales: 9-14 s) y tiempo de tromboplastina parcial (TTP, valores normales: 20-33 s) se realizaron repetidamente antes, 20 min posteriores al inicio y al final de cada infusión. Se realizó ecografía Doppler hepática después de cada infusión para acceder al flujo portal.

El tercer paciente era un adolescente de 17 años que padece glucogenosis tipo 1 a, documentada por el análisis genético (mutación G188R e inserción 380insC) y ausencia de actividad de la glucosa-6-fosfatasa en biopsia hepática. También recibió profilaxis con antibióticos antes de la colocación del catéter en la porta y esteroides antes de la infusión. Se aplicó el mismo régimen inmunosupresor. El paciente recibió un total de 3 mil millones de células progenitoras administradas en 7 infusiones durante más de 3 días con el objetivo de controlar la hipoglucemia recurrente. Se aplicó el mismo protocolo de anticoagulación y coagulación incluyendo el seguimiento por ecografía Doppler hepática.

#### Datos estadísticos

Las diferencias estadísticamente significativas (\* p <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001) se evaluaron mediante ensayos

de Mann-Whitney. Los valores significativos se ajustaron según la corrección de Bonferroni para evitar el error tipo 1. Se aplicó el ensayo de Kruskal-Wallis para el análisis por ANOVA de una vía.

## Resultados

5

### Actividad procoagulante de CPHHas

#### Método por tromboelastometría y anillo tubular

10 Se demostró la actividad procoagulante (APC) de las células progenitoras hepáticas humanas adultas (CPHHas) por el método de tromboelastometría en sangre y plasma humano. El tiempo de coagulación (TC) de CPHHas era inferior al de los hepatocitos evaluados en el tromboelastograma (en sangre,  $117,5 \pm 33,8$  s (n=15) contra  $285,8 \pm 87,0$  s (n=11),  $p < 0,001$ ) (en plasma,  $112,6 \pm 18,4$  s (n=9) contra  $363,0 \pm 180,1$  s (n=5),  $p < 0,05$ ) (Figuras 10A y 10B). El CT de control, sin adición de células, se midió a  $646,2 \pm 111,7$  s (n=15) en sangre y a  $781,9 \pm 150,5$  s (n=9) en plasma. Se observó APC comparable de CPHHas cuando no se añadió FT extrínseco (Figura 11). No se obtuvo APC alguna cuando el medio de cultivo de CPHHas, ausencia de células, se colocó en el tromboelastograma en lugar de las células (Figura 12).

20 Se evaluó también la APC de CPHHas en el modelo de anillo tubular. Se observaron la reducción del recuento plaquetario y el aumento de las concentraciones de dímeros D después de la incubación de CPHHas con sangre. Plaquetas de  $295.000/\mu\text{l}$  a  $109.000/\mu\text{l}$  (experimento 1) y de  $310.000/\mu\text{l}$  a  $134.000/\mu\text{l}$  (experimento 2); dímeros D de  $100$  ng/ml a  $700$  ng/ml (experimento 2) y  $95$  ng/ml a  $740$  ng/ml (experimento 2).

#### Actividad procoagulante de las células mesenquimales

25

Se demostró además la APC de las células madre mesenquimales de médula ósea ( $279,3 \pm 108,3$  s (n=3)), fibroblastos cutáneos ( $121,8 \pm 26,53$  s (n=3)) y miofibroblastos hepáticos ( $61,7 \pm 7,6$  s (n=3)) por el método de tromboelastometría en sangre entera humana. Se emplearon células madre hematopoyéticas de médula ósea como control de células no procoagulantes ( $590,7 \pm 25,3$  s (n=3)) (Figura 13).

30

#### Modulación de la actividad procoagulante de CPHHas

Se analizó en primer lugar la APC de CPHHas en plasma deficiente en factor de coagulación. Se demostró que cuando se utiliza el plasma deficiente en factor VII, cofactor de FT, la APC de CPHHas se redujo solo parcialmente ( $298,3 \pm 42,3$  s (n=3),  $p < 0,01$  en comparación con APC en plasma normal) (Figura 14). No se observó APC alguna de CPHHas en el plasma deficiente en factor II (trombina) o X, al igual que para el plasma deficiente en factor V, pero a una concentración menor (Figura 14). Es más y al contrario a la APC de hepatocitos (Figura 15C), se demostró que la APC de CPHHas no se inhibió completamente por la heparina no fraccionada ( $225,8 \pm 149,8$  s (n=15)), heparina de bajo peso molecular ( $112,3 \pm 22,5$  s (n=3)) o fondaparinux ( $209,7 \pm 149,7$  s (n=3)) (Figura 15A), incluso si la dosis se aumentó hasta 5x (Figura 23). No se observó coagulación alguna cuando se utilizó heparina en ausencia de células.

45 Los fármacos del inhibidor de la trombina, hirudina o bivalirudina permiten únicamente un control parcial de la APC de CPHHas ( $256,3 \pm 11,8$  s (n=3) y  $380,8 \pm 114,7$  s (n=4), respectivamente) (Figura 15B), incluso cuando se aumenta la dosis (2x o 5x) (Figuras 24 y 25). La APC de los hepatocitos se controló por fármacos inhibidores de la trombina, hirudina y bivalirudina (Figura 15D). La sangre del control (en ausencia de células) tuvo un TC a  $1.075,0 \pm 107,2$  con bivalirudina mientras no se observó coagulación medible alguna con hirudina.

50 Los fármacos anti-vitamina K (sangre obtenida de los pacientes tratados con INR 2 a 3) no tuvieron influencia en tromboelastometría incluso para el control (ausencia de células) (no se muestran datos). Por último, se demostró que el uso concomitante de bivalirudina con heparina no fraccionada ( $1.240,0 \pm 338,7$  s (n=3)) o enoxaparina ( $725,0 \pm 90,1$  s (n=3)) o fondaparinux ( $909,0 \pm 421,4$  s (n=3)) es una combinación sinérgica, activador de antitrombina e inhibidor de la trombina, que permite modular la APC de CPHHas (Figuras 16A y B). No se obtuvo la modulación completa de la APC de CPHHas cuando se combina heparina y enoxaparina o fondaparinux (Figura 26).

55

Utilizando experimentos análogos, se demostró que la heparina no fraccionada puede controlar la APC de las células mesenquimales de médula ósea, los fibroblastos cutáneos, pero la APC se inactiva en los miofibroblastos hepáticos (Figura 27). El uso concomitante de heparina no fraccionada y bivalirudina también demostró que modula la APC de los miofibroblastos hepáticos, en contraste con solo bivalirudina (Figura 28).

60

#### Análisis de la APC de CPHHas

##### Las CPHHas expresan FT e IVFT

65 La expresión de FT se documentó por primera vez por inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 17, se halló que todas las células expresaban constitutivamente FT (tinción citoplásmica uniforme). El análisis por

citometría de flujo de CPHHas confirmó una tinción positiva y específica para FT ( $94,9 \pm 1,0$  % para la forma unida a la membrana,  $93,6 \pm 10,2$  % para la forma citosólica en comparación con el isotipo control  $24,2 \pm 6,1$  % y  $7,6 \pm 5,8$  %, respectivamente y para las células no marcadas  $13,2 \pm 7,1$  % y  $3,7 \pm 4,1$  %, respectivamente; n=3).

- 5 Se evaluó asimismo la expresión de FT y su inhibidor de IVFT en el nivel de ARNm empleando RT-PCR (Figura 18). Tanto la forma de membrana como la variante alternativamente cortada y empalmada del ARNm de FT se expresaron en CPHHas. IVFT también se expresó. En experimentos adicionales, se utilizó RT-PCR cuantitativa para cuantificar FT, FTace y los niveles de ARNm de IVFT. Como se muestra en la Figura 19, se expresó predominantemente la variante de FT en la membrana (n=3). Además, la expresión de FT es más importante para  
10 CPHHas en comparación con los hepatocitos (n=3). Por el contrario, la expresión de IVFT por los hepatocitos era mayor que la de CPHHas (n=3).

- El papel de FT en la inducción de la APC se determinó por preincubación de las células con IgG anti-FT humano. Como se muestra en la Figura 20, la APC de CPHHas solo se controló parcialmente mediante el bloqueo de FT  
15 ( $324,8 \pm 11,4$  s (n=5),  $p < 0,01$  en comparación con ausencia del anticuerpo FT) en contraste con los hepatocitos, como ya se demostró previamente (Fisher *et al.*, *Transplantation*. 2000; 69:303-307).

- Como ya se mostró en la Figura 13, solo se obtuvo un control parcial de la APC de CPHHas en plasma deficiente en factor VII que confirma que la APC de CPHHas no se relacionó completamente con FT.  
20

#### CPHHas y heparina

- Se observó solo una pequeña actividad anti-Xa en plasma obtenida después de la incubación de CPHHas ( $0,05 \pm 0,03$  UI/ml) y heparina a una concentración de 10 UI/ml (Figura 21), en relación con la ausencia de efecto  
25 anticoagulante de solo heparina en CPHHas.

#### Protocolo de anticoagulación específico para la aplicación clínica

- El protocolo de anticoagulación se aplicó con éxito ya que no se produjo ningún acontecimiento trombótico o hemorrágico en ambos pacientes. Como era de esperar, con el uso de bivalirudina se observó un aumento sustancial de TT y limitado en TP. Se observó un leve aumento de dímeros D en ambos pacientes, alcanzando  
30 1.480 ng/ml para el primer paciente y 1.840 ng/ml para el segundo paciente. Se apreció un aumento de TTP en los dos pacientes, en relación con la actividad anti-Xa detectable (Figuras 22A y B). No se halló modificación alguna del flujo portal mediante ecografía Doppler hepática durante las infusiones en ambos pacientes.  
35

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universite catholique de Louvain  
40 <120> Composiciones y métodos para el trasplante celular  
<130> UCL-096-PCT  
<150> 11152119.1  
45 <151> 25-01-2011  
<160>8  
<170> PatentIn versión 3.3  
50 <210> 1  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
55 <220>  
<223> Cebador  
<400> 1  
60 tgaatgtgac cgtagaagat ga 22  
<210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 2  
 5 ggagttctcc tccagctct 20  
  
 <210> 3  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 3  
 15 ggaagaagat cctggaatat cgagg 25  
  
 <210> 4  
 <211> 25  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25  
 <400> 4  
 ctggttgat tgcggagtca gggag 25  
  
 <210> 5  
 <211> 24  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 35  
 <400> 5  
 cggactcaac ggatttggtc gtat 24  
  
 <210> 6  
 <211> 18  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 45  
 <400> 6  
 50 agccttctcc atggtggt 18  
  
 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 7  
 60 tcttcaagtt caggaaagaa atattct 27  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 8

