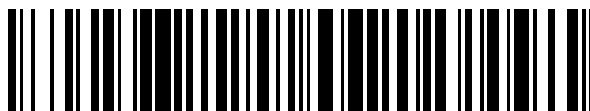


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 802**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/727** (2006.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)  
**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 31/5377** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/EP2012/061534**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110354**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12734831 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2806879**

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

30 Prioridad:  
**25.01.2012 WO PCT/EP2012/051157**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.10.2019**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN (100.0%)  
Place de l'Université 1  
Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:  
**STEPHENNE, XAVIER;  
SOKAL, ETIENNE;  
NAJIMI, MUSTAPHA;  
EECKHOUDT, STÉPHANE y  
HERMANS, CÉDRIC**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 726 802 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 un índice razonable 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 reducirse mediante la serotipificación que determina la compatibilidad entre donante-receptor más adecuada y por el empleo de fármacos inmunosupresores, aunque la idoneidad de estos enfoques puede verse disminuida debido a la urgencia médica en algunos casos. Asimismo, el empleo de por vida de fármacos inmunosupresores representa una carga sobre el paciente receptor en términos de efectos secundarios y cumplimiento.

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 menos problemas. Por ejemplo, las células que se van a trasplantar en ocasiones pueden aislarse u obtenerse del paciente mismo (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 pueden obtenerse células genéticamente coincidentes o al menos compatibles para la mayoría de los receptores.

Cuando se contempla la administración de células a un paciente, puede resultar preferente que las células o los cultivos celulares se seleccionen de forma 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 por el 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 contra los que el paciente contiene anticuerpos anti-HLA preexistentes.

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 de insulina en diabetes mellitus de 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 grados variables de diferenciación como fuente de células para el trasplante celular.

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 sobre el injerto 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 (Stéphenne et al. Liver Transpl., 2007, vol. 13, 599-606).

Por consiguiente, persiste una necesidad urgente en la materia para mejorar el éxito en el trasplante celular y el potencial de injerto 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 mesenquimatosas

humanas tras la administración intravascular en la vasculatura del músculo cremáster en ratones con IDCG por microscopía intravital. Los autores propusieron que la infusión intraarterial de células madre mesenquimatosas puede dar lugar a la oclusión en la vasculatura distal debido al tamaño relativamente grande de las células.

- 5 Akima et al. Am J Transplant., 2009, vol. 9, 1953-40 estudia el impacto de proteína C activada humana recombinante y tirofibrán en reacción inflamatoria mediada por sangre instantánea de exposición de células de islotes alógenicos a sangre humana.

**Compendio de la invención**

10 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 islotes, se observa igualmente en células madre y células progenitoras, tales como células madre mesenquimatosas. 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 potencial de injerto celular y/o sucesos trombóticos. Además, esta actividad procoagulante no puede controlarse por heparina no fraccionada, el anticoagulante convencional para el trasplante de hepatocitos.

20 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 inhibidor de factor Xa y un inhibidor de trombina, preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa y un inhibidor de trombina, proporciona una combinación particularmente eficaz y segura que previene los efectos perjudiciales procoagulantes. Sorprendentemente, aunque la administración concomitante de células con actividad procoagulante, ya sea con un inhibidor del factor Xa, preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa, o un inhibidor de trombina solo, no previene adecuadamente los sucesos trombóticos a concentraciones fisiológicamente aceptables del inhibidor (directo) del factor Xa o inhibidor de la trombina, respectivamente, la combinación del inhibidor del factor Xa junto con el inhibidor de la trombina, preferiblemente el inhibidor directo del factor Xa y el inhibidor de 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 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.

35 Por lo tanto, un aspecto se refiere a una combinación que comprende células con actividad procoagulante, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina.

Otro aspecto se refiere a una combinación que comprende al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos.

45 Cuando proceda, la combinación puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina. Es más, pueden mezclarse o separarse las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y/o al menos un inhibidor de la trombina en dicha combinación. Se divulga asimismo un método para producir dicha combinación que comprende mezclar las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina.

50 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, tal como particularmente a células con actividad procoagulante, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina, o cuando se hace referencia a una combinación que comprende al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y al menos un inhibidor de la trombina, o cuando se refiere a cualquier objeto 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, el al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y el al menos un inhibidor de la trombina pueden incluirse todos en la suspensión celular que se va a administrar. En otro ejemplo, las células y el al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) pueden incluirse en la suspensión celular que se va a administrar, mientras que el 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 aún otro ejemplo, las células y el al menos un inhibidor de la trombina pueden incluirse en la suspensión celular que se va a administrar, mientras que el al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) puede separarse de dicha suspensión celular y se administrará al

5 sujeto simultánea o secuencialmente con dicha suspensión celular. En un ejemplo adicional, tanto el al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) como el 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 (en una única composición o en composiciones separadas) o  
10 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. Por ejemplo, una composición que comprende las células se puede administrar simultáneamente con, antes de o posteriormente al inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa). Una composición que comprende las células también se puede administrar simultáneamente con, antes de o posteriormente al inhibidor de trombina. Por ejemplo, una fracción del inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y/o una fracción del inhibidor de trombina se pueden administrar simultáneamente, antes de y/o después de (una fracción) de las células (composición celular que puede o no comprender una fracción adicional del inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y/o el inhibidor directo de trombina). Las mismas consideraciones también aplican, mutatis mutandis, a composiciones farmacéuticas o kits como se describen en otro sitio en esta especificación posteriormente.

20 Se divulga adicionalmente una composición farmacéutica que comprende (a) una combinación que incluye al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, y (b) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 La composición farmacéutica puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina. Las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y/o al menos un inhibidor de la trombina en dicha composición farmacéutica pueden mezclarse o pueden separarse. Las diferentes combinaciones como se han descrito anteriormente también aplican a las composiciones farmacéuticas. También se divulga un método para producir dicha composición farmacéutica que comprende mezclar las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina, cada uno por separado o en una mezcla, con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 También se proporciona un kit de partes o un artículo de fabricación que comprende una combinación que comprende al menos un inhibidor del factor Xa, que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, y que comprende además de forma opcional uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 El kit de partes o artículo de fabricación puede configurarse para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina. Las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y/o al menos un inhibidor de la trombina en dicho kit de partes o artículo de fabricación pueden mezclarse o separarse, en particular, pueden separarse, por ejemplo, están contenidas en envases separados. Se divulga además un método para producir dicho kit de partes o artículo de fabricación que comprende incluir las células, al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa), y al menos un inhibidor de la trombina, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en un kit de partes o un artículo de fabricación. También se proporciona el kit de partes o artículo de fabricación para su uso en todas y cada una de las indicaciones descritas en el presente documento.

50 Se divulgan además todos y cada uno de los siguientes aspectos:

- 55 - una combinación que comprende al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, al menos un inhibidor de la trombina, y células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, para su uso como medicamento;
- 60 - una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es 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;
- 65 - uso de una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina y

al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para el trasplante de dichas células;

- 5 - una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es 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 trombosis o complicaciones trombóticas, en particular trombosis o complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de dichas células;
- 10 - uso de una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trombosis o complicaciones trombóticas, en particular trombosis o complicaciones trombóticas causadas por el trasplante de dichas células;
- 15 - una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es 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*;
- 20 - uso de una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es 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*;
- 25 - uso de una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es 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*;
- 30 - uso de una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina para inhibir la actividad procoagulante de dichas células *in vitro*;
- 35 - un método para inhibir *in vitro* la actividad procoagulante de células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas y miofibroblastos hepáticos, que comprende proporcionar una combinación que comprende dichas células, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina;
- 40 - un método para inhibir *in vitro* la actividad procoagulante de células seleccionadas del 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 inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y no es un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de la trombina.
- 45

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, tal como particularmente células con actividad procoagulante en una solución acuosa que contiene al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa); (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, tal como en particular células con actividad procoagulante en una solución acuosa que contiene al menos un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa); (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.

60 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, tal como en particular células procoagulantes, como se enseña en el presente documento, en el que la distribución se adapta para 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, tal como, por vía sistémica, tópica, en un órgano o tejido.

5 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 la coagulación o formación de coágulos. La actividad procoagulante puede determinarse convenientemente empleando cualquier ensayo de coagulación conocido, incluyendo, entre otros, tromboelastometría.

10 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 ( $p < 0,05$  aplicando una prueba adecuada 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:

15 Se pueden realizar mediciones en un analizador ROTEM® delta (Pentapharm, Múnich, Alemania). ROTEM® evalúa la cinética y 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 completa en un vaso precalentado a 37 °C. Las células suspendidas ( $5 \times 10^5$ ) se añaden posteriormente a la sangre completa (control negativo: igual volumen 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 (tal como, Innovin, Siemens, Marburgo, Alemania) diluido en tampón Owren (por ejemplo, disponible en Clin-Tech Ltd, RU) a la mezcla de células-sangre seguido por la adición 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.

20 Como se describe en el presente documento, las células descritas en el presente documento, tal como en particular células con actividad procoagulante, pueden ser de cualquier origen y/o estado de diferenciación. Las células descritas en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, se seleccionan del grupo que consiste en células madre y células progenitoras. Las células descritas en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, pueden ser células madre mesenquimatosas. Preferentemente, además, las células que se pretenden en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, son células progenitoras o madre derivadas de hígado adulto.

35 En una realización, las células que se pretenden en el presente documento, tales como las células con actividad procoagulante, son células madre de hígado humano derivadas de 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 de hígado humano derivadas de adulto (ADHLSC) 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/LMBP) con número de acceso LMBP 6452CB.

40 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 a células maduras hepáticas, células productoras de insulina, células osteogénicas y 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 a células maduras hepáticas, células productoras de insulina, células osteogénicas y células endoteliales, descritas en el mismo; aún más particularmente las células madre hepáticas humanas (HLSC) descritas en Herrera et al. Stem Cells, 2006, vol. 24, 2840-50.

55 Sin desear estar unido a teoría alguna, se considera que la expresión del factor tisular (también conocido como factor tisular plaquetario, factor III, tromboquinasa o CD142) por 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. Preferiblemente las células con actividad procoagulante expresan factor tisular constitutivamente.

60 Los inventores se han percatado además que ciertas células procoagulantes como se usa en el presente documento pueden comprender un componente con actividad procoagulante independiente de la expresión del factor tisular

(FT) por 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 sangre o plasma normal cuando se bloquea la actividad del FT, tal como mediante preincubación de las células con anticuerpo anti-FT. Sin desear estar unido 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.

Sin querer estar unido por ninguna teoría, los inventores hipotetizan que las composiciones según la invención, que comprenden tanto un inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) como un inhibidor de trombina, pueden ser, al menos parcialmente, responsables para los efectos actualmente reivindicados sobre células procoagulantes mediante la acción sinérgica del inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y el inhibidor de trombina sobre la expresión del factor tisular y/o acción que se modula diferentemente, y posiblemente independientemente, por cada uno del inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) y el inhibidor de trombina.

Un inhibidor del factor Xa como se pretende a lo largo de esta especificación es un agente capaz de inhibir directa o indirectamente o prevenir la conversión mediada por el factor Xa de protrombina a trombina.

En aspectos y realizaciones tales como combinaciones, composiciones, kits, métodos y usos divulgados a lo largo de esta especificación, un inhibidor del factor Xa indica "un inhibidor del factor Xa diferente de un activador de antitrombina" o "un inhibidor del factor Xa que no es un activador de antitrombina".

Los aspectos y realizaciones tales como ciertas combinaciones, composiciones, kits, métodos y usos divulgados a lo largo de esta especificación en particular emplean ventajosamente un inhibidor directo del factor Xa. Un inhibidor directo del factor Xa como se pretende a lo largo de esta especificación es un agente capaz de unirse directamente al factor Xa e inhibir o prevenir la conversión de protrombina a trombina.