5 ccaggatgat gacaaggatg a 21

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina y células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, en la que:
- el activador de antitrombina se selecciona entre el grupo que consiste en heparina, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular y fondaparinux; y
  - el inhibidor de la trombina se selecciona entre el grupo que consiste en bivalirudina e hirudina.
2. La combinación según la reivindicación 1, en la que las células progenitoras hepáticas adultas son células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto que expresan alfa actina de músculo liso (AAML) y albúmina (ALB) y no expresan citoqueratina-19 (CK-19), o son células progenitoras pluripotentes derivadas de hígado humano adulto no ovaladas que expresan marcadores celulares hepáticos y son capaces de diferenciarse en células hepáticas maduras, en células productoras de insulina, en células osteogénicas y en células epiteliales, o son células progenitoras pluripotentes derivadas de hígado humano adulto no ovaladas que expresan marcadores celulares hepáticos y que son capaces de diferenciarse en células hepáticas maduras, en células productoras de insulina, en células osteogénicas y en células endoteliales.
3. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que las células:
- son células primarias; o
  - son una línea celular; o
  - se han sometido a un almacenamiento, tal como criopreservación y/o proliferación o pases; o
  - se inducen para expresar una o más proteínas, tales como una o más proteínas que son autólogas a las células o que no son autólogas a las células, o para aumentar o disminuir o bloquear completamente o sustancialmente por completo la expresión de las mismas; o
  - se transforman de forma estable o transitoria con un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico codificante de un producto génico que potencia el crecimiento, la diferenciación y/o el funcionamiento de las células.
4. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 configurada para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de dichas células, de al menos un activador de antitrombina y de al menos un inhibidor de la trombina a un sujeto.
5. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el activador de antitrombina es heparina no fraccionada.
6. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el inhibidor de la trombina es bivalirudina.
7. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las células y al menos un activador de antitrombina están incluidos en una suspensión celular.
8. Una composición farmacéutica que comprende la combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición farmacéutica es líquida, semisólida o sólida.
9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, en donde la composición farmacéutica es líquida y las células están presentes en la composición farmacéutica a una concentración comprendida entre  $10^4$ /ml y  $10^8$ /ml, preferentemente entre  $10^5$ /ml y  $10^7$ /ml, más preferentemente entre  $1 \times 10^6$ /ml y  $1 \times 10^7$ /ml, o  $5 \times 10^6$ /ml.
10. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 para su uso como medicamento.
11. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 para su uso en el trasplante de las células; o para su uso en el tratamiento de la trombosis o de complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de dichas células; o para su uso en la inhibición de la actividad procoagulante de dichas células *in vivo*.
12. La combinación o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en con:
- el activador de antitrombina es heparina no fraccionada que se va a administrar a un sujeto por medio de una suspensión celular que comprende 5-15 UI/ml, preferentemente 8-12 UI/ml, más preferentemente 10 UI/ml o por administración intravenosa a 10-30 UI/kg/h, preferentemente 15-25 UI/kg/h, más preferentemente 20 UI/kg/h; y/o
  - el inhibidor de la trombina es bivalirudina que se va a administrar a un sujeto a entre 0,50 y 3,00 mg/kg de peso

corporal.

- 5 13. La combinación o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde (a) se preparará una composición que comprende una suspensión celular de células en una solución acuosa que contiene al menos un activador de antitrombina; (b) se preparará una solución acuosa que contiene al menos un inhibidor de la trombina; y (c) la composición definida en (a) y la solución definida en (b) se administrarán de forma simultánea, separada o secuencial a un sujeto.
- 10 14. Un método para inhibir *in vitro* la actividad procoagulante de las células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, que comprende proporcionar una combinación que incluye dichas células, al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, en donde:
- 15 - el activador de antitrombina se selecciona entre el grupo que consiste en heparina, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular y fondaparinux; y  
- el inhibidor de la trombina se selecciona entre el grupo que consiste en bivalirudina e hirudina.
- 20 15. Un kit de diversos componentes o un artículo de fabricación que comprende la combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y que comprende opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 16. El kit según la reivindicación 15, en el que:
- las células, al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina están mezclados; o  
- las células, al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina están contenidos en recipientes separados; o  
- las células y al menos un activador de antitrombina están incluidos en una suspensión celular en un recipiente separado de un recipiente que contiene al menos un inhibidor de la trombina.
- 30 17. Una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el trasplante de células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos; o para su uso en el tratamiento de la trombosis o de complicaciones tromboticas causadas por el trasplante de dichas células; o para su uso en la inhibición de la actividad procoagulante de dichas células *in vivo*, en donde:
- 35 - el activador de antitrombina se selecciona entre el grupo que consiste en heparina, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular y fondaparinux; y  
- el inhibidor de la trombina se selecciona entre el grupo que consiste en bivalirudina e hirudina.
- 40 18. La combinación o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 17, que incluyen además el elemento o los elementos característicos que se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, 12 o 13.
- 45 19. Un método para inhibir *in vitro* la actividad procoagulante de las células seleccionadas entre el grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, que comprende poner en contacto dichas células con una combinación que comprende al menos un activador de antitrombina y al menos un inhibidor de la trombina, en donde:
- 50 - el activador de antitrombina se selecciona entre el grupo que consiste en heparina, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular y fondaparinux; y  
- el inhibidor de la trombina se selecciona entre el grupo que consiste en bivalirudina e hirudina.
- 55 20. El método según las reivindicaciones 14 o 19, en el que las células progenitoras hepáticas adultas son células progenitoras o células madre hepáticas derivadas de hígado humano adulto que expresan alfa actina de músculo liso (AAML) y albúmina (ALB) y no expresan citoqueratina-19 (CK-19), o son células progenitoras pluripotentes derivadas de hígado humano adulto no ovaladas que expresan marcadores celulares hepáticos y que son capaces de diferenciarse en células hepáticas maduras, en células productoras de insulina, en células osteogénicas y en células epiteliales, o son células progenitoras pluripotentes derivadas de hígado humano adulto no ovaladas que expresan marcadores celulares hepáticos y que son capaces de diferenciarse en células hepáticas maduras, en células productoras de insulina, en células osteogénicas y en células endoteliales.
- 60

FIG 1

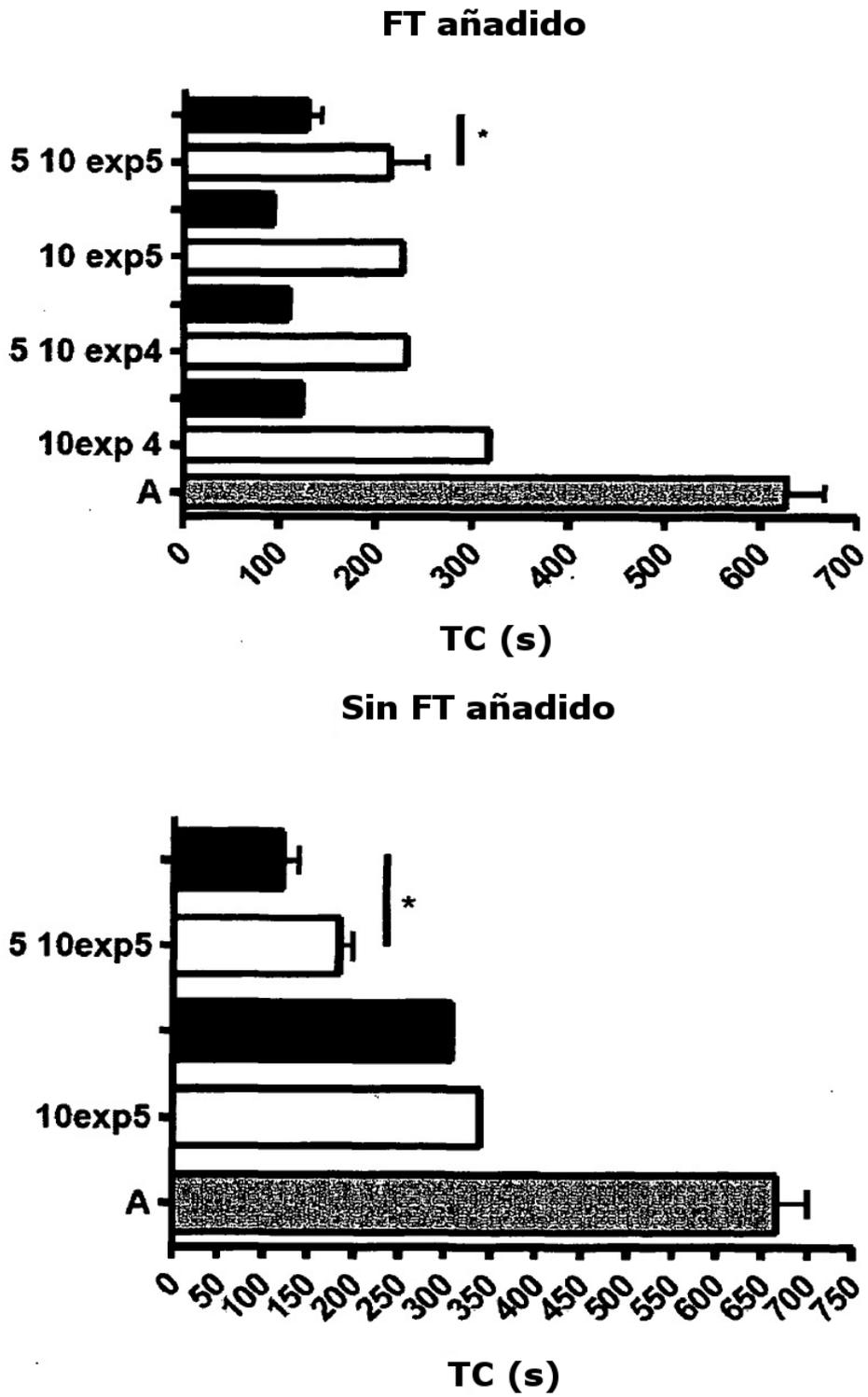


FIG 2

FT añadido

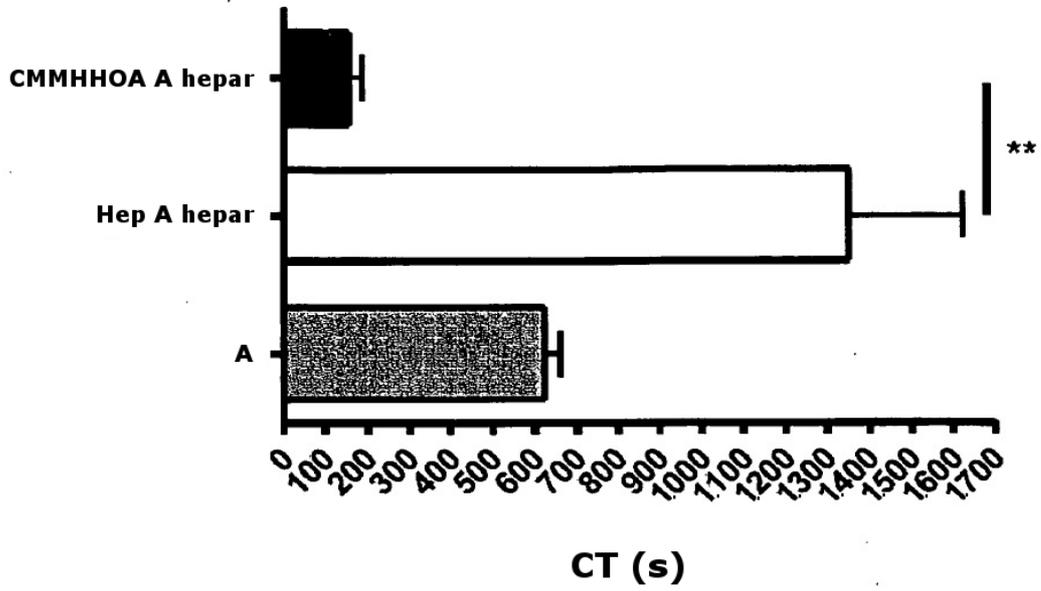


FIG 3

FT añadido

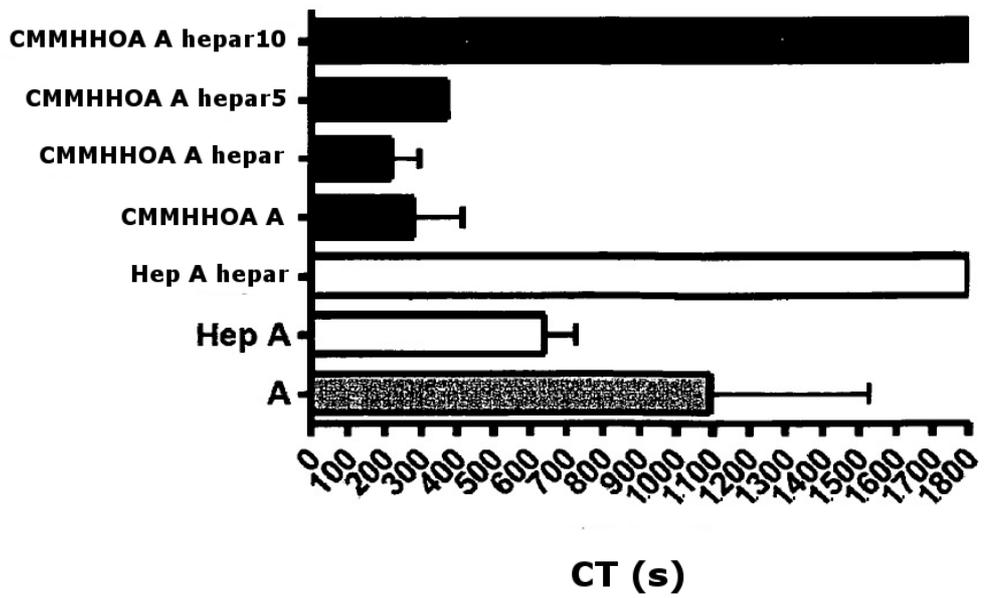


FIG 4

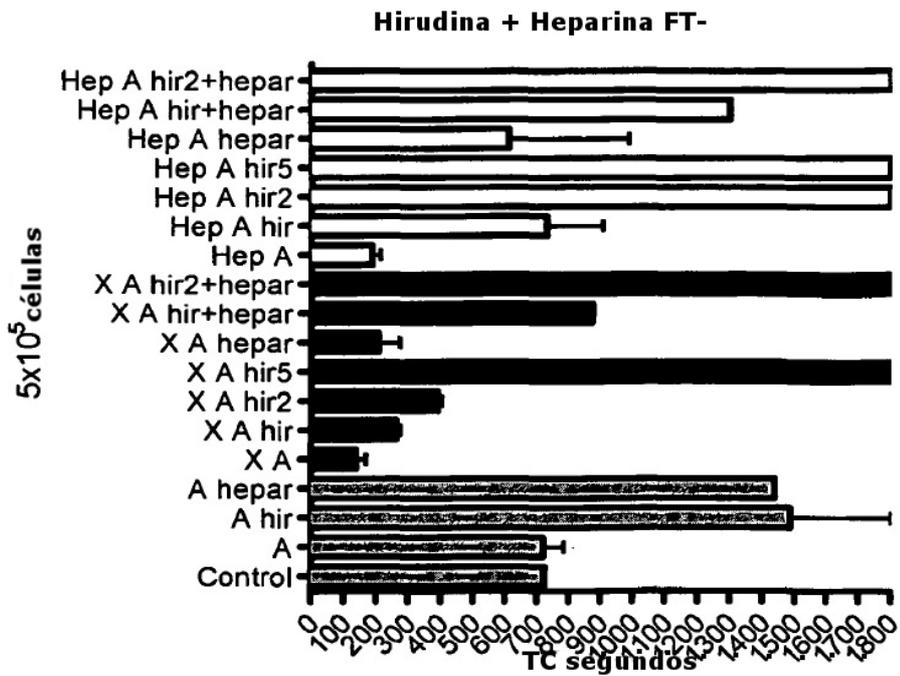
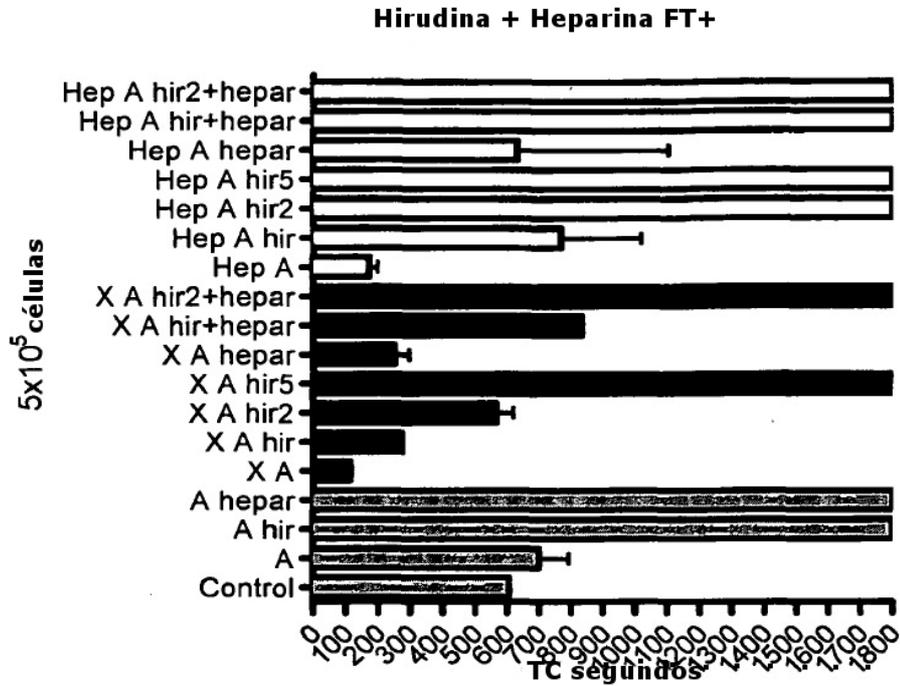


FIG 5

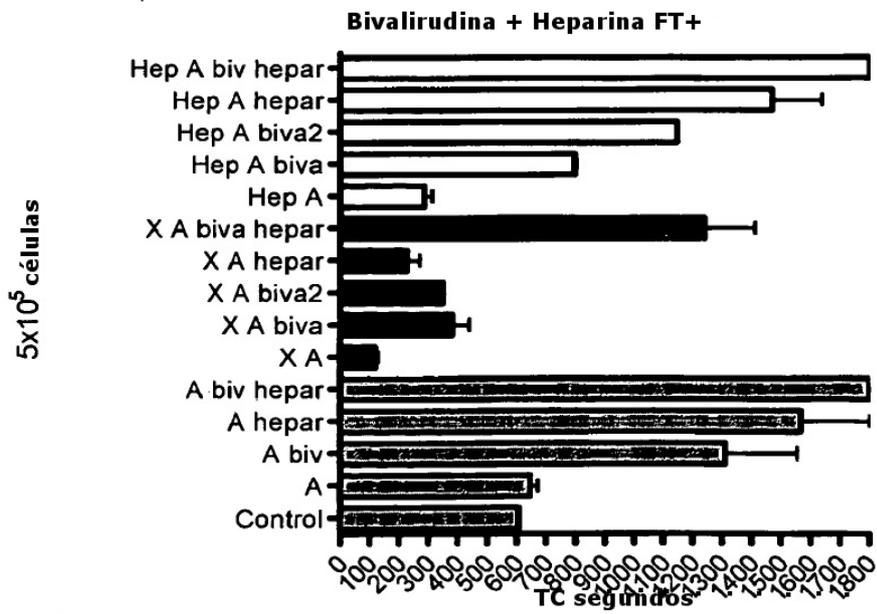
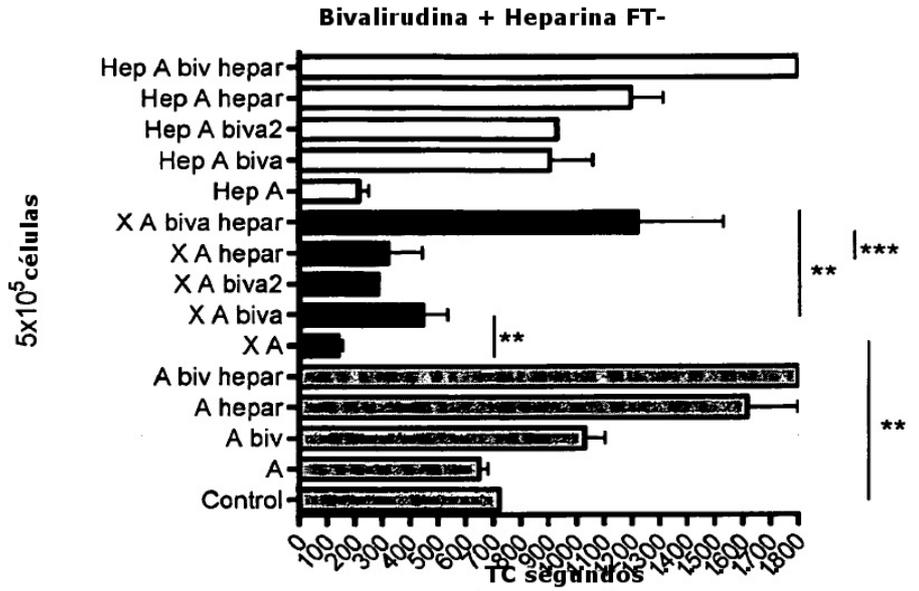