El uso de un inhibidor directo del factor Xa puede ofrecer ventajas comparado con el uso de un inhibidor indirecto del factor Xa, en que un inhibidor indirecto del factor Xa puede tener múltiples dianas y, por lo tanto, su uso puede producir posiblemente efectos inespecíficos.

En una realización, el inhibidor directo del factor Xa se selecciona del grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, betrixibán, edoxabán, otamixabán, YM466, DX9065a, razaxabán, darexabán, letaxabán, LY517717, GW813893, YM-60828, erixabán, JTV-803, KFA-144, DPC-423, RPR-209685, MCM-09 y antistasina, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en rivaroxabán, apixaban, betrixiban, edoxaban, otamixaban, YM466, lo más preferiblemente rivaroxabán.

Otros aspectos y realizaciones tales como ciertas combinaciones, composiciones, kits, métodos y usos divulgados a lo largo de esta especificación pueden emplear un inhibidor indirecto del factor Xa. Los inhibidores indirectos del factor Xa incluyen, por ejemplo, sustancias que inhiben la conversión del factor X a factor Xa, o que de otra manera inhiben el factor Xa sin unirse directamente al factor Xa.

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.

En una realización, el inhibidor de la trombina se selecciona del grupo que consiste en bivalirudina, hirudina, lepirudina, desirudina, argatrobán, melagatrán, ximalelagatrán, y dabigatrán, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en bivalirudina, e hirudina, incluso más preferiblemente bivalirudina. Ventajosamente, la bivalirudina tiene una semivida comparativamente breve 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 objeto de las reivindicaciones adjuntas se incorpora específicamente por la presente en la presente memoria descriptiva.

#### Breve descripción de las figuras:

**Figura 1 (A)** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5%. No se induce coagulación en ausencia de recalcificación. Hepatocitos (blanco), hALPC (negro),

- Control (albúmina) (gris). Hepatocitos frente a hAPLC  $p < 0,001$ ; hepatocitos frente a control  $p < 0,001$ ; hALPC frente a control  $p < 0,01$ ; hALPC frente a hepatocitos frente a control: prueba de Kruskal-Wallis, \*\*\*  $p < 0,001$ . (B) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de plasma (300  $\mu$ l) obtenido de sangre incubado en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5%.
- 5 Hepatocitos (blanco), hALPC (negro), Control (albúmina) (gris). Hepatocitos frente a hAPLC  $p < 0,05$ ; hepatocitos frente a control  $p < 0,01$ ; hALPC frente a control  $p < 0,01$ ; hALPC frente a hepatocitos frente a control: prueba de Kruskal-Wallis, \*\*\*  $p < 0,001$ . La actividad procoagulante (APC) de las células (hepatocitos y hALPC) en sangre y plasma es comparable cuando no se añade Innovin.
- 10 **Figura 2** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, sin factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5%. No se induce coagulación en ausencia de recalcificación. Hepatocitos (blanco), hALPC (negro).
- 15 **Figura 3** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia de sobrenadante de cultivo de hAPLC. No se induce coagulación en ausencia de recalcificación.
- 20 **Figura 4** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM, tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia o no de hALPC, hepatocitos, fibroblastos de piel, células madre mesenquimatosas de médula ósea (BMMSC), células madre hematopoyéticas de médula ósea (BMHSC), miofibroblastos de hígado suspendidos en albúmina humana al 5%. Fibroblastos frente a control  $p < 0,01$ ; BMMSC frente a control  $p < 0,01$ ; miofibroblastos de hígado frente a control  $p < 0,01$ .
- 25 **Figura 5** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de plasma (300  $\mu$ l) 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%. hALPC (negro), control (albúmina) (gris). PI nl (plasma normal) frente a PI 7 d,  $p < 0,01$ ; PI 7 d frente a control,  $p < 0,01$ ; PI nl frente a PI 5 d,  $p < 0,01$ ; PI nl frente a PI 10 d,  $p < 0,001$ ; PI nl frente a PI 2 d,  $p < 0,001$ .
- 30 **Figura 6 (A)** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia o no de hALPC 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. hALPC (negro), control (albúmina) (gris). \* en comparación con hALPC. f en comparación con el control. (B) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia o no de hALPC suspendidas en albúmina humana al 5%. Se añadió bivalirudina (Biva) o hirudina (Hir) a la sangre de manera extemporánea. hALPC (negro), control (albúmina) (gris). \* en comparación con hALPC. f en comparación con el control. (C) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) 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  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia o no de hepatocitos suspendidos en albúmina humana al 5%. Se añadió bivalirudina (Biva) o hirudina (Hir) a la sangre de manera extemporánea. Hepatocitos (blanco), control (albúmina) (gris). \* en comparación con los hepatocitos. f en comparación con el control.
- 35 **Figura 6 (E)** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia o no de hALPC 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 se añadió bivalirudina (Biva) a la sangre de manera extemporánea. hALPC (negro), control (albúmina) (gris). \* en comparación con hALPC. f en comparación con el control. \$ en comparación con bivalirudina. (F) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) 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 se añadió bivalirudina (Biva) 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.
- 40 **Figura 6 (G)** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20  $\mu$ l), de sangre completa citratada (300  $\mu$ l) en presencia o no de hALPC suspendidas en albúmina humana al 5% con o sin heparina (Hepar). Se añadió enoxaparina (Eno) o fondaparinux (Fond) extemporáneamente a la sangre con células suspendidas o no en heparina hALPC (negro), control (albúmina) (gris). Control frente a hALPC Hepar + Eno,  $p < 0,01$ ; Control frente a hALPC Hepar + Fond,  $p < 0,01$ .
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



**Figura 6 (H)** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de hALPC, hepatocitos, fibroblastos cutáneos, células madre mesenquimatosas de médula ósea (BMMSC), células madre hematopoyéticas de médula ósea (BMHSC), miofibroblastos hepáticos suspendidos en albúmina humana al 5 % con o sin heparina (10 UI/ml) (Hepar). Fibroblastos Hepar frente a control n.s.; miofibroblastos hepáticos Hepar frente a control, p <0,01.

**Figura 6 (I)** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) 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.

**Figura 7** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de células progenitoras de hígado adulto humano (hAPLC) suspendidas en albúmina humana al 5% con rivaroxabán. La combinación de fármacos anticoagulantes se obtuvo se añadió cuando bivalirudina (Biva) extemporáneamente a la sangre. hAPLC (negro), Control (albúmina) (gris). \* comparado con hALPC. f comparado con control. \$ comparado con bivalirudina.

**Figura 8** Se realizó inmunofluorescencia para FT en hALPC (A) colocadas en cubreobjetos y fijadas por paraformaldehído (aumentos 20x). Los núcleos se revelaron por DAPI (tinción azul). (B) Control negativo (sin anticuerpo primario).

**Figura 9** Expresión del ARNm del factor tisular y del inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) en hALPC y hepatocitos evaluados por RT-PCR convencional. Factor tisular (FT), factor tisular con ajuste alternativo (FTaa) inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (control técnico).

**Figura 10** Expresión del ARNm del factor tisular (FT y FTaa) e IVFT de hALPC y hepatocitos evaluados por PCR en tiempo real. Expresión semicuantitativa del ARNm del gen del FT (A), forma con ajuste alternativo FTaa (B) y gen de IVFT (C) entre las células hALPC y hepatocitos. Las células CAPAN-2 y HUVEC son el control positivo para FT, y FTaa e IVFT, respectivamente.

**Figura 11** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de células suspendidas en albúmina humana al 5 % tras la incubación de las células con anticuerpo contra FT (FT+) o no (TF-). Hepatocitos (blanco), hALPC (negro), control (albúmina) (gris). hALPC TF- frente a hALPC TF+, p <0,01; hepatocitos TF- frente a hepatocitos TF+, p <0,01; hALPC FT+ frente a control p <0,001; hepatocitos frente a control no significativo.

**Figura 12** 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, se midió la actividad anti-Xa (UI/ml) en plasma obtenido tras la centrifugación de la sangre. hALPC (negro), hepatocitos (Hep) (blanco), control (gris).

**Figura 13 (A)** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de hALPC (negro) suspendidas en albúmina humana al 5 % con o sin heparina (Hepar) a varias concentraciones (10 UI/ml de hepar, 50 UI/ml de hepar 5x, 100 UI/ml de hepar 10x). Control (albúmina) (gris). Control frente a hALPC Hepar 5x, p <0,01. (B) Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de hALPC (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 frente a hALPC Fond 5x, p <0,01; control frente a hALPC Eno 5x, p <0,01; Fond frente a Fond 5x, n.s.; Eno frente a Eno 5x, n.s.

**Figura 14** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de hALPC suspendidas en albúmina humana al 5 %. Se añadió la concentración aumentada de hirudina (Hir) (2x (Hir 2x) o 5x (Hir 5x)) extemporáneamente a la sangre. hALPC (negro), control (albúmina) (gris). Control frente a hALPC Hir 2x, p <0,01; hALPC frente a hALPC Hir 2x, p <0,01; hALPC Hir frente a hALPC Hir 2x, n.s.

**Figura 15** Tiempo de coagulación (TC) evaluado por ROTEM tras recalcificación, con factor tisular añadido (ExTem, 20 µl), de sangre completa citratada (300 µl) en presencia o no de hALPC suspendidas en albúmina humana al 5 %. Se añadió la concentración aumentada de bivalirudina (Biva) (2x (Biva 2x)) a la sangre de manera extemporánea. hALPC (negro), control (albúmina) (gris). Control frente a hALPC Biva 2x, p <0,01.

#### Descripción detallada

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

Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto de" como se utilizan en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o no concluyentes y no excluyen 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 puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidas dentro de los respectivos intervalos, así como los puntos finales indicados.

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., cualesquiera  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  o  $\geq 7$  etc. de dichos miembros, y hasta todos los miembros mencionados.

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 +/- 10 % o menos, preferentemente +/- 5 % o menos, más preferentemente +/- 1 % o menos, y aún más preferentemente +/- 0,1 % o menos de y desde el valor especificado, en la medida de dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo la invención divulgada. Ha de entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" se divulga por sí mismo también 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, tienen el significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Por medio de orientaciones adicionales, pueden incluirse definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

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

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

Las células con actividad procoagulante que se pretenden en el presente documento pueden desencadenar la cascada de coagulación en cualquier etapa, mediante lo cual, 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, cuya expresión 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 en fibrina mediada por trombina. El término "células con actividad procoagulante" puede utilizarse 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 la presencia (o ausencia) de características celulares específicas como, por ejemplo, y sin limitación, 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 hemostasia en sangre (o por extensión cualquier muestra que contiene los componentes de la cascada de coagulación, tales como plasma), 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 ROTEM® delta (Pentapharm, Múnich, 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).

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, que el sujeto al que las células se van a trasplantar) o, alternativamente pueden ser células autólogas (es decir, aisladas del mismo sujeto que 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, sin limitación, administración de fármacos u otros compuestos que provocan un efecto en las células; eliminación de constituyentes celulares específicos; 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., crioconservación) y/o proliferación o pases antes del trasplante. Las células pueden inducirse para expresar una o más proteínas específicas (sean o no propias de la célula, es decir, autólogas) o para aumentar o disminuir (o bloquear completamente o sustancialmente por completo) la expresión de las mismas. 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 descritas en el presente documento pueden ser células (madre) no hematopoyéticas, ya que dichas células tienden a no mostrar actividad procoagulante.

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, sin limitación, células cancerosas (p. ej., para el estudio del cáncer en modelos animales), vacunas basadas en células o agentes inmunotolerantes, etc.

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, pero no están limitadas a, las que codifican productos génicos 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.

Las células que se pretenden en el presente documento, tal como en particular 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 origen mamífero o primate humano o no humano. 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, pero no limitado a, 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.

Las células como se describen en el presente documento, tal como en particular células procoagulantes según se describe en el presente documento, pueden abarcar sin limitación 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).

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 en u obtenidas de (tal como retiradas o aisladas de) un organismo en el estadio fetal o más preferentemente después del nacimiento (posparto).