FIG 6

**Sin FT añadido**

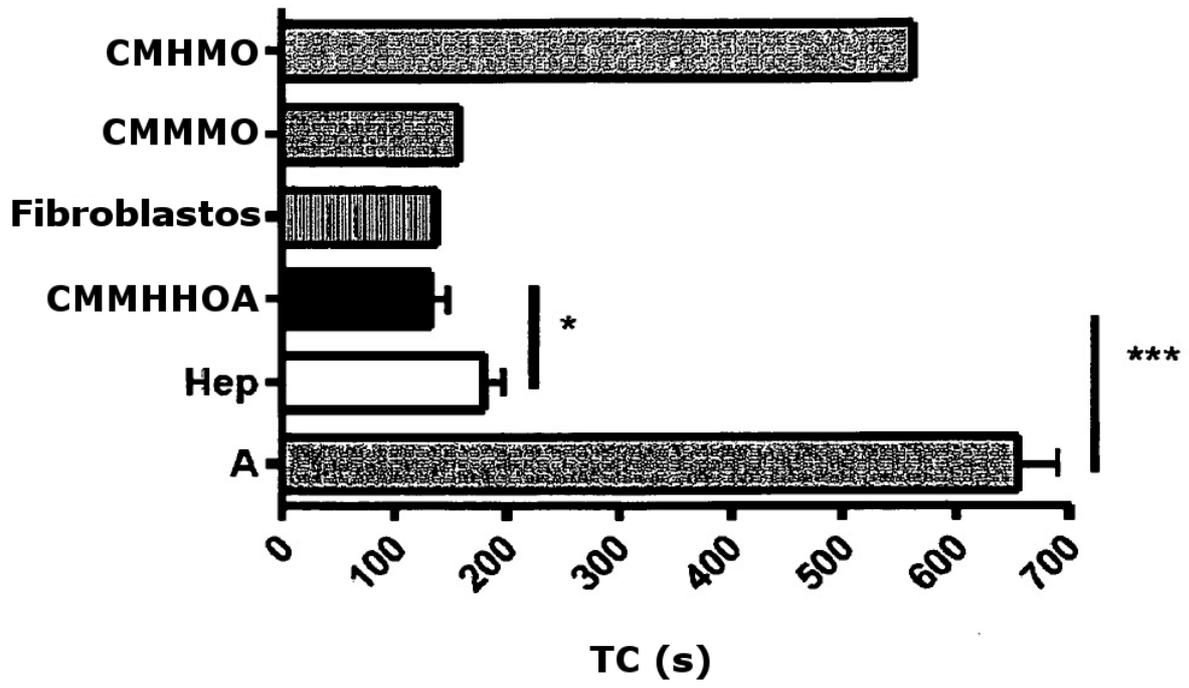


FIG 7

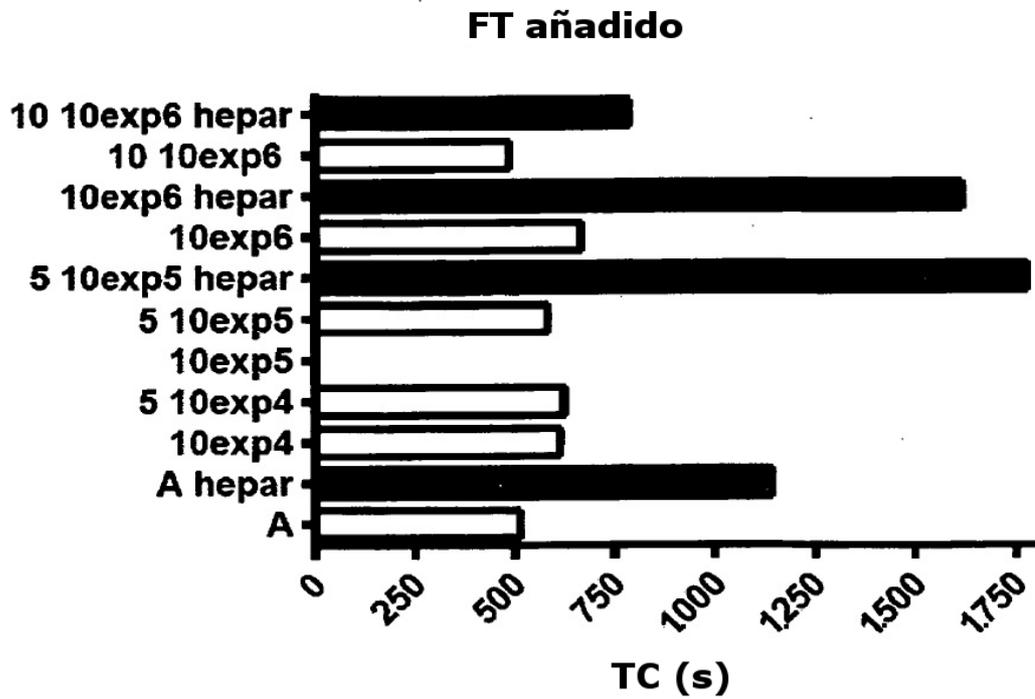
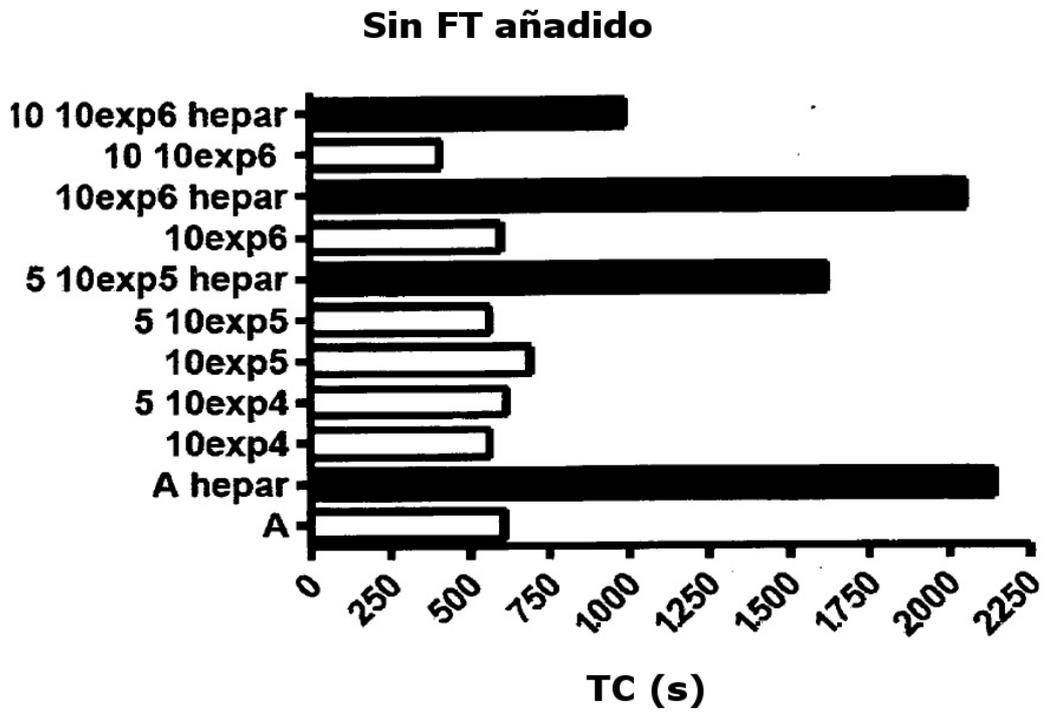


FIG 8

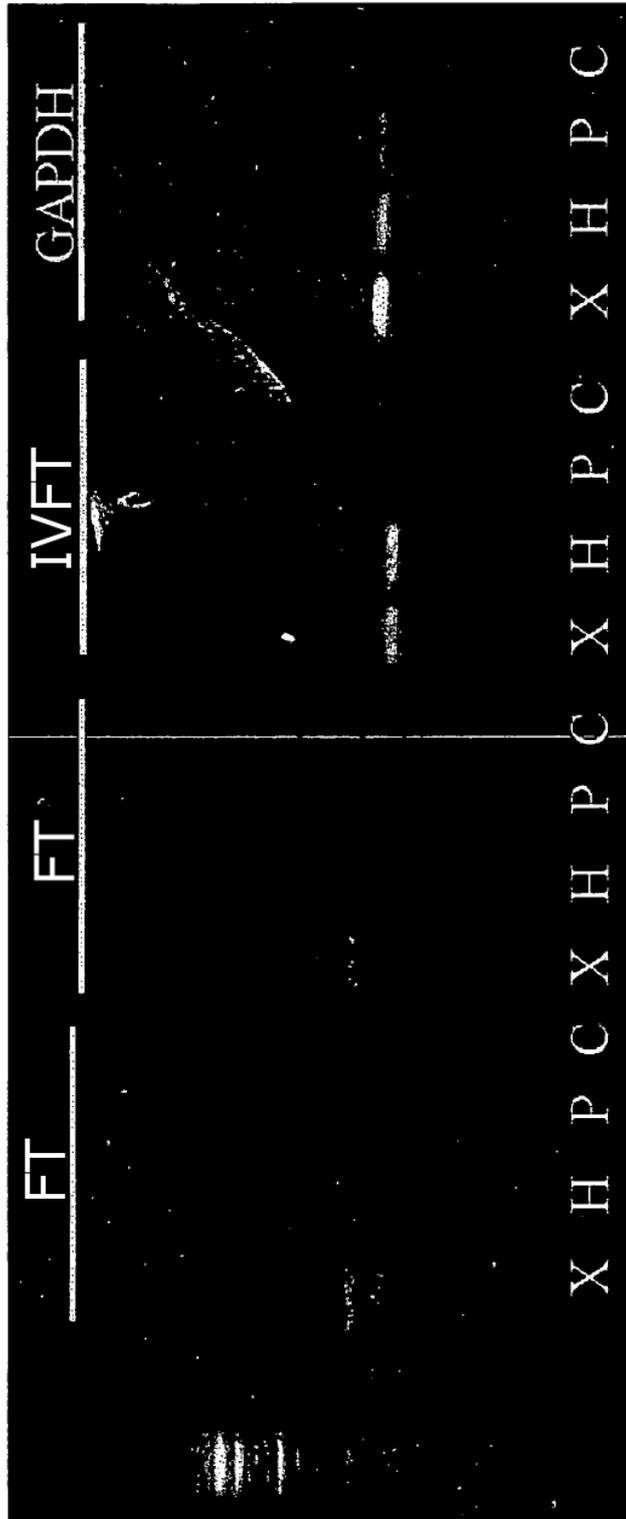


FIG 9

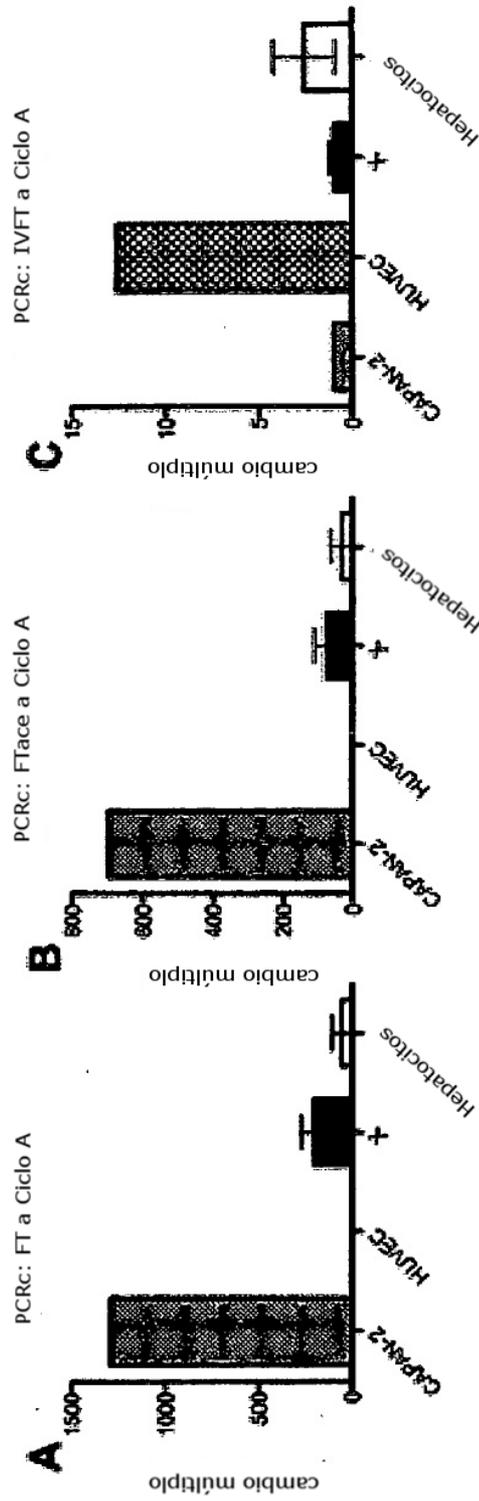


FIG 10

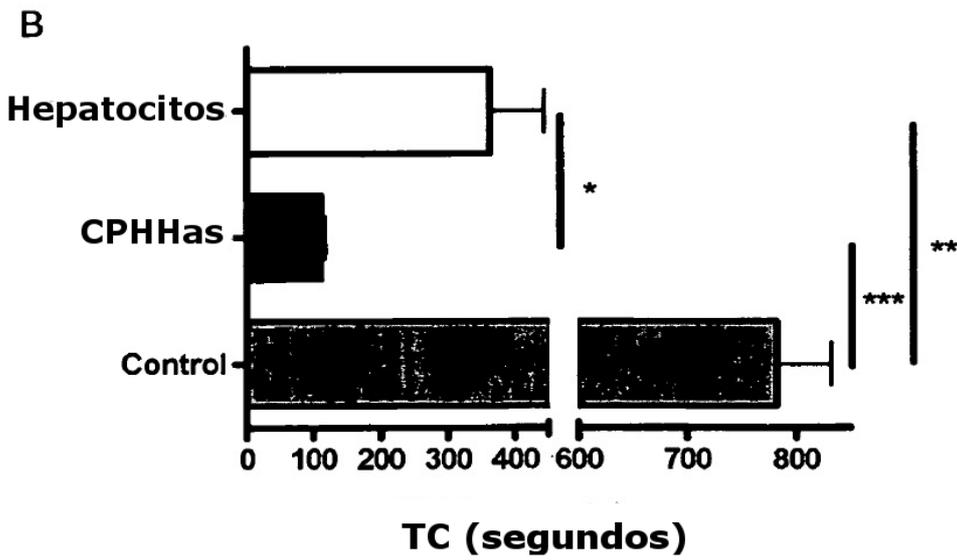
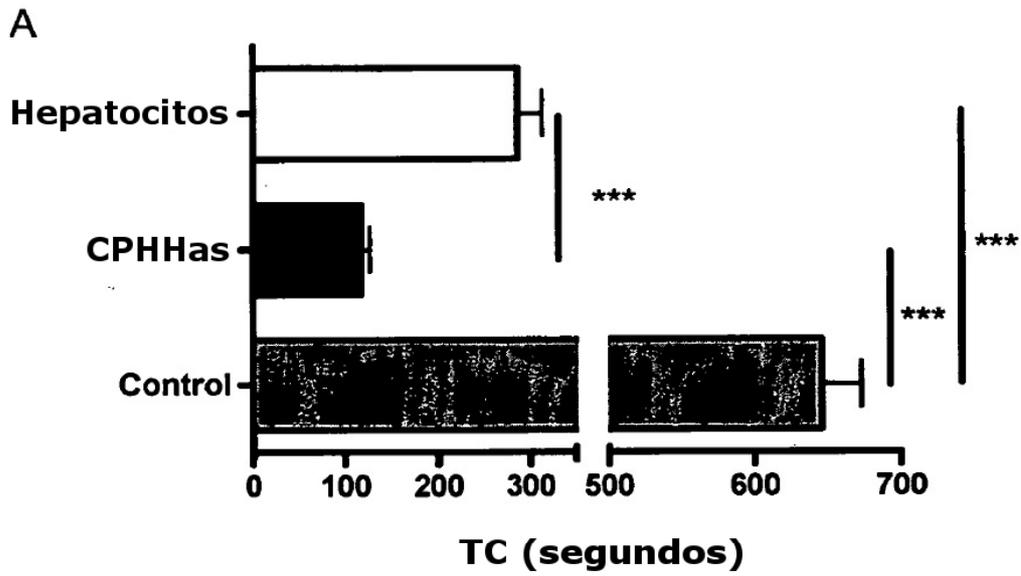