A modo de ejemplo y no 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 neonatal o del tejido en cualquier etapa de desarrollo posterior, tal como, *inter alia*, etapas indicadas de manera convencional en el desarrollo humano como lactante, niño, joven, adolescente o adulto. Por ejemplo, para células humanas (tales como células progenitoras hepáticas adultas humanas), origen adulto pueden referirse al origen de un tejido (tal como tejido hepático) en cualquier momento después del nacimiento, preferentemente a término, 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.

Los términos "progenitora" o "célula progenitora" son sinónimos y se refiere en general a una célula no especializada o relativamente menos especializada y competente para proliferación que en condiciones apropiadas puede dar 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 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.

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 la célula madre retiene sustancialmente el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, el potencial de diferenciación, y la capacidad de proliferación de la célula madre parental; así como las células madre que muestran autorrenovación limitada, es decir, en la que la capacidad de la progenie de la célula madre para la proliferación y/o diferenciación adicional se reduce manifiestamente en comparación con la célula madre.

Las células progenitoras o madre descritas 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 técnica, como, *inter alia*, la capacidad de formar un teratoma en ratones con IDCG, o la capacidad para formar células identificables de las tres capas germinales en cultivo tisular), multipotentes (es decir, capaces, en condiciones apropiadas, de producir progenie de al menos tres tipos celulares 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 solo uno o a unos pocos (p. ej., uno, dos o tres) linajes celulares.

El prototipo de células madre pluripotentes de mamífero (mPS) puede obtenerse a partir de cualquier tipo de tejido embrionario de mamífero, p. ej., tejido embrionario, fetal o prefetal. Se incluyen en la definición de las células mPS células madre embrionarias de diversos tipos, ejemplificadas sin limitación por las células madre embrionarias murinas, p. ej., descritas en Evans & 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 (hES), p. ej., descritas en Thomson *et al.* 1998 (Science 282:1145-1147); células germinales embrionarias humanas (hEG), 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 ES humanas" se describen en Thomson *et al.* 1998 (*supra*) y en el documento US 6.200.806. El ámbito 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 ES, en particular las células hES, 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 hES del estadio de mórula y las células ES 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 EG 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 mPS 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 ES humanas ejemplares, pero no limitantes, incluyen las líneas que se enumeran en el Registro de células madre embrionarias humanas del NIH (<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. (Athena, 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 ejemplares incluyen las depositadas en el banco de células madre del RU (<http://www.ukstemcellbank.org.uk/>), y sublíneas de las mismas, p. ej., línea WT3 del King's College de Londres (Londres, RU) y línea hES-NCL1 de la Universidad de Newcastle (Newcastle, RU) (Strojko *et al.* 2004. Stem Cells. 22:790-7). Líneas de células ME ejemplares adicionales incluyen las 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 células madre pluripotentes de mamífero se encuentran dichas células mPS que pueden obtenerse mediante manipulación, como, *inter alia*, manipulación genética y/o mediada por factor de crecimiento y/o 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 (iPS), 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).

Las células descritas en el presente documento, tales como las células procoagulantes descritas en el presente documento, pueden incluir células madre mesenquimatosas. El término "células madre mesenquimatosas" o "MSC" como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula madre de mesodermo obtenida del adulto que es capaz de generar células de linajes mesenquimatosos, normalmente células de tres o más linajes mesenquimatosos, p. ej., linaje osteocítico (hueso), condrocítico (cartilago), miocítico (músculo), tendocítico (tendón), fibroblástico (tejido conjuntivo), adipocítico (grasa), estromogénico (estroma de médula). Comúnmente, pero sin limitación, una célula puede considerarse MSC si es capaz de formar células de cada uno de los linajes adipocíticos, condrocíticos y osteocíticos, utilizando condiciones de diferenciación convencionales aceptadas en la técnica 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). Las células MSC 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), periostio, y tejido adiposo (Zuk et al. 2001. Tissue Eng. 7:211-28). Se han descrito MSC humanas, su aislamiento, expansión *in vitro*, y diferenciación 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.

El término también abarca MSC obtenidas de la médula ósea, que se denominan comúnmente como "células madre mesenquimatosas de médula ósea", "células estromales de médula ósea" o "BMSC". Una muestra de médula ósea para el aislamiento de BMSC se puede adquirir, p. ej., de la cresta ilíaca, fémures, tibias, columna vertebral, costillas u otros espacios medulares. Preferiblemente, la MSC o poblaciones de MSC como se describen 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. La MSC y poblaciones de MSC originadas a partir de la médula ósea pueden presentar características (p. ej., perfil de marcadores, función, expansión, diferenciación, etc.) diferentes y/o favorables sobre las MSC 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 MSC y BMSC también abarca la progenie de MSC o BMSC, p. ej., la progenie obtenida por la propagación *in vitro* o *ex vivo* de MSC o BMSC obtenidas a partir de una muestra biológica de un sujeto.

Otras células descritas en el presente documento, tales como células procoagulantes descritas en el presente documento, pueden incluir sin limitación células progenitoras o madre adultas obtenidas o procedentes de (p. ej., retiradas o aisladas de) tejidos, incluyendo tejido muscular (p. ej., células satélite), tejido endocrino (p. ej., páncreas, gónadas, glándula suprarrenal, glándula pineal, glándula pituitaria, glándulas tiroideas y paratiroideas), tejido nervioso (p. ej., tejido neuronal o glial), sangre y tejidos del sistema inmunitario, tejidos epitelial, hígado, hueso, cartilago, adiposo o endotelial.

Las células particularmente preferentes como se describen en el presente documento, tal como células con actividad procoagulante son células progenitoras o madre derivadas del hígado adulto, más concretamente dichas células se detallan en la sección del compendio.

Como se utiliza en el presente documento, las células progenitoras o madre derivadas del hígado adulto o las células progenitoras hepáticas adultas o similares pueden indicar generalmente 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).

Las células descritas en el presente documento como las células procoagulantes que están parcial o totalmente diferenciadas o maduras, tales como células terminalmente diferenciadas (es decir, células totalmente especializadas que pueden ser posmitóticas), pueden incluir, sin limitación, 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 de PP o células epsilon), 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 ovoides), 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.

Las células particularmente preferidas descritas en el presente documento tal como en particular células con

actividad procoagulante son células de islotes de Langerhans, en particular, células beta pancreáticas, tal como células beta o células de islotes pancreáticas adultas. Mientras que estas células se pueden trasplantar como células individualizadas (es decir, completamente o sustancialmente por completo despegadas entre sí), también se prevé que se puedan proporcionar islotes de Langerhans completos o fragmentos de islotes de Langerhans en las composiciones descritas en el presente documento y trasplantadas como se describe en el presente documento.

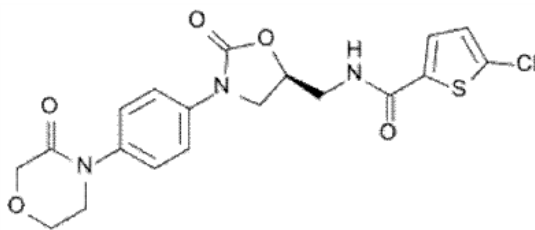
Como se utiliza en el presente documento, el término "inhibidor directo del factor Xa", que se usa de forma intercambiable con "inhibidor directo de Xa", también denominado "xaban" actúa directamente sobre el factor Xa en la cascada de coagulación, previniendo de esta manera la conversión mediada por factor Xa de protrombina a trombina. Un inhibidor directo del factor Xa como se pretende en el presente documento a lo largo de toda la descripción es, por tanto, distinto de un inhibidor indirecto del factor Xa, tal como un inhibidor cuya acción está mediada, por ejemplo, por antitrombina, tal como activador de antitrombina (por ejemplo, heparina). Un inhibidor directo del factor Xa puede interferir con la actividad catalítica del factor Xa para su sustrato protrombina (es decir, factor II), por ejemplo, uniéndose al sitio activo del factor Xa (o uniéndose en otro lugar de modo que genere cambios conformacionales que produzcan la inactivación del sitio catalítico), o alternativamente (o además) puede interferir con el acoplamiento o la interacción del factor Xa con sus sustrato protrombina, tal como, por ejemplo, previniendo la asociación con el factor Va y/o el ensamblaje del complejo protrombinasa, tal como, por ejemplo, un inhibidor competitivo. La actividad anti-factor Xa se puede ensayar mediante ensayos apropiados conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, ensayos cromogénicos adecuados. Preferiblemente, como se pretende en el presente documento a lo largo de la especificación, un inhibidor directo del factor Xa se une directamente al factor Xa. En ciertas realizaciones, el inhibidor del factor Xa inhibe factor Xa libre, factor Xa unido a protrombinasa (es decir, factor Xa asociado con factor Va en el complejo protrombinasa), y/o factor Xa unido a fibrina (es decir, factor Xa y/o el complejo protrombinasa unido a fibrina).

Preferiblemente, el inhibidor del factor Xa, y en particular el inhibidor directo del factor Xa como se pretende en el presente documento, es un inhibidor específico del factor Xa, en que la acción (tal como unión o inhibición) hacia otras enzimas y/o factores de la ruta de coagulación está ausente o sustancialmente ausente. Las mismas consideraciones aplican, mutatis mutandis, con respecto a la unión y/o actividad de los inhibidores (directos) de trombina como se pretende en el presente documento para su compañero de unión trombina. Por ejemplo, la unión a o inhibición de otra enzima y/o factor de coagulación por el inhibidor directo del factor Xa puede ser preferiblemente al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, incluso más preferiblemente al menos 100 veces, aún más preferiblemente al menos 1000 veces, o incluso al menos 10.000 veces menor que la unión y/o inhibición del factor Xa, respectivamente. La unión se puede evaluar, por ejemplo, determinado las constantes de asociación ( $K_a$ ) o disociación ( $K_d$ ) o de inhibición ( $K_i$ ) de equilibrio en marcos experimentales adecuados. Preferiblemente, la  $K_i$  del inhibidor del factor Xa (preferiblemente un inhibidor directo del factor Xa) para el factor Xa es menor de 100 nM, más preferiblemente menor de 50 nM, incluso más preferiblemente menor de 20 nM, incluso más preferiblemente menor de 10 nM, incluso más preferiblemente menor de 5 nM, incluso más preferiblemente menor de 2 nM, lo más preferiblemente menor de 1 nM, tal como por ejemplo, menor de 0,9, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 nM. Consideraciones análogas aplican, mutatis mutandis, con respecto a la unión y/o inhibición de los inhibidores (directos) de trombina hacia su compañero de unión trombina. La inhibición se puede evaluar por ensayos de actividad de factor Xa adecuados. Los inhibidores del factor Xa como se pretende en el presente documento pueden incluir, sin limitación, inhibidores reversibles, e inhibidores irreversibles. Los inhibidores del factor Xa como se pretende en el presente documento pueden incluir, sin limitación, inhibidores sintéticos, inhibidores semisintéticos, e inhibidores naturales.

En ciertas realizaciones, el inhibidor directo del factor Xa como se usa en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, betrixibán, edoxabán, otamixabán, YM466, DX9065a, razaxabán, darexabán, letaxabán, LY517717, GW813893, YM-60828, erixabán, JTV-803, KFA-144, DPC-423, RPR-209685, MCM-09 y antistasina. Preferiblemente, el inhibidor directo del factor Xa como se usa en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, betrixibán, edoxabán, otamixabán y YM466. Lo más preferiblemente, el inhibidor directo del factor Xa como se usa en el presente documento es rivaroxabán (tal como Xarelto®). En realizaciones adicionales, el inhibidor directo del factor Xa se selecciona de los enumerados en Candia et al. (2009), Expert Opin Ther Patents, 19(11):1535-1580, tal como cualquiera de los compuestos en esta referencia que tiene la fórmula estructural 1 a 160. Se debe indicar que las sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento también están incluidas.