FIG 11

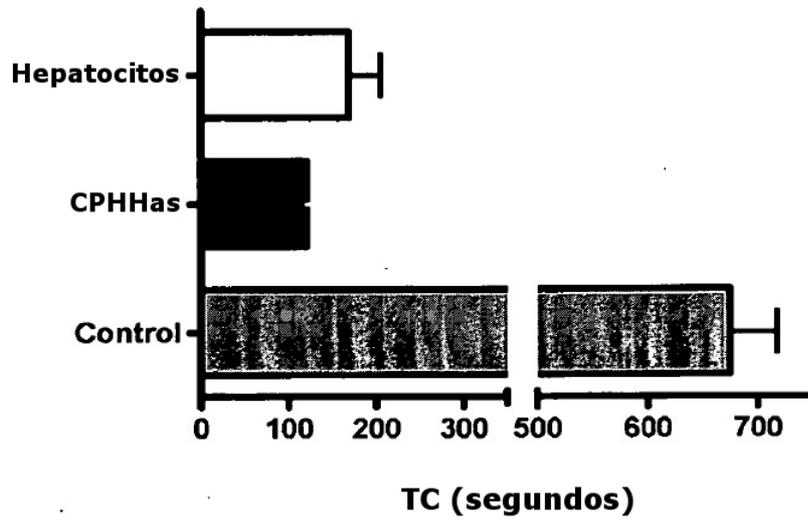


FIG 12

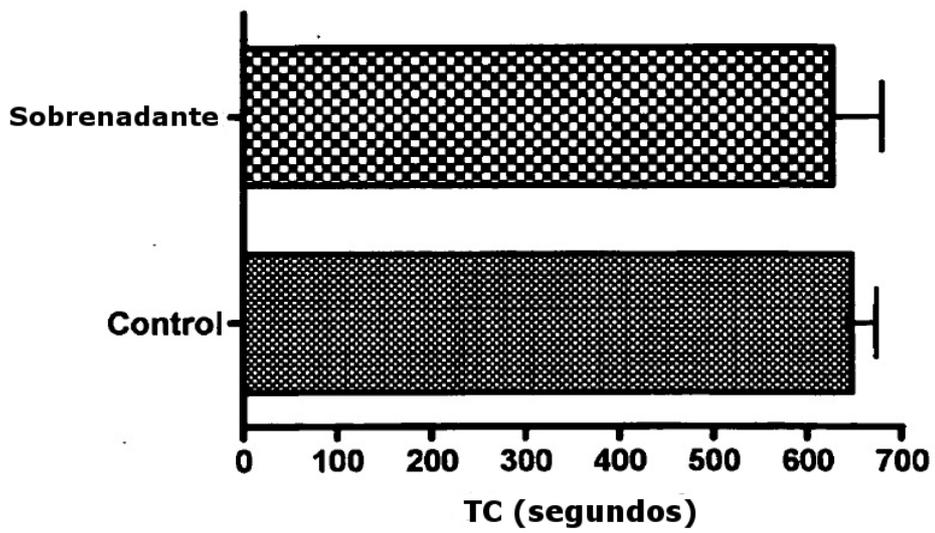


FIG 13

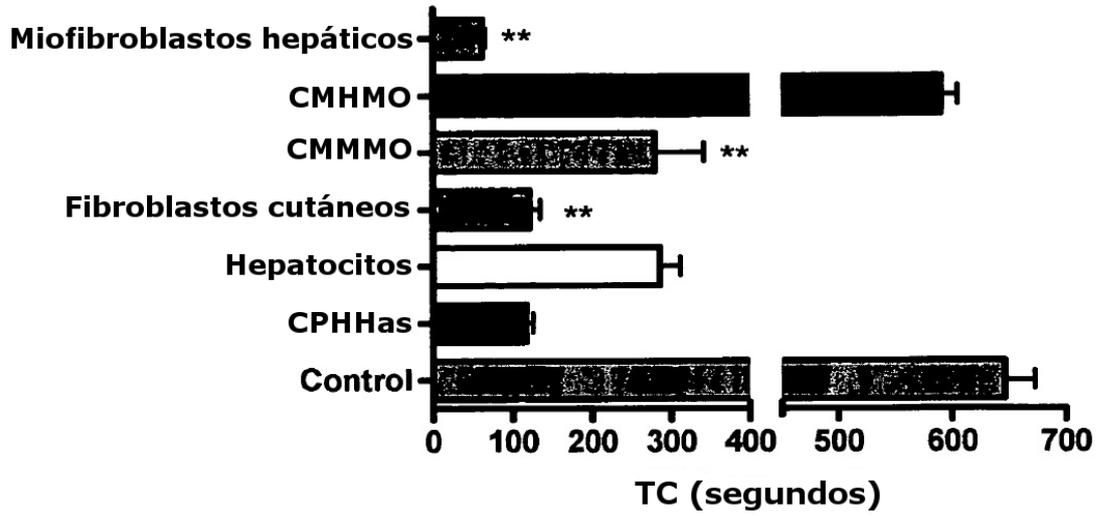


FIG 14

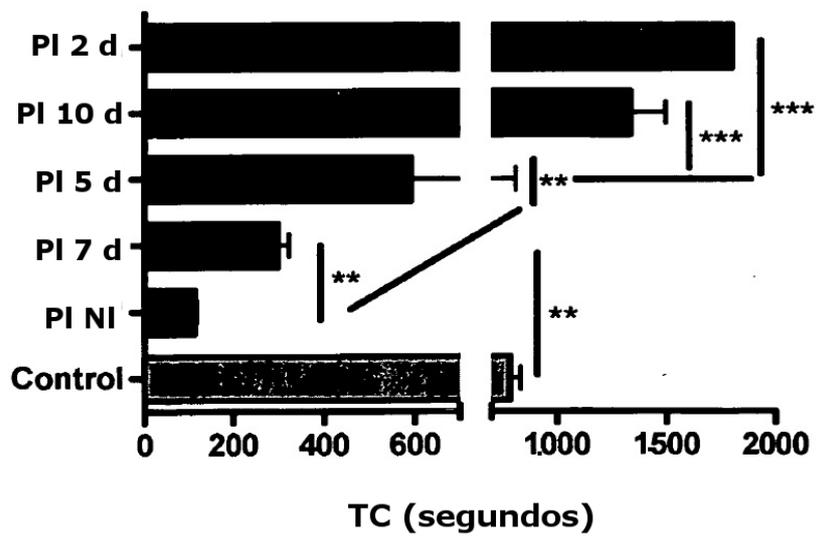


FIG 15

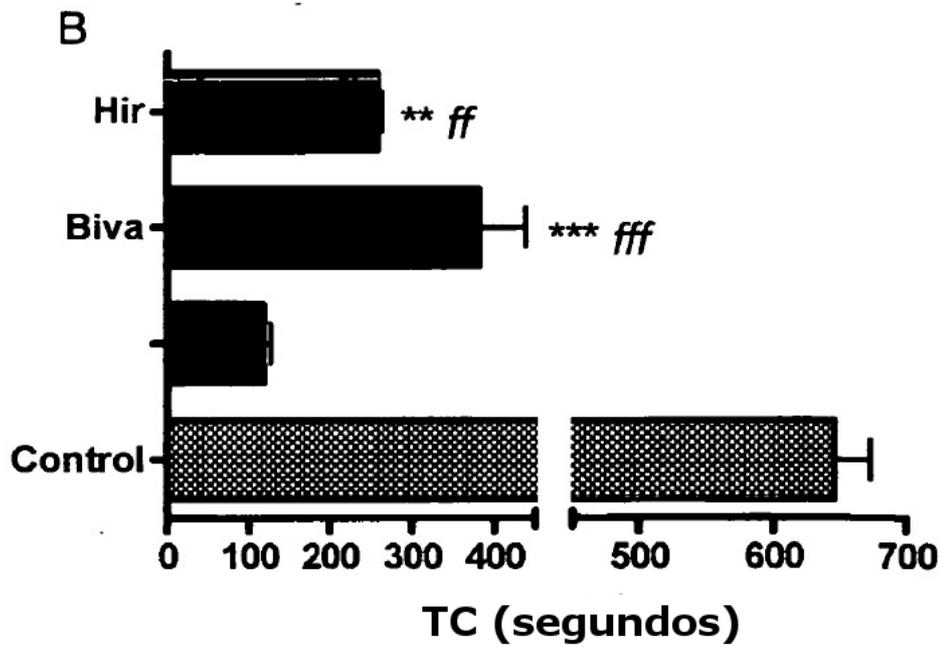
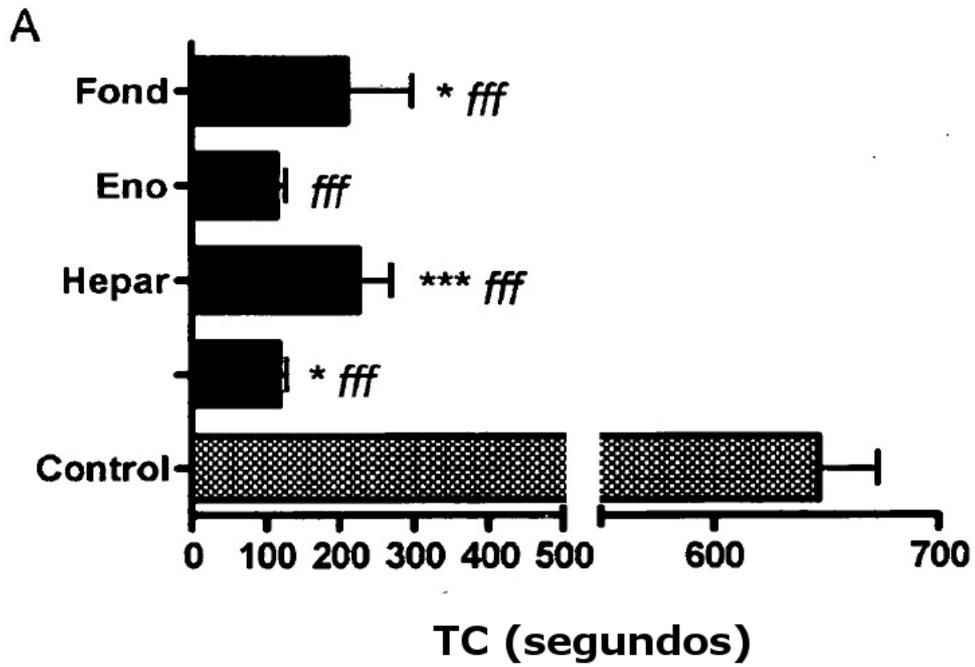
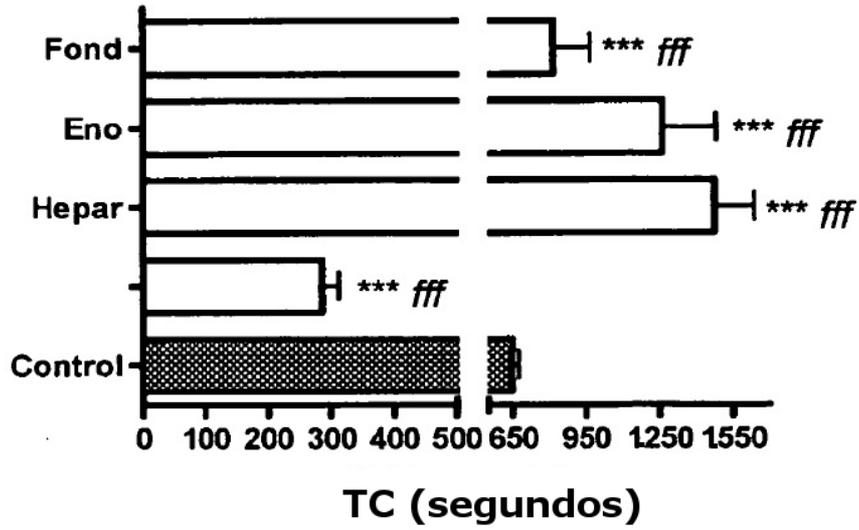


FIG 15

C



D

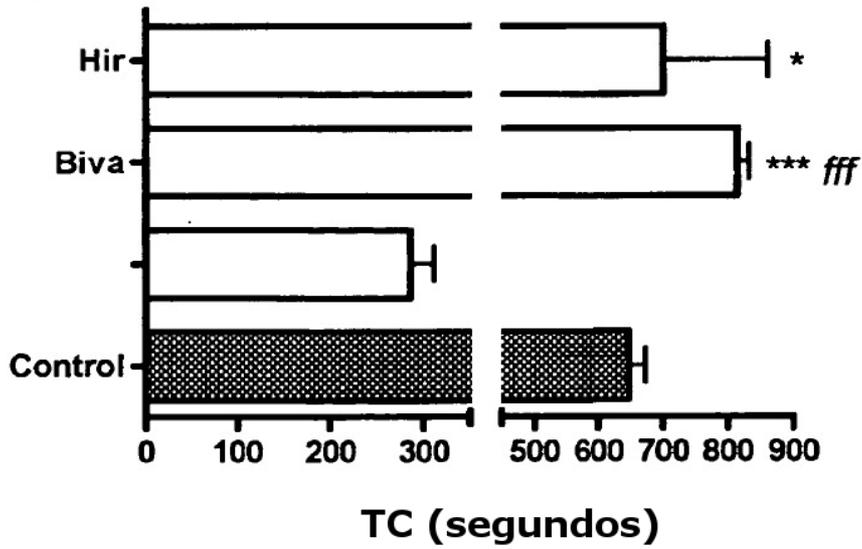
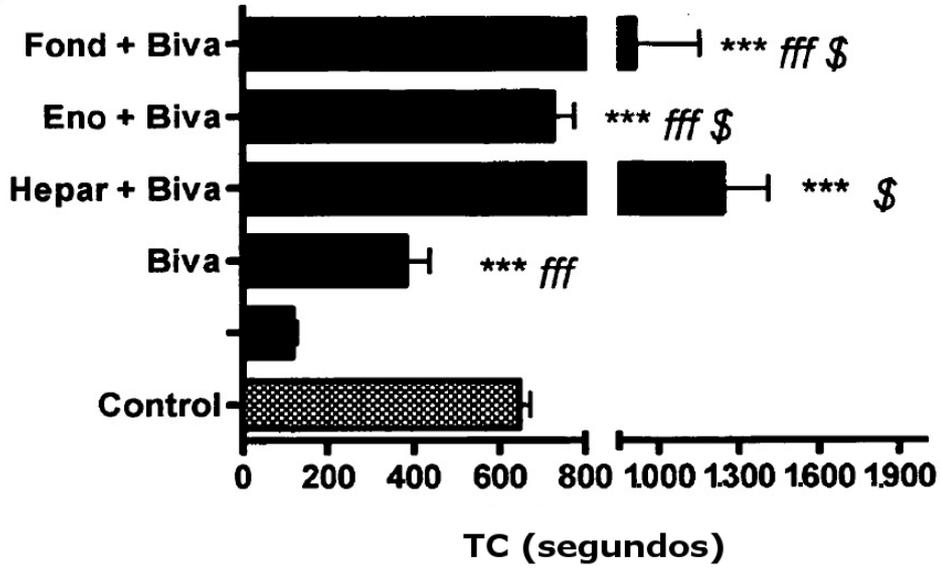


FIG 16

A



B

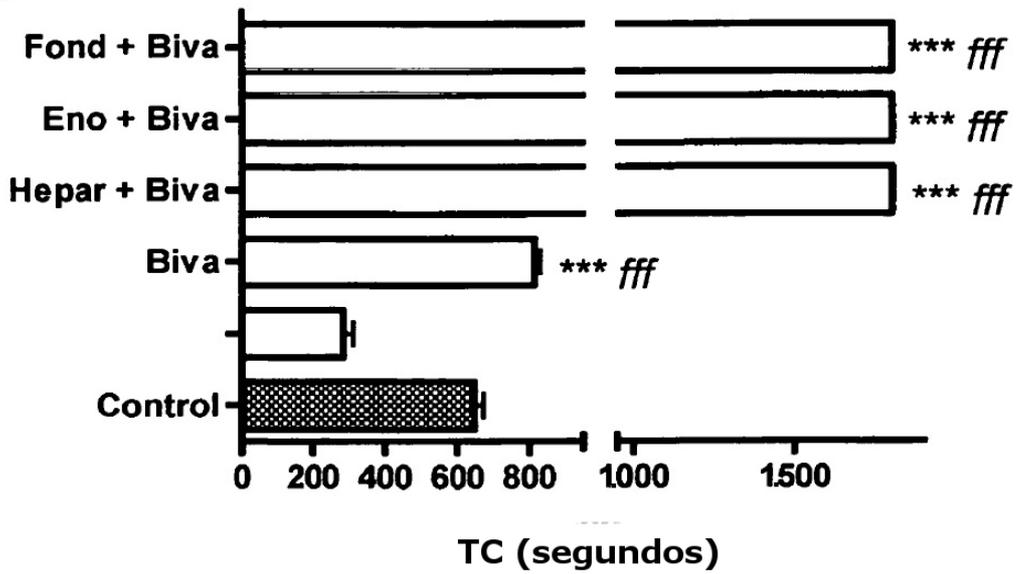


FIG 17

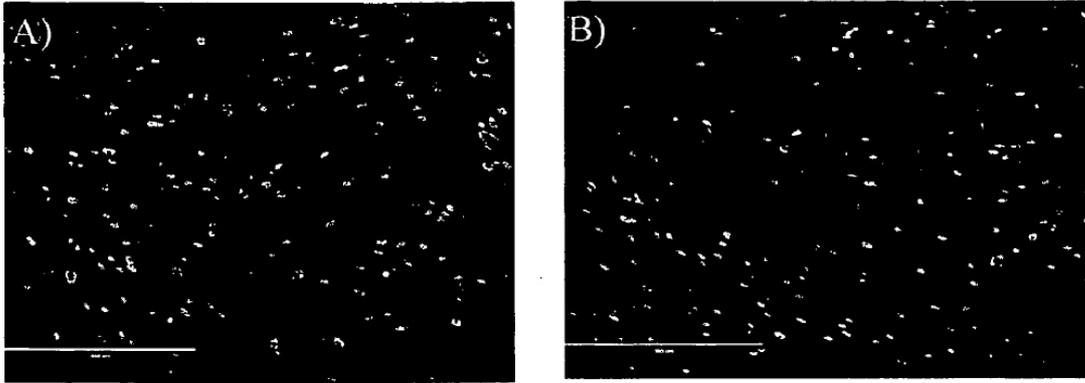


FIG 18

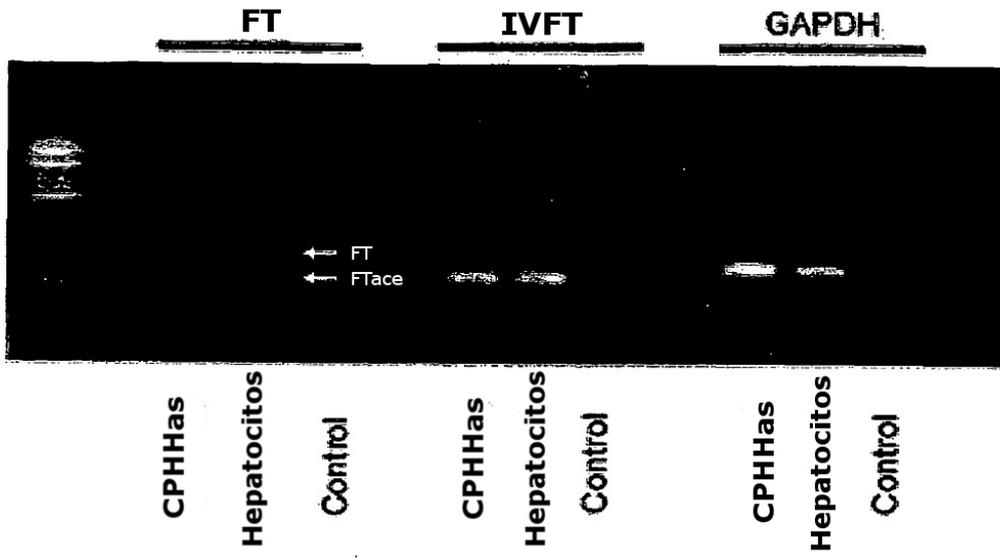


FIG 19

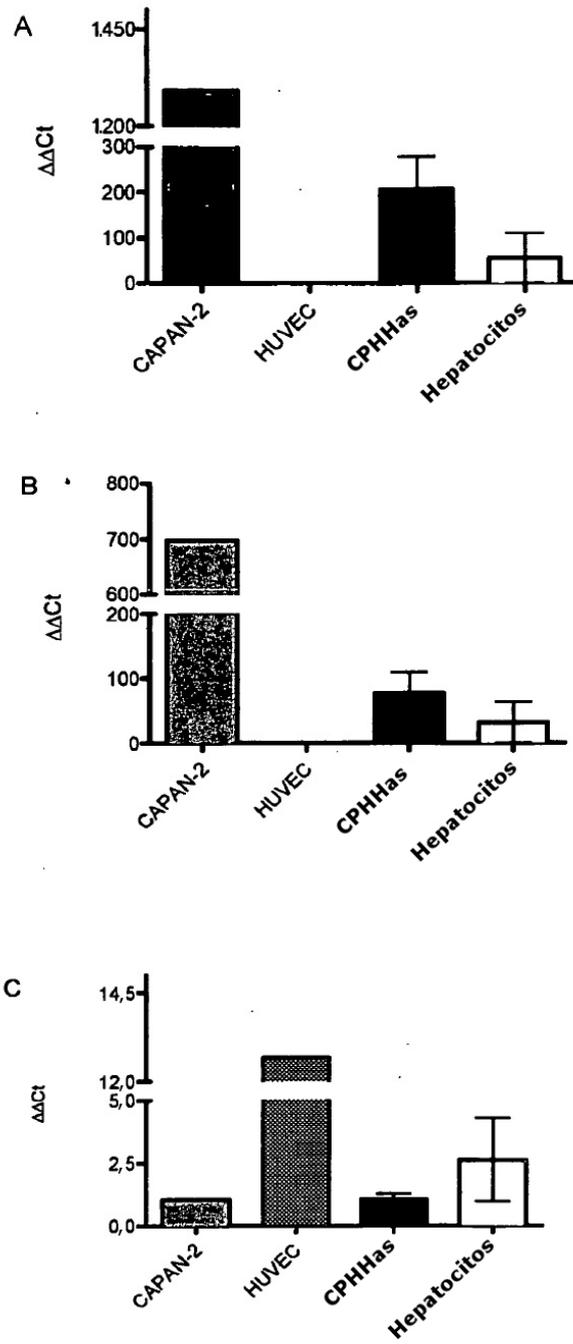


FIG 20

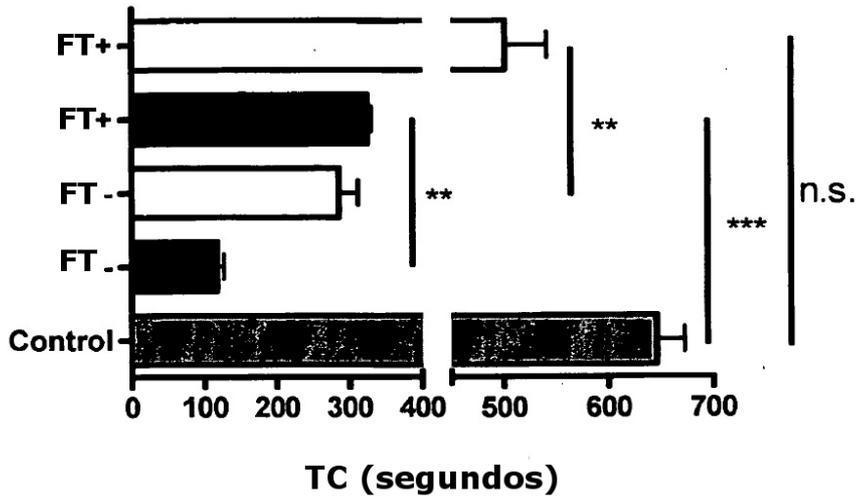


FIG 21

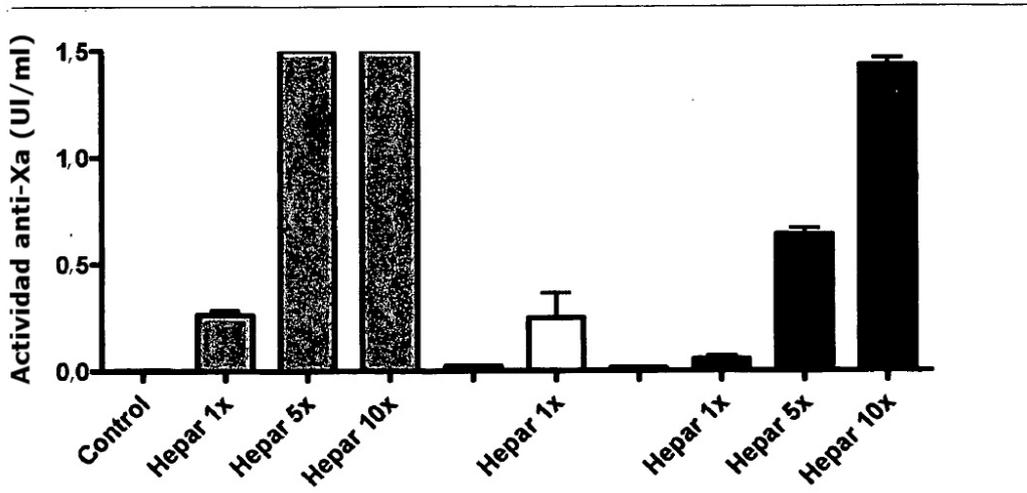


FIG 22

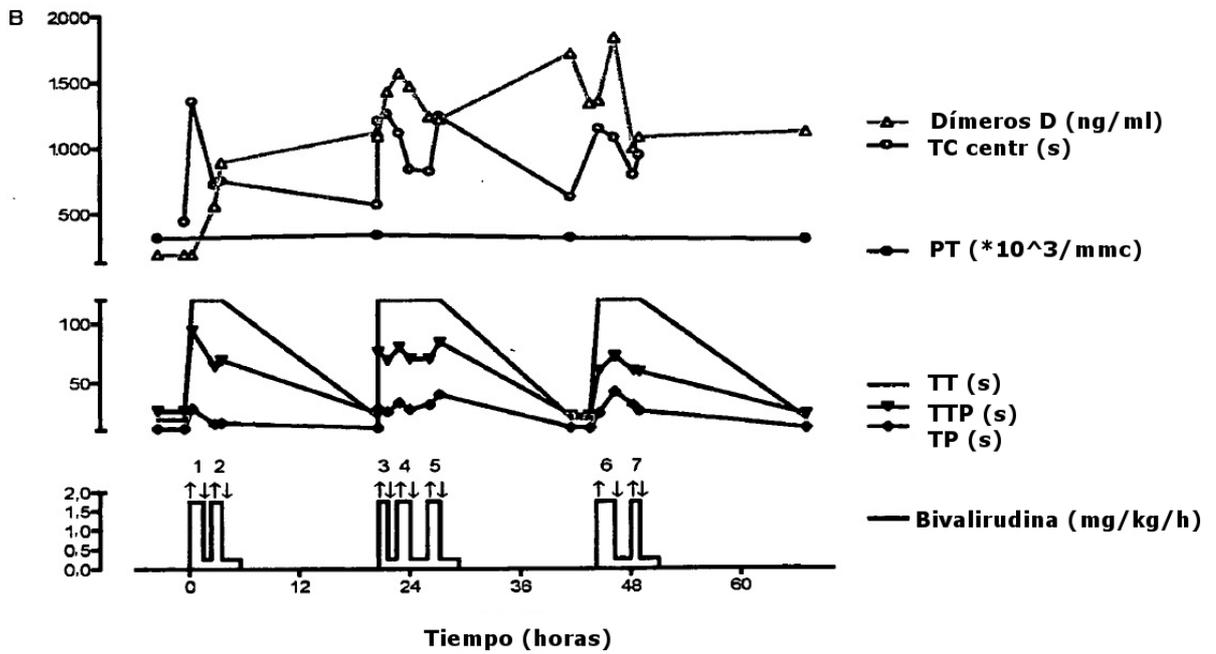