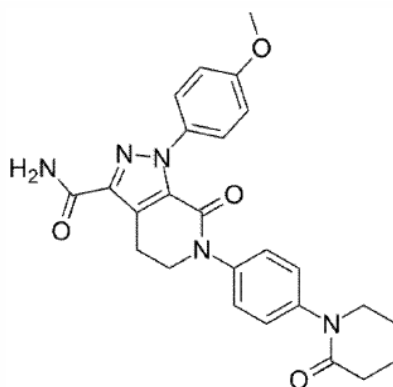
Rivaroxabán (BAY 59-7939; CAS No. 366789-02-8) que tiene la fórmula (S)-5-cloro-N-[[2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il) fenil]oxazolidin-5-il]metil]tiofeno-2-carboxamida, por ejemplo, está comercializado por Bayer con el nombre comercial Xarelto®.

La fórmula estructural de rivaroxabán se muestra a continuación:



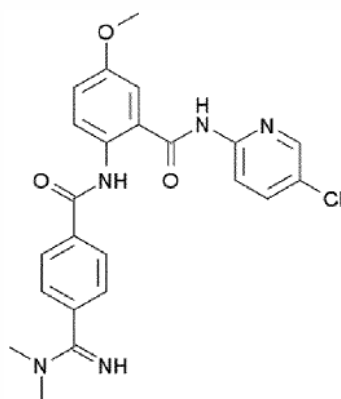
5 Apixabán (BMS-562247-01; CAS No 503612-47-3) que tiene la fórmula 1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5-dihidropirazolo[5,4-c]piridina-3-carboxamida, por ejemplo, está comercializado por Bristol-Myers Squibb con el nombre comercial Eliquis®.

La fórmula estructural de apixabán se muestra a continuación:



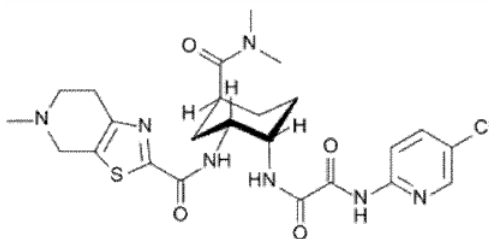
10 Betrixabán (PRT-054,021; CAS No. 330942-05-7) que tiene la fórmula N-(5-cloropiridin-2-il)-2-([4-(N,N-dimetilcarbamimidoil)benzoil]amino)-5-metoxibenzamida se desarrolló por Portola Pharmaceuticals.

15 La fórmula estructural de betrixabán se muestra a continuación:



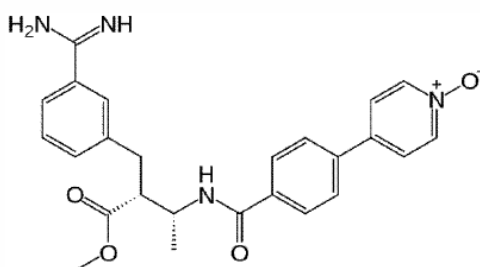
20 Edoxabán (DU-176b; CAS No. 912273-65-5) que tiene la fórmula N'-(5-cloropiridin-2-il)-N-[(1S,2R,4S)-4-(dimetilcarbamoil)-2-[(5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridina-2-carbonil)amino]ciclohexil]oxamida fue desarrollado por Daiichi Sankyo y, por ejemplo, se comercializa con el nombre comercial Lixiana®.

La fórmula estructural de edoxabán se muestra a continuación:



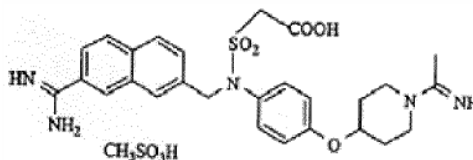
5 Otamixabán (XRP0673A; CAS No. 193153-04-7) que tiene la fórmula (2R,3R)-2-{3-[amino(imino)metil]bencil}-3-[[4-(1-oxidopiridin-4-il)benzoil]amino]butanoato fue desarrollado por Sanofi-Aventis y, por ejemplo, se comercializa con el nombre comercial Preluent®.

La fórmula estructural de otamixabán se muestra a continuación:

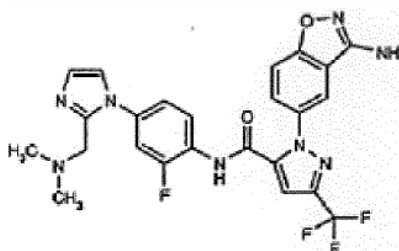


10 YM466 (una forma de sal diferente de YM-60828; CAS No. 179755-65-8) que tiene la fórmula mesilato del ácido [N-[4-[(1-acetimidoil-4-piperidil)oxi]fenil]-N-[(7-amidino-2-naftil)metil]sulfamoil] acético fue desarrollado por Yamanouchi Pharmaceutical. YM-60828 también es un inhibidor directo del factor Xa y es la sal diclorhidrato de la estructura YM466 a continuación.

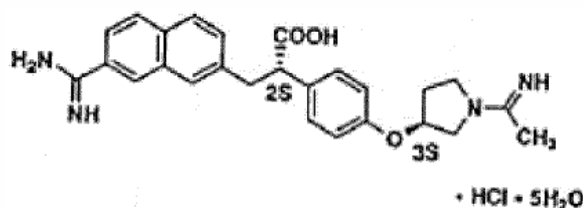
15 La fórmula estructural de YM466 se muestra a continuación:



20 Razaxabán (DPC 906; CAS No. 218298-21-6; desarrollado por BMS) tiene la fórmula:

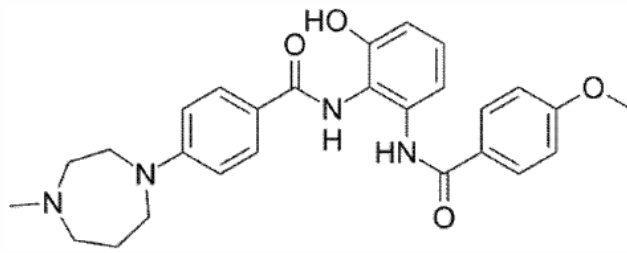


25 DX9065a (CAS No. 155204-81-2; desarrollado por Daiichi Seiyaku) tiene la fórmula:



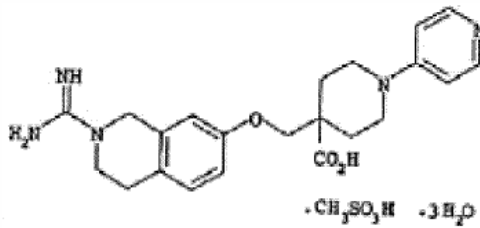


Darexabán (YM 150; CAS No. 365462-23-3; desarrollado por Astellas) tiene la fórmula:

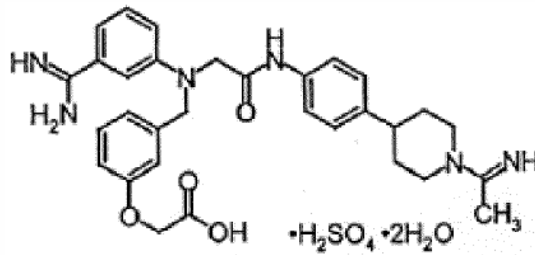


5

JTV 803 (CAS No.247131-79-9; desarrollado por Japan Tobacco) tiene la fórmula:

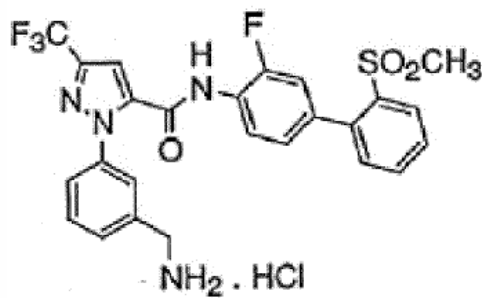


10 KFA 1411 (desarrollado por Kissei pharmaceutical) tiene la fórmula:

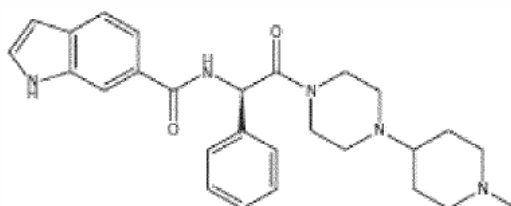


15

DPC 423 (CAS No. 209957-48-2; desarrollado por BMS) tiene la fórmula:

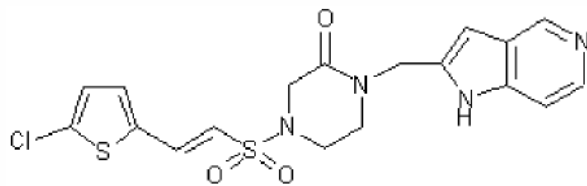


LY517717 (CAS No. 313489-71-3; desarrollado por Lilly) tiene la fórmula:

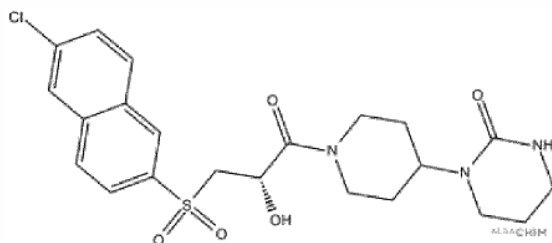


20

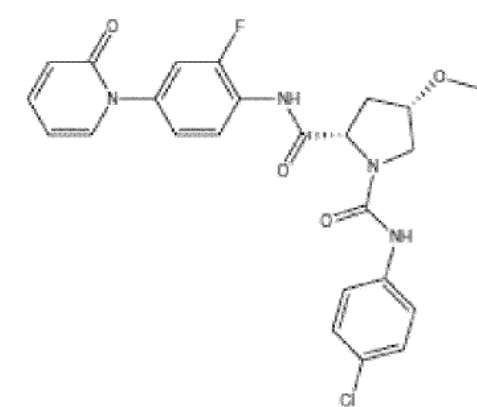
RPR 209685 (CAS No. 234100-28-8; desarrollado por Aventis) tiene la fórmula:



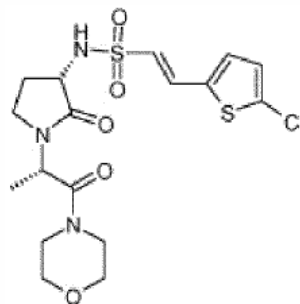
5 Letaxabán (TAK442; CAS No. 870262-90-1; desarrollado por Takeda) tiene la fórmula:



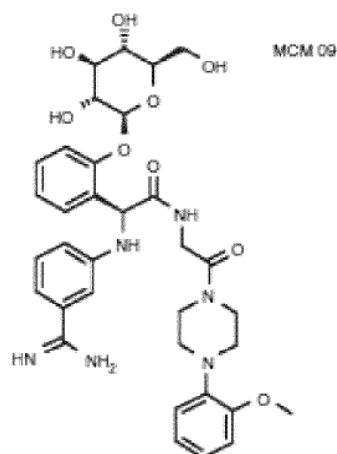
10 Eribaxabán (D08913; PD-0348292; CAS No. 536748-46-6; desarrollado por Pfizer) tiene la fórmula:



GW813893 (CAS No. 478644-12-1; desarrollado por GSK) tiene la fórmula:



15 MCM-09 (WO0216312; desarrollado por Morphochem) tiene la fórmula:



5 Como se utiliza en el presente documento, el término "inhibidor de la trombina" se refiere a un compuesto que se une directamente a e inactiva la trombina. Como tal, un inhibidor de la trombina disminuye significativamente o bloquea idealmente 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.

10 En una realización, el inhibidor de la trombina según la invención se selecciona del grupo que consiste en bivalirudina, hirudina, lepirudina, desirudina, argatrobán, melagatrán, ximalelagatrán, y dabigatrán. Químicamente, la bivalirudina (nº de registro CAS 128270-60-0) es un congénere sintético del fármaco natural hirudina. La hirudina natural 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 natural, tal como, *inter alia*, HV1, HV2, HV3, P1 o P2. Se puede hacer 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 o análogos de hirudina adecuados, p. ej., mediante sustitución, deleción, 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.