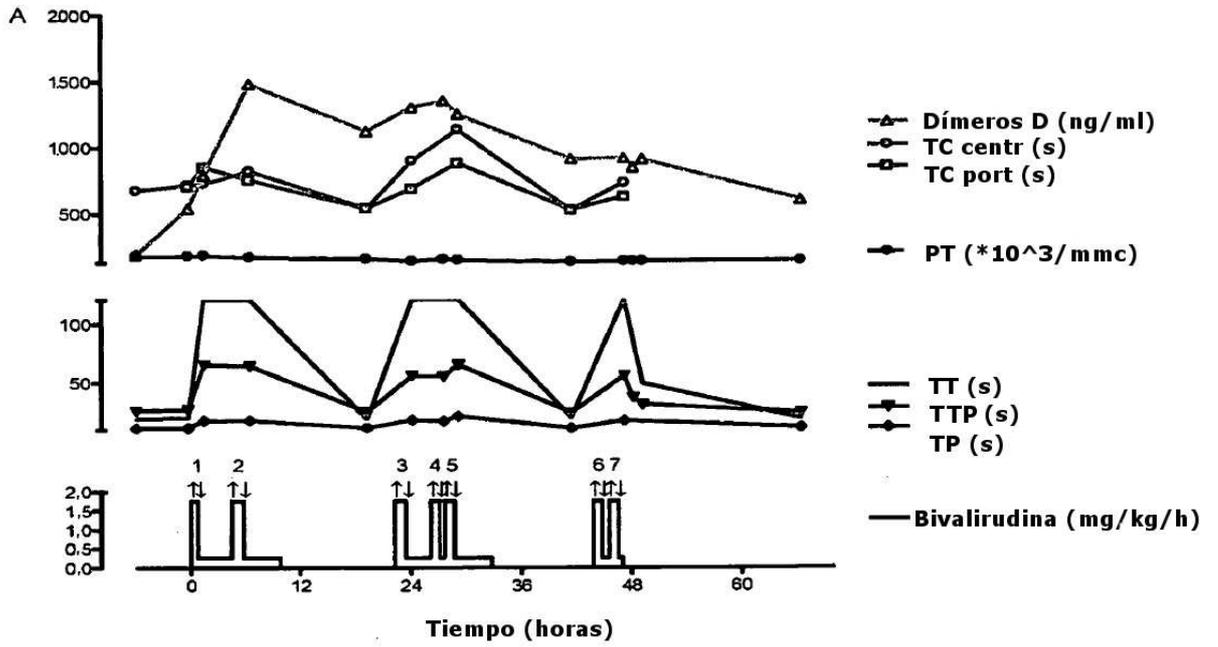
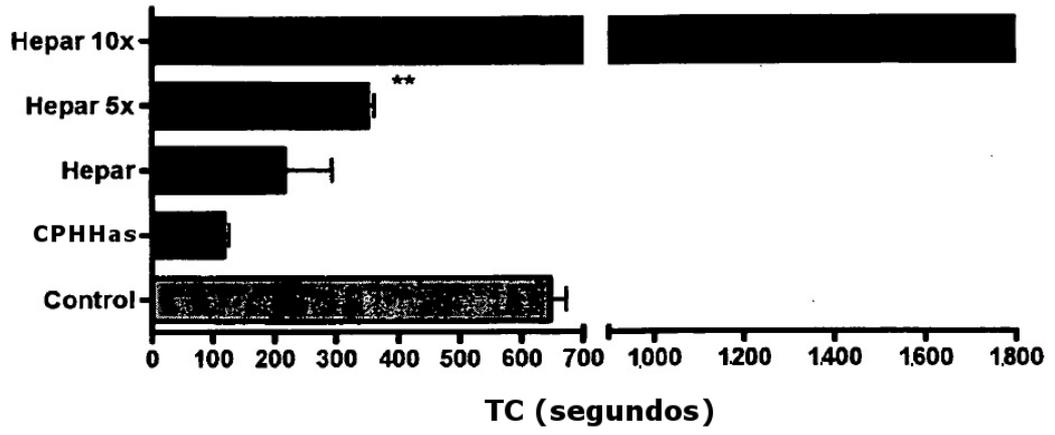


FIG 23

A)



B)

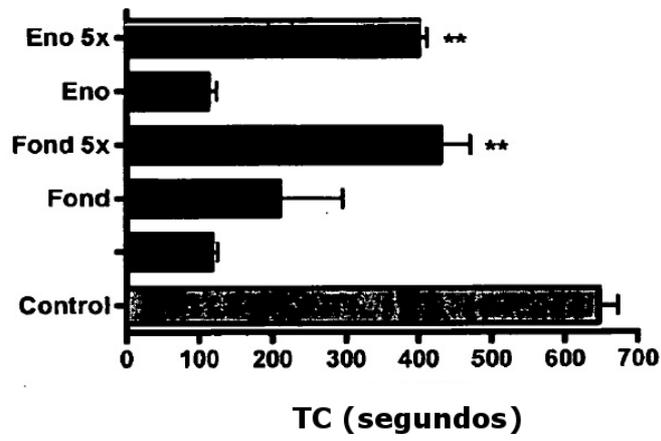


FIG 24

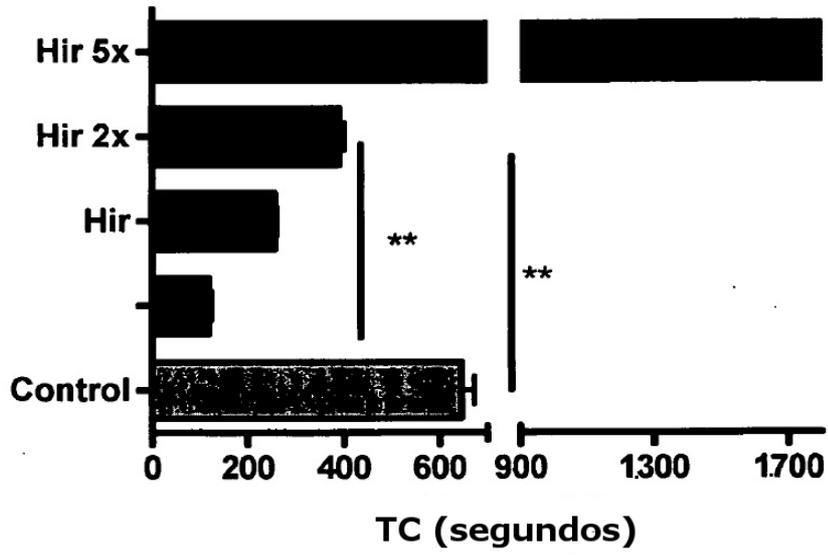
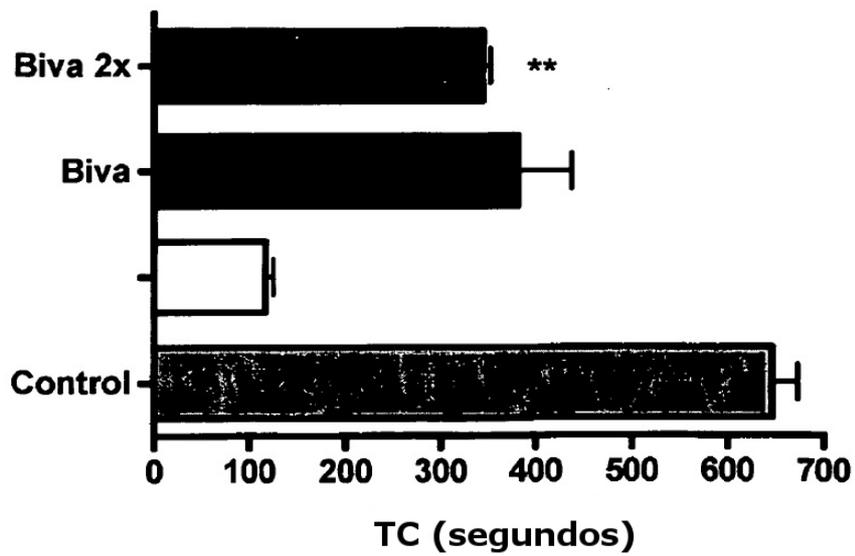


FIG 25



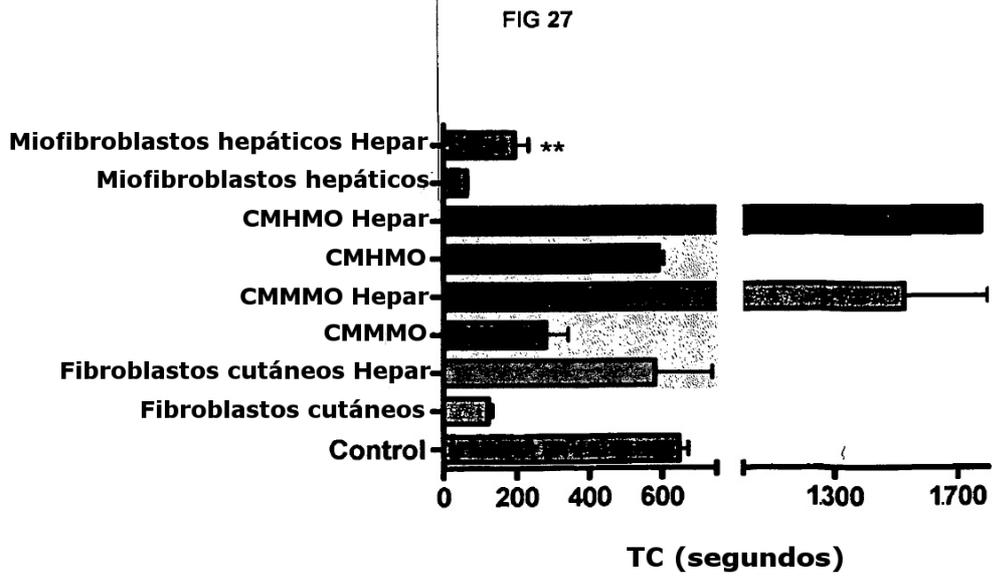
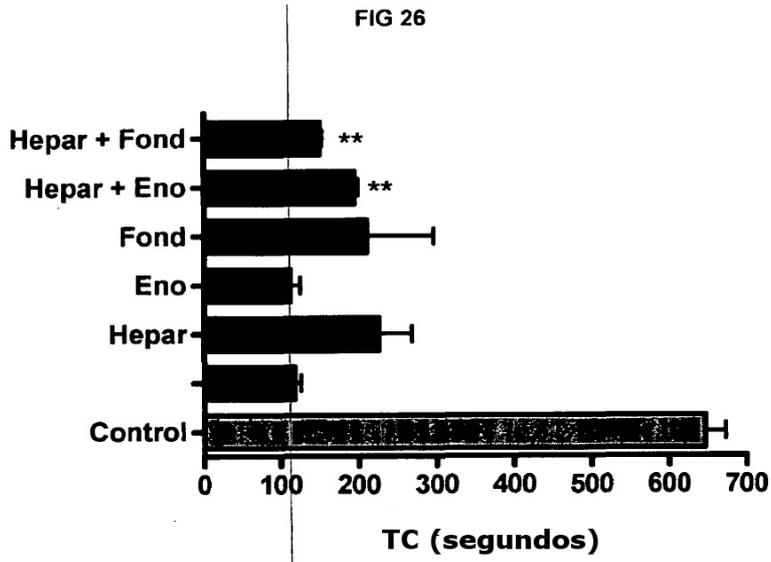


FIG 28