25 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.

30 Como se ha indicado, a lo largo de esta especificación, un inhibidor del factor Xa se puede referir en particular a un "inhibidor del factor Xa diferente de un activador de antitrombina" o "un inhibidor del factor Xa que no es un activador de antitrombina". Un activador de antitrombina como se pretende en el presente documento abarca cualquier agente capaz de aumentar la unión de antitrombina a una cualquiera o más de sus dianas.

35 En algunos aspectos y realizaciones, lo que se contempla son combinaciones, composiciones, kits, métodos y usos como se describen en el presente documento que comprenden – además de un inhibidor del factor Xa diferente de un activador de antitrombina y un inhibidor de trombina- también un activador de antitrombina.

40 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 en 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

50

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 del 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-glucopiranosil-(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-idopiranosil-(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 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. La HBPM se obtiene mediante varios métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Ejemplos de HBPM incluyen, sin limitación, ardeparina, certoparina, enoxaparina, parnaparina, tinzaparina, dalteparina, reviparina y nadroparina.

Combinaciones o composiciones particularmente preferentes que incorporan los principios de la invención pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en un inhibidor directo del factor Xa seleccionado del grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, betrixibán, edoxabán, otamixabán, YM466, DX9065a, razaxabán, darexabán, letaxabán, LY517717, GW813893, YM-60828, erixabán, JTV-803, KFA-144, DPC-423, RPR-209685, MCM-09 y antistasina; preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, betrixibán, edoxabán, otamixabán, YM466; lo más preferiblemente rivaroxabán; un inhibidor de la trombina seleccionado del grupo que consiste en bivalirudina, hirudina, lepirudina, desirudina, argatrobán, melagatrán, ximalelagatrán, y dabigatrán, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en bivalirudina e hirudina, incluso más preferentemente bivalirudina, y células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras hepáticas adultas, o miofibroblastos hepáticos, lo más preferentemente células progenitoras hepáticas adultas.

Otras combinaciones o composiciones particularmente preferentes que incorporan los principios de la invención se divulgan 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.

Tabla 1

sustancia 1	sustancia 2	células
rivaroxabán	hirudina	
rivaroxabán	bivaliriduna	
apixabán	hirudina	
apixabán	bivaliriduna	
betrixibán	hirudina	
betrixibán	bivaliriduna	
edoxabán	hirudina	
edoxabán	bivaliriduna	
otamixabán	hirudina	
otamixabán	bivaliriduna	
YM466	hirudina	
YM466	bivaliriduna	
rivaroxabán	hirudina	células procoagulantes
rivaroxabán	bivaliriduna	células procoagulantes
apixabán	hirudina	células procoagulantes
apixabán	bivaliriduna	células procoagulantes

ES 2 726 802 T3

betrixibán	hirudina	células procoagulantes
betrixibán	bivaliriduna	células procoagulantes
edoxabán	hirudina	células procoagulantes
edoxabán	bivaliriduna	células procoagulantes
otamixabán	hirudina	células procoagulantes
otamixabán	bivaliriduna	células procoagulantes
YM466	hirudina	células procoagulantes
YM466	bivaliriduna	células procoagulantes
rivaroxabán	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
rivaroxabán	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
apixabán	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
apixabán	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
betrixibán	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
betrixibán	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
edoxabán	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
edoxabán	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
otamixabán	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
otamixabán	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
YM466	hirudina	células progenitoras hepáticas adultas
YM466	bivaliriduna	células progenitoras hepáticas adultas
rivaroxabán	hirudina	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
rivaroxabán	bivaliriduna	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
apixabán	hirudina	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
apixabán	bivaliriduna	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
betrixibán	hirudina	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
betrixibán	bivaliriduna	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
edoxabán	hirudina	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
edoxabán	bivaliriduna	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
otamixabán	hirudina	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
otamixabán	bivaliriduna	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
YM466	hirudina	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
YM466	bivaliriduna	células madre mesenquimatosas (médula ósea)
rivaroxabán	hirudina	fibroblastos cutáneos
rivaroxabán	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
apixabán	hirudina	fibroblastos cutáneos
apixabán	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
betrixibán	hirudina	fibroblastos cutáneos
betrixibán	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
edoxabán	hirudina	fibroblastos cutáneos

edoxabán	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
otamixabán	hirudina	fibroblastos cutáneos
otamixabán	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
YM466	hirudina	fibroblastos cutáneos
YM466	bivaliriduna	fibroblastos cutáneos
rivaroxabán	hirudina	miofibroblastos hepáticos
rivaroxabán	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
apixabán	hirudina	miofibroblastos hepáticos
apixabán	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
betrixibán	hirudina	miofibroblastos hepáticos
betrixibán	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
edoxabán	hirudina	miofibroblastos hepáticos
edoxabán	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
otamixabán	hirudina	miofibroblastos hepáticos
otamixabán	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
YM466	hirudina	miofibroblastos hepáticos
YM466	bivaliriduna	miofibroblastos hepáticos
rivaroxabán	hirudina	células beta pancreáticas
rivaroxabán	bivaliriduna	células beta pancreáticas
apixabán	hirudina	células beta pancreáticas
apixabán	bivaliriduna	células beta pancreáticas
betrixibán	hirudina	células beta pancreáticas
betrixibán	bivaliriduna	células beta pancreáticas
edoxabán	hirudina	células beta pancreáticas
edoxabán	bivaliriduna	células beta pancreáticas
otamixabán	hirudina	células beta pancreáticas
otamixabán	bivaliriduna	células beta pancreáticas
YM466	hirudina	células beta pancreáticas
YM466	bivaliriduna	células beta pancreáticas

5 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 por vía parenteral, p. ej., por vía intravascular, subcutánea, intradérmica, o intramuscular, preferentemente por vía intravascular. Las células pueden administrarse, por ejemplo, y sin limitación, por vía sistémica, tópica o en el sitio de una lesión. 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 consecuencia, respecto a las vías de administración, así como

10 formulaciones, concentraciones, etc.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "complicaciones trombóticas" o "complicaciones procoagulantes" puede referirse particularmente a efectos dañinos 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, y sin limitación, 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 del trasplante de células o potencial de injerto celular, inferior a, o en casos extremos, nada de la 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 más de otros componentes. Por ejemplo, pueden incluirse componentes que pueden mantener o mejorar la viabilidad de las células. Como ejemplo y sin limitación, tales componentes pueden incluir sales para garantizar condiciones sustancialmente 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 portadoras, 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 bien conocidos por los expertos en la materia. Asimismo, se divulgan métodos de producción de dichas composiciones mezclando los respectivos componentes de las combinaciones enseñadas en el presente documento con dicho uno 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 un soporte o armazón sólido, etc.). Los crioprotectores, tales como, *inter alia*, DMSO se conocen bien en la técnica.

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

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

Como se utiliza en el presente documento, "soporte" o "excipiente" incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, tampones (tales como, p. ej., solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con 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. Tales materiales han de ser no tóxicos y no deben interferir con la actividad de las células.

La naturaleza precisa del soporte 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.

Los inhibidores del factor Xa (preferiblemente inhibidores directos del factor Xa) y/o los inhibidores de trombina como se describen en el presente documento, de las composiciones farmacéuticas que comprenden tales también se pueden administrar por vía oral. El experto en la materia entenderá que las composiciones que comprenden inhibidores del factor Xa (preferiblemente inhibidores directos del factor Xa) y/o los inhibidores de trombina como se describen en el presente documento que se van a administrar por vía oral habitualmente no comprenden células, aunque se puede prever que tales composiciones también contengan células, por ejemplo, cuando se tratan indicaciones del aparato digestivo. Cada uno de los compuestos descritos en el presente documento se puede administrar por la misma vía o se puede administrar por una vía diferente. A modo de ejemplo, y sin limitación, las células se pueden administrar por vía parenteral y el inhibidor del factor Xa (preferiblemente inhibidor directo del factor Xa) y/o el inhibidor de trombina se pueden administrar por vía oral.

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

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.

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 en fosfato (PBS), solución de cloruro sódico, inyección de Ringer o inyección láctica de Ringer, conocidos en la técnica. Además, la composición puede comprender una proteína portadora, p. ej., albúmina (p. ej., albúmina bovina o humana), que puede aumentar la viabilidad de las células.

Otros soportes o aditivos farmacéuticamente aceptables de forma adecuada los conocen bien los expertos en la materia y, por ejemplo, pueden seleccionarse de 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 arábica 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.

Si se desea, 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 a 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 a 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 como se describe en el presente documento, 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 sumergirlos 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.

Las células o poblaciones celulares pueden administrarse de manera que les permitan sobrevivir, crecer, propagarse y/o diferenciarse hacia 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 injerto de las células o las poblaciones celulares en otros lugares, tejidos u órganos, como hígado, bazo, páncreas, cápsula renal, peritoneo o epiplón.

En una realización, la preparación celular farmacéutica definida previamente puede administrarse en forma de composición líquida. En realizaciones, las células o composición farmacéutica que las comprende pueden administrarse por vía sistémica, tópica, en un órgano o en un sitio de la disfunción o lesión orgánica.

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, médico u otro facultativo, 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.

Las presentes combinaciones, composiciones farmacéuticas 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.

Excepto cuando se indique, "sujeto" o "paciente" se utilizan indistintamente y se refieren a animales, preferentemente vertebrados, 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. Los pacientes preferentes son sujetos humanos.

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 donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización de la evolución 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.



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 beneficiarán del tratamiento de una afección determinada, preferentemente una afección o enfermedad como anteriormente. Dichos sujetos incluyen generalmente, sin limitación, los que han sido diagnosticados con la afección, los propensos a tener o desarrollar dicha afección y/o esos en los que la afección se va a prevenir.

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, como se ha descrito en otro lugar.

Si las células se obtienen 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).

A modo de ejemplo y no 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 ADHLSC), estas pueden emplearse para el tratamiento, *inter alia*, de enfermedades asociadas al hígado incluyendo, pero no limitadas a, disfunción o insuficiencia hepática, hepatitis y errores congénitos del metabolismo.

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 glucosilación, enfermedad de Crigler Najjar y similares.

Otras enfermedades o afecciones asociadas al hígado incluyen, sin limitación, 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, pero no están limitadas a, síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica (cirrosis inducida por alcohol), deficiencia en  $\alpha$ 1-antitripsina (todos los fenotipos), hiperlipidemias y otros trastornos del metabolismo de lípidos, hepatitis autoinmunitaria, 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 glucosilación 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 no limitación, las combinaciones o composiciones farmacéuticas, en particular las 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 e injerto 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 mesenquimatosas 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 del injerto contra el 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 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 enfermedades del tejido conjuntivo o para crear armazones en combinación con otras células. En aún otro ejemplo, las combinaciones o composiciones farmacéuticas que comprenden las células de los islotes de Langerhans, tal como en particular células beta

pancreáticas, o islotes de Langerhans completos o fragmentos de los mismos se pueden usar para tratar o prevenir afecciones asociadas con acción alterada de la insulina, por ejemplos secreción disminuida de insulina, tal como para el tratamiento de diabetes o afecciones prediabéticas, en particular diabetes de tipo I.

5 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 que se va 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, administración que 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., a lo largo 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 va a administrar, 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 divulgadas en el presente documento utilizada (p. ej., inhibidor directo del factor Xa, inhibidor de la trombina), opcionalmente en combinación con uno o más de otros 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 que se va 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  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente  $250 \text{ mg}/\text{kg}$  de peso corporal o más, preferentemente de aproximadamente  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente  $100 \text{ mg}/\text{kg}$  de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente  $0,01 \text{ mg}/\text{kg}$  a aproximadamente  $50 \text{ mg}/\text{kg}$  de peso corporal, aún más preferentemente de aproximadamente  $0,01 \text{ mg}/\text{kg}$  a aproximadamente  $10 \text{ mg}/\text{kg}$  de peso corporal, y aún más preferentemente de aproximadamente  $0,05 \text{ mg}/\text{kg}$  a aproximadamente  $10 \text{ mg}/\text{kg}$  de peso corporal o de aproximadamente  $0,05 \text{ mg}/\text{kg}$  a aproximadamente  $1 \text{ mg}/\text{kg}$  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  $0,05 \text{ mg}/\text{kg}$  a aproximadamente  $10 \text{ mg}/\text{kg}$ . Por consiguiente, una o más dosis de aproximadamente  $0,5 \text{ mg}/\text{kg}$ ,  $2,0 \text{ mg}/\text{kg}$ ,  $4,0 \text{ mg}/\text{kg}$  o  $10 \text{ mg}/\text{kg}$  (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 inhibidor directo del factor Xa y en particular rivaroxabán se pueden administrar a un sujeto a través de una suspensión de células que comprende típicamente aproximadamente  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Cuando se indica la administración intravenosa del inhibidor directo del factor Xa y en particular rivaroxabán, la dosis típica puede ser entre aproximadamente  $0,1$  y  $5 \text{ mg}/\text{kg}$ , tal como entre aproximadamente  $0,1$  y  $3 \text{ mg}/\text{kg}$ , entre aproximadamente  $0,1$  y  $2 \text{ mg}/\text{kg}$ , entre aproximadamente  $0,1$  y  $1 \text{ mg}/\text{kg}$ , preferiblemente aproximadamente  $0,6 \text{ mg}/\text{kg}$ . Las dosis diarias administradas pueden variar entre aproximadamente de  $1$  a  $50 \text{ mg}/\text{día}$ , tal como, por ejemplo, entre  $1$  a  $40 \text{ mg}/\text{día}$ , entre aproximadamente  $1$  a  $30 \text{ mg}/\text{día}$ , entre aproximadamente  $5$  a  $30 \text{ mg}/\text{día}$ , preferiblemente entre aproximadamente  $10$  a  $20 \text{ mg}/\text{día}$ . 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 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, y aún más 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 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 ámbito de la invención.

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

El protocolo, incluyendo todos los experimentos en muestras humanas, y el uso del protocolo anticoagulante no oficial humano, y los consentimientos informados fueron aprobados por el comité de revisión ética de la institución.

#### Preparaciones celulares

Las células hALPC se obtuvieron de donantes de hígado sanos (n=6, con edades de 9 a 44 años) como se ha descrito previamente (Najimi et al. Cell Transplant, 2007, vol. 16:717-28). Las células se estudiaron recién tripsinizadas o después de crioconservación/descongelado en los pasos 4 a 6. 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 también, como control, hepatocitos humanos crioconservados/descongelados (n=5, con edades de 16 a 44 años). Los procedimientos de aislamiento hepático y crioconservación/descongelación de hepatocitos se publicaron previamente en detalle (Sokal et al. Transplantation, 2003, vol. 76, 735-738).

Las muestras de médula ósea se recogieron por aspiración de vértebras o crestas ilíacas de 3 donantes de órganos 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).

Los fibroblastos humanos se recogieron por biopsia cutánea (cara medio-anterior del antebrazo) de voluntarios con edades comprendidas entre 18 años y 35 años (n=3) tras un consentimiento informado por escrito como se ha descrito previamente (Lysy et al. Hepatology, 2007, vol. 46, 1574-1585).

Se obtuvieron células no parenquimales hepáticas humanas después de aislamiento del hígado realizado en nuestro Banco de Tejidos, filtración y 2 centrifugaciones a baja velocidad de la suspensión celular de tres donantes diferentes (un hígado neonato y dos donantes de 12 años de edad). A continuación, se aislaron células estrelladas humanas por centrifugación en gradiente Nicodenz (Myegaard, Oslo, Noruega) según protocolos establecidos (Guimarães et al., J Hepatol. 2010;52(3):389-397). Se obtuvieron miofibroblastos activados a partir de las células estrelladas aisladas.

#### Sangre

Se obtuvo sangre de donantes masculinos con edades de 29 a 40 años (n=5).

#### Actividad procoagulante de la suspensión de hALPC

Se realizaron mediciones en un analizador ROTEM® delta (Pentapharm, Múnich, 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. Nos enfocamos en el TC.

En pocas palabras, tras una breve pausa, se pipetearon 300 µl de sangre completa en un vaso precalentado a 37 °C. Las células suspendidas se añadieron posteriormente a la sangre completa (5x10exp5 células si no se establece especificación alguna). Se añadieron a continuación 20 µl del reactivo desencadenante que contiene el

factor tisular (FT) (Innovin, Siemens, Marburgo, Alemania. Dilución final 1:17.000/0,35 pM) diluido en tampón Owren (Siemens, Marburgo, Alemania), 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. La actividad procoagulante (APC) de las células también se determinó sin la adición de Innovin. Para evaluar el papel del FT en este modelo de coagulación, las células se preincubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con Acm IgG1 anti-FT humano 0,2 mg/ml (American Diagnostica) o Acm IgG1 de ratón de 0,2 mg/ml (clone 11711.11, RnD Systems, Abingdon, Reino Unido) antes de lavado extensivo en albúmina al 5 % y ensayo de 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 completa se centrifugó a 4.500 rpm durante 10 minutos. A continuación, 300 µl del plasma obtenido listo para el protocolo, se pipetearon en el vaso seguido del agregado o no de Innovin y CaCl<sub>2</sub>.

Para ensayos deficientes en plasma, las células suspendidas (5x10exp5 células, si no hay especificación) se añadieron a 300 µl de plasma antes de la adición de 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). Se añadieron entonces a sangre o plasma: rivaroxabán (Xarelto®, Bayer Schering) a una concentración de 1 µg/ml según datos publicados (Samama et al. (2010), Thromb Haemost, 103(4):815-825), 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.

#### Anillo tubular

Un protocolo experimental de sangre completa se adaptó a partir de un modelo descrito previamente (Johansson et al., Diabetes. 2005; 54:1755-1762). Los anillos se fabricaron de tubos de cloruro de polivinilo (diámetro interno 6,3 mm, longitud 390 mm) y se trataron con una superficie de heparina Corline adquirida en Corline (Upsala, Suecia). Los anillos se suplementaron con muestras de células (5x10exp5) suspendidas en solución salina tamponada en 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 después del 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, Marburgo, 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, Marburgo, 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 por 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 obtenido tras la centrifugación de la sangre.

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

Se realizaron estudios de inmunofluorescencia para evaluar la presencia de FT. Para ello, se colocaron células madre derivadas de hígado adulto humano en 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 (Tris-HCl 50 mmol/l pH 7,4 y NaCl 150 mmol/l) (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 (Acm) 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 isotiocianato de fluoresceína (Sigma). Los núcleos se revelaron por tinción con 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 en fosfato suplementada con seroalbúmina bovina al 0,5 % (tampón de FACS) y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C con Acm IgG1 conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra FT n.º 4508CJ (American Diagnostica) o el correspondiente Acm de control de isotipo comparable (BD Biosciences, Erembogedem,

Bélgica) diluido en tampón de FACS que contiene suero humano agrupado descomplementado al 10 %. Para detectar la forma citosólica de FT, las células se incubaron con Cytofix/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 Acm anti-FT conjugado a FITC o el correspondiente Acm 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 transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (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 RT-PCR de una etapa 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.

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 FTaa	5-TCTTCAAGTTCAGGAAAGAAATATTCT-3	7
Cebador antisentido FTaa	5-CCAGGATGATGACAAGGATGA-3	8

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

También se realizó RT-PCR en tiempo real para FT, FTaa, IVFT, y ciclofilina A en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, California, EE UU), utilizando ensayos de expresión génica TaqMan®, enumerados en la Tabla B. Para la expresión de FT, se utilizaron dos ensayos, uno (FT común) que amplifica una región presente en la forma tanto de membrana como soluble (ajuste alternativo, FTaa), y el otro (FT de membrana) que amplifica una región presente solo en la forma de la membrana (clásica). El parámetro Ct se obtuvo para cada muestra de ADNc y el par de cebadores y el Ct de 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 en veces de la cantidad de ARNm. La expresión de FTaa se calculó como la diferencia entre el  $\Delta\Delta$ Ct del FT común y FT de membrana. Los cebadores 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
FT de membrana	Hs01076029_m1	85
IVFT	Hs01041344_m1	78
Ciclofilina A	Hs99999904_m1	98

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

El paciente recibe un total de 2,2 billones de hALPC administradas en 7 infusiones durante 2 días. Antes de la colocación del catéter portal, el paciente recibe premedicación incluyendo Cefazolin (1 g). El catéter está bajo control de ultrasonido colocado en el sistema porta. Se inyecta Solumedrol (80 mg) antes de la infusión. El tratamiento inmunosupresor consiste en tacrolimus (Prograft®, Astellas Pharma), que se dirige a niveles en sangre de 6-8 ng/ml. Se prescribe una profilaxis de coagulación específica; las células se suspenden en albúmina al 5% y rivaroxabán a una concentración de 1 µg/ml. Durante la infusión celular, el sujeto recibe bivalirudina (1,75 mg/kg). Entre infusiones celulares consecutivas, el sujeto recibe bivalirudina (0,25 mg/kg) durante 2 a 4 horas, dependiendo de la prueba de tromboelastometría.

## 10 Estadística

Las diferencias estadísticamente significativas (\*P <0,05, \*\*P <0,01, \*\*\*P <0,001) se evaluaron por medio de pruebas de Mann-Whitney. Los valores significativos se ajustaron según la corrección de Bonferroni para evitar el error tipo 1. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de ANOVA unidireccional.

### 15 **Ejemplo 2: Actividad procoagulante de células madre mesenquimatosas de hígado humano derivado de adulto (hALPC)**

La actividad procoagulante (APC) de las células progenitoras de hígado adulto humano se demostró mediante un método de tromboelastometría en sangre y plasma humanos. El tiempo de coagulación (TC) de las hALPC era menor que de hepatocitos evaluado en el tromboelastograma (en sangre,  $117,5 \pm 33,8$  s (n=15) frente a  $285,8 \pm 87,0$  s (n=11), p<0,001) (en plasma,  $112,6 \pm 18,4$  s (n=9) frente a  $363,0 \pm 180,7$  s (n=5), p<0,05) (figura 1A y 1B). El TC control sin adición de células, se midió a  $646,2 \pm 111,7$  s (n=15) en sangre y a  $781,9 \pm 150,5$  (n=9) en plasma. Se observó una APC comparable de hALPC cuando no se añadió FT extrínseco (Figura 2). No se obtuvo APC cuando el medio de cultivo de hALPC, ausencia de células, se colocó en el tromboelastograma en lugar de células (Figura 3).

También se evaluó la APC de hALPC en el modelo del anillo tubular. Se observaron una disminución del recuento de plaquetas y un aumento de los niveles de dímeros D después de incubación de hALPC con sangre. Plaquetas desde 295 000/µl a 109 000/µl (experimento 1) y desde 310 000/µl hasta 134 000/µl (experimento 2); dímeros D desde 100 ng/ml a 700 ng/ml (experimento 2) y desde 95 ng/ml a 740 ng/ml (experimento 2).

### 30 **Ejemplo 3: Actividad procoagulante de células mesenquimatosas**

Se demostró además la APC de células madre mesenquimatosas 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 completa humana. Se emplearon células madre hematopoyéticas de médula ósea como control de células no procoagulantes ( $590,7 \pm 25,3$  s (n=3)) (Figura 4).

### 40 **Ejemplo 4: Modulación de la actividad procoagulante de hALPC**

Se analizó en primer lugar la APC de hALPC en plasma deficiente en factores de coagulación. Se demostró que cuando se utiliza el plasma deficiente en factor VII, cofactor de FT, la APC de hALPC se redujo solo parcialmente ( $298,3 \pm 42,3$  s (n=3), p <0,01 en comparación con APC en plasma normal) (Figura 5). No se observó APC alguna de hALPC en el plasma deficiente en factor II (trombina) o X, al igual que para el plasma deficiente en factor V, sino a un pequeño nivel (Figura 5). Es más y al contrario a la APC de hepatocitos (Figura 6C), se demostró que la APC de hALPC no se inhibió completamente por 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 6A), incluso si la dosis se aumentó hasta 5x (Figura 13). No se observó coagulación alguna cuando se utilizó heparina en ausencia de células.

Los fármacos inhibidores de la trombina, hirudina o bivalirudina permitieron únicamente un control parcial de la APC de hALPC ( $256,3 \pm 11,8$  s (n=3) y  $380,8 \pm 114,7$  s (n=4), respectivamente) (Figura 6B), incluso cuando se aumenta la dosis (2x o 5x) (Figuras 14 y 15). La APC de los hepatocitos se controló por fármacos inhibidores de la trombina, hirudina y bivalirudina (Figura 6D). La sangre 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.

Los fármacos anti-vitamina K (sangre obtenida de pacientes tratados con INR 2 a 3) no tuvieron influencia en la tromboelastometría incluso para el control (ausencia de células) (datos no mostrados).

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 hALPC (Figuras 6E y F). No se obtuvo modulación completa de la APC de hALPC cuando se combina heparina y enoxaparina o fondaparinux (Figura 6G).

Utilizando experimentos análogos, se demostró que la heparina no fraccionada puede controlar la APC de las células mesenquimatosas de médula ósea, los fibroblastos cutáneos, pero era inactiva sobre la APC de

miofibroblastos hepáticos (Figura 6H). El uso concomitante de heparina no fraccionada y bivalirudina también demostró que modula la APC de los miofibroblastos hepáticos, en contraste con bivalirudina sola (Figura 6I).

5 A continuación, se demostró que el uso concomitante de bivalirudina con un agente antitrombótico directo que se dirige al factor Xa (rivaroxabán) es una combinación sinérgica, que permite modular la APC de hALPC (Figura 7). El uso de rivaroxabán solo fue ineficaz en la APC de hALPC.

10 Se realizaron experimentos análogos en otras células con APC (células madre mesenquimatosas de médula ósea, fibroblastos cutáneos, miofibroblastos hepáticos) y muestran que el uso concomitante de un inhibidor directo del factor Xa con un inhibidor directo de trombina (hirudina o bivalirudina) es capaz de modular la APC de estas células también.

15 Se realizan experimentos análogos con diferentes inhibidores directos del factor Xa (apixabán, betrixibán, edoxabán, otamixabán, YM466, DX9065a, razaxabán, darexabán, letaxabán, LY517717, GW813893, YM-60828, erixabán, JTV-803, KFA-144, DPC-423, RPR-209685, MCM-09 y antistasina) y muestran que el uso concomitante de estos inhibidores directos del factor Xa con un inhibidor directo de trombina (hirudina o bivalirudina) es capaz de modular la APC de estas células también.

20 En particular, se realizan experimentos que usan combinaciones de inhibidores directos del factor Xa, inhibidores directos de trombina como se muestra en la tabla 1 en otro lugar en esta especificación y muestran que el uso concomitante de estos inhibidores directos del factor Xa con inhibidores directos de trombina es capaz de modular la APC de estas células también.

#### 25 **Ejemplo 5: Las hALPC expresan FT e IVFT**

La expresión de FT se documentó por primera vez por inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 8, se halló que todas las células expresaban constitutivamente FT (tinción citoplásmica uniforme). El análisis por citometría de flujo de hALPC 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;  $n=3$ ).

35 Se evaluó asimismo la expresión de FT y su inhibidor IVFT a nivel de ARNm empleando RT-PCR (Figura 9). Tanto la forma de membrana como la variante de ajuste alternativo del ARNm de FT se expresaron en hALPC. IVFT también se expresó. En experimentos adicionales, se utilizó RT-PCR en tiempo real para cuantificar los niveles de ARNm de FT, FTaa y IVFT. Como se muestra en la Figura 10, la variante de FT de membrana se expresó predominantemente ( $n=3$ ). Además, la expresión de FT es más importante para hALPC en comparación con los hepatocitos ( $n=3$ ). Por el contrario, la expresión de IVFT por los hepatocitos era mayor que la de hALPC ( $n=3$ ). 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 11, la APC de hALPC solo se controló parcialmente mediante el bloqueo de FT ( $324,8 \pm 11,4$  s ( $n=5$ ),  $p < 0,01$  en comparación con ausencia del anticuerpo contra FT) en contraste con los hepatocitos, como ya se demostró previamente (Fisher et al., Transplantation. 2000; 69:303-307).

45 Como ya se mostró en la Figura 5, solo se obtuvo un control parcial de la APC de hALPC en plasma deficiente en factor VII.

#### 50 **Ejemplo 6: hALPC y heparina**

Se observó solo una pequeña actividad anti-Xa en plasma obtenido después de la incubación de hALPC ( $0,05 \pm 0,03$  UI/ml) y heparina a una concentración de 10 UI/ml (Figura 12), en relación con la ausencia de efecto anticoagulante de heparina sola en hALPC.

#### 60 **Ejemplo 7: Trasplante celular**

Las ALDSC se suspenden a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml en una solución de Hibumin (5 %), que contiene bicarbonato (0,84 g/l), glucosa (2,5 g/l) y rivaroxabán (1 µg/ml). La suspensión de ALDSC se infunde por vía parenteral 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 de tromboelastometría.

65 Resulta evidente que la administración concomitante de un inhibidor directo del factor Xa (p. ej., rivaroxabán) y un inhibidor de la trombina (p. ej., bivalirudina) tras el trasplante celular mejora la eficacia del trasplante celular y el potencial de injerto celular. La administración concomitante de un inhibidor directo del factor Xa y un inhibidor de la trombina tras 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.

**Listado de secuencias**

<110> Université catholique de Louvain

5 <120> Composiciones y métodos para el trasplante celular

<130> UCL-104-PCT

10 <150> PCT/EP2012/051157  
<151> 25-01-2012

<160> 8

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 1  
25 tgaatgtgac cgtagaagat ga 22

<210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> Cebador

35 <400> 2  
ggagttctcc ttccagctct 20

<210> 3  
<211> 25  
40 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador

45 <400> 3  
ggaagaagat cctggaatat cgagg 25

<210> 4  
50 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
55 <223> Cebador

<400> 4  
cttggtgat tgcggagtca gggag 25

60 <210> 5  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial

65 <220>



<223> Cebador

<400> 5  
 cggactcaac ggattggtc gtat 24

5

<210> 6  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Cebador

<400> 6  
 agccttctcc atggtggt 18

15

<210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> Cebador

<400> 7  
 tcttcaagtt caggaaagaa atattct 27

25

<210> 8  
 <211>21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Cebador

35

<400> 8  
 ccaggatgat gacaaggatg a 21

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células progenitoras o madre derivadas de hígado adulto y miofibroblastos hepáticos, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa y no es un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de trombina.
2. La combinación según la reivindicación 1, en donde el inhibidor del factor Xa es un inhibidor directo del factor Xa.
3. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las células progenitoras o madre derivadas de hígado adulto son células progenitoras o células madre derivadas de hígado adulto humanas que expresan alfa actina de músculo liso (AAML) y albúmina (ALB) y no expresan citoqueratina-19 (CK-19), o son una línea de células progenitoras pluripotentes de hígado humano adulto no ovaladas que expresan marcadores celulares hepáticos y que son capaces de diferenciarse a células hepáticas maduras, células productoras de insulina, células osteogénicas y células epiteliales, o son una línea de células progenitoras pluripotentes de hígado humano adulto no ovaladas que expresan marcadores celulares hepáticos y que es capaz de diferenciarse a células hepáticas maduras, células productoras de insulina, células osteogénicas y células endoteliales.
4. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células expresan factor tisular, preferiblemente en donde las células expresan factor tisular constitutivamente.
5. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células:
  - son células primarias; o
  - son una línea celular; o
  - se han sometido a un almacenamiento, tal como crioconservación y/o a 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 que codifica un producto génico que potencia el crecimiento, la diferenciación y/o el funcionamiento de las células.
6. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 configurada para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden de dichas células, al menos un inhibidor del factor Xa y al menos un inhibidor de la trombina a un sujeto.
7. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el inhibidor directo del factor Xa se selecciona del grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, betrixibán, edoxabán, otamixabán, YM466, DX9065a, razaxabán, darexabán, letaxabán, LY517717, GW813893, YM-60828, erixabán, JTV-803, KFA-144, DPC-423, RPR-209685, MCM-09 y antistasina.
8. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el inhibidor directo del factor Xa es rivaroxabán.
9. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el inhibidor de trombina se selecciona del grupo que consiste en bivalirudina, hirudina, lepirudina, desirudina, argatrobán, melagatrán, ximalelagatrán, y dabigatrán.
10. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el inhibidor de trombina es bivalirudina o hirudina, preferiblemente bivalirudina.
11. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las células y el al menos un inhibidor del factor Xa están incluidos en una suspensión celular, el al menos un inhibidor de trombina está incluido en una solución acuosa, y la suspensión celular y la solución acuosa están configuradas para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden a un sujeto.
12. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende además un agente inmunosupresor.
13. Una composición farmacéutica que comprende la combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición farmacéutica es líquida, semisólida o sólida.
14. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, en donde la composición farmacéutica es líquida y

las células están presentes en la composición farmacéutica a una concentración entre  $10^4$ /ml a  $10^8$ /ml, preferiblemente entre  $10^5$ /ml y  $10^7$ /ml, más preferiblemente entre  $1 \times 10^6$ /ml y  $1 \times 10^7$ /ml, o  $5 \times 10^6$ /ml.

- 5
15. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 para su uso como un medicamento.
- 10
16. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 para su uso en el trasplante de células; o para su uso en la prevención de 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*.
- 15
17. La combinación o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en donde las células se administran a través de inyección, tal como a través de inyección localizada, inyección sistémica, inyección intraesplénica, inyección a la vena porta, inyección a la pulpa del hígado, o administración parenteral.
- 20
18. Un método para inhibir *in vitro* la actividad procoagulante de células como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende proporcionar una combinación que comprende dichas células, al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa y no es un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de trombina; o que comprende poner en contacto dichas células con una combinación que comprende al menos un inhibidor del factor Xa que es un inhibidor directo o indirecto del factor Xa y no es un activador de antitrombina, y al menos un inhibidor de trombina.
- 25
19. El método según la reivindicación 18, en donde el inhibidor del factor Xa es un inhibidor directo del factor Xa.
- 30
20. Un kit de partes o un artículo de fabricación que comprende la combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y que opcionalmente comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

FIG 1

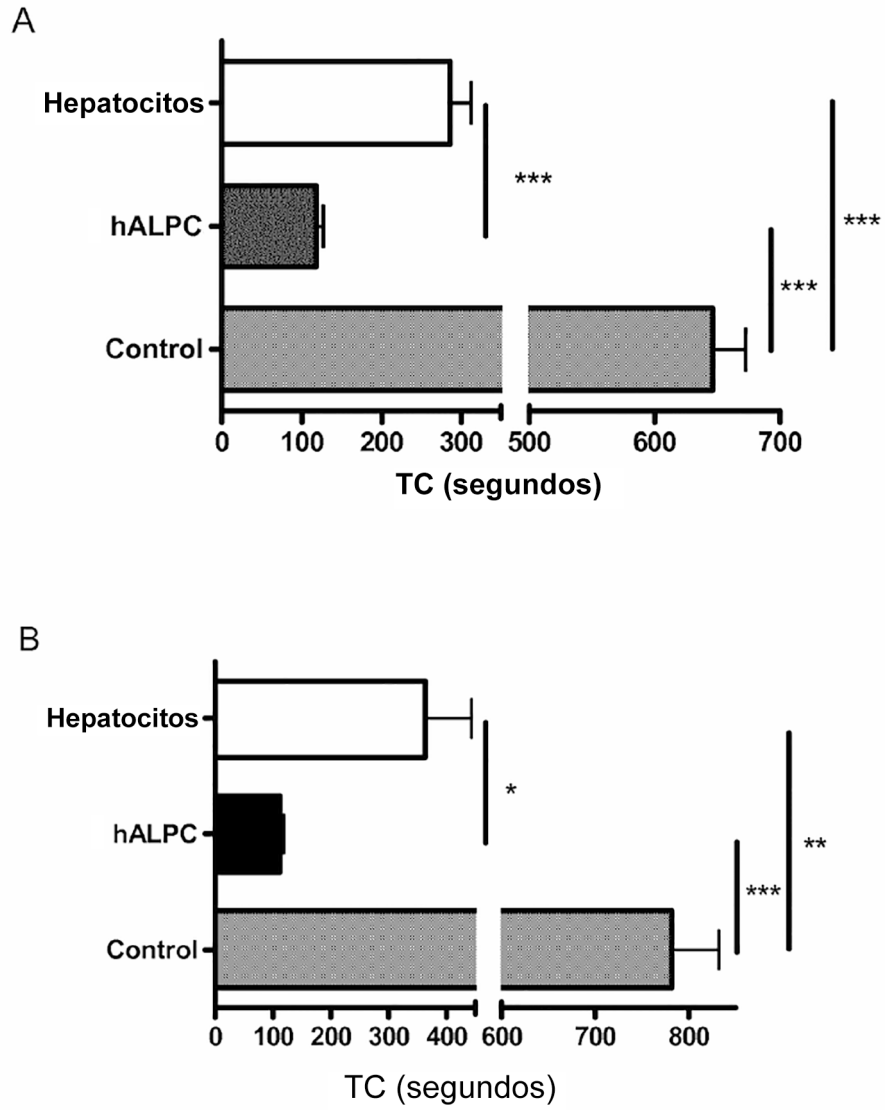


FIG 2

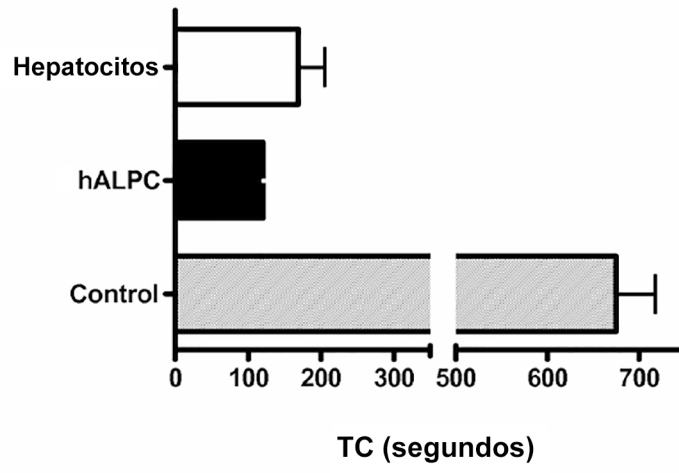


FIG 3

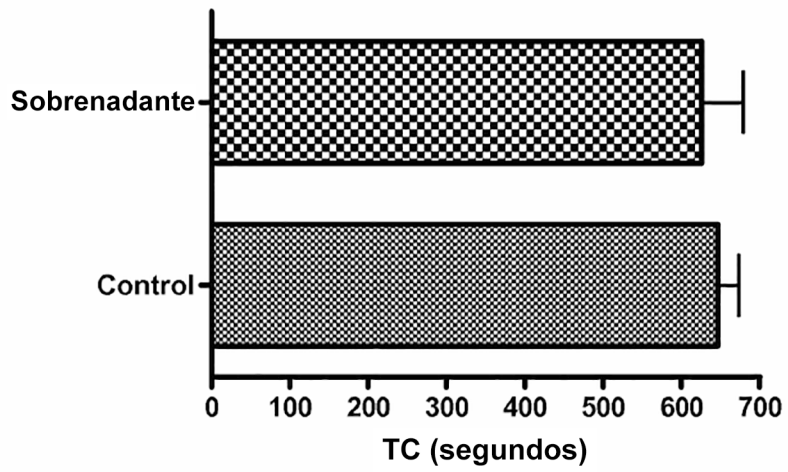


FIG 4

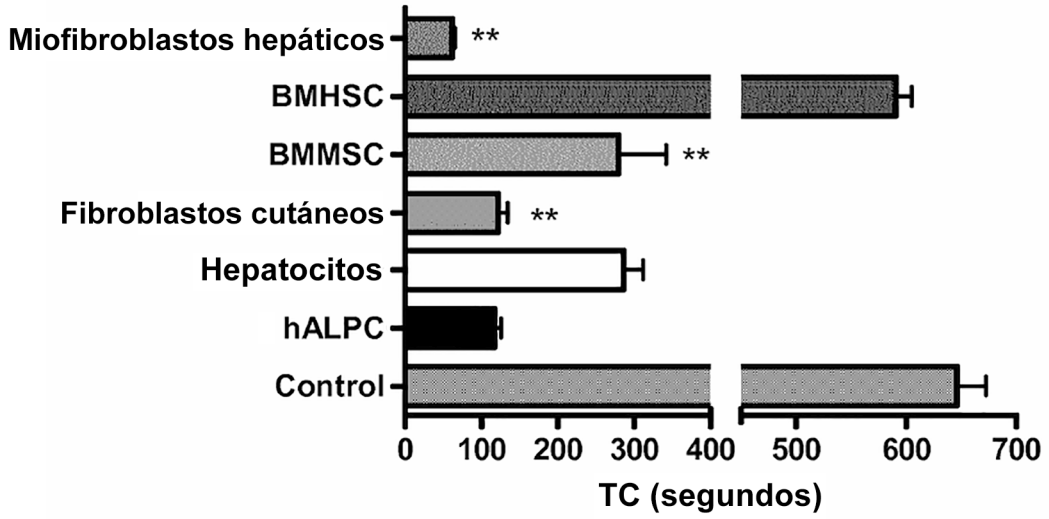


FIG 5

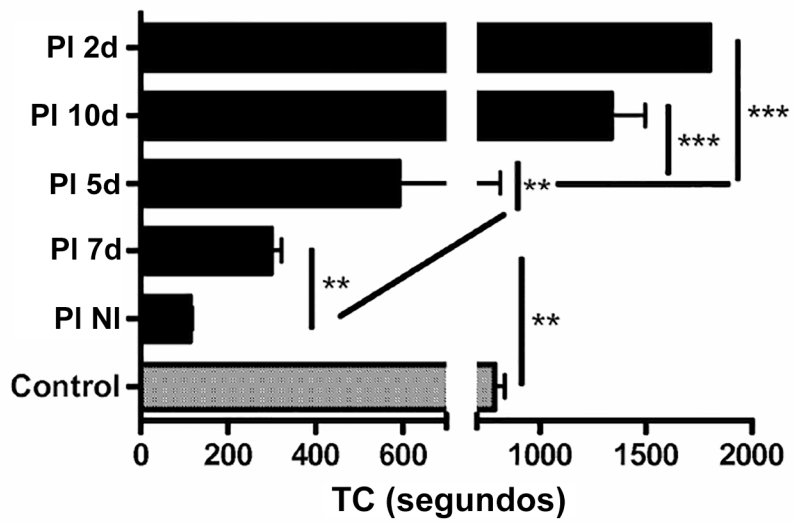


FIG 6

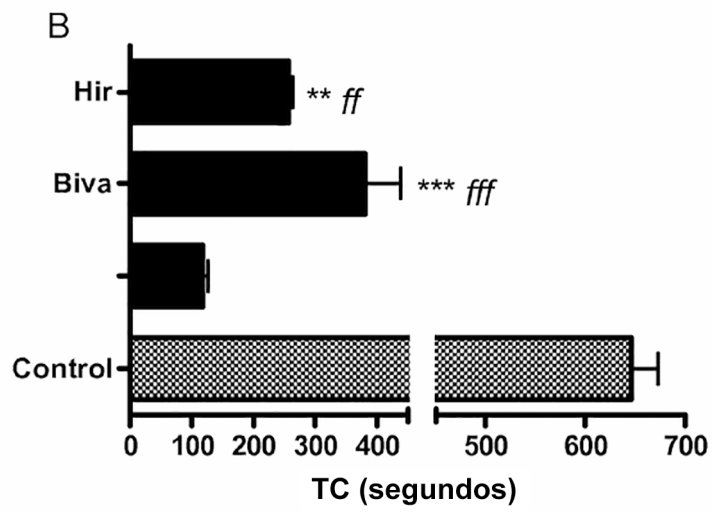
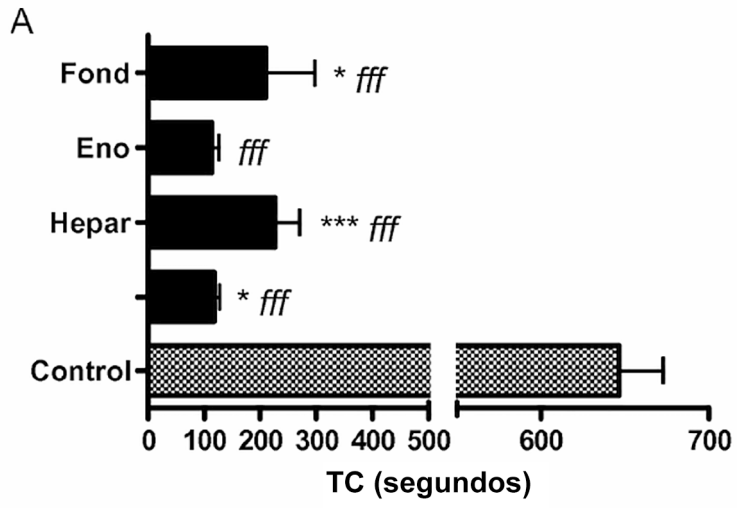
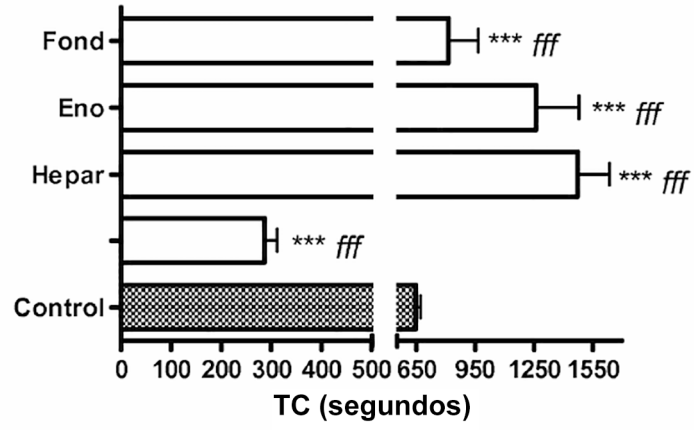


FIG 6

C



D

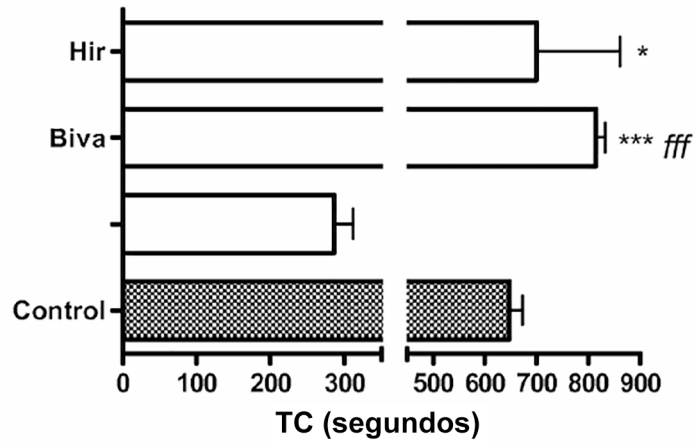
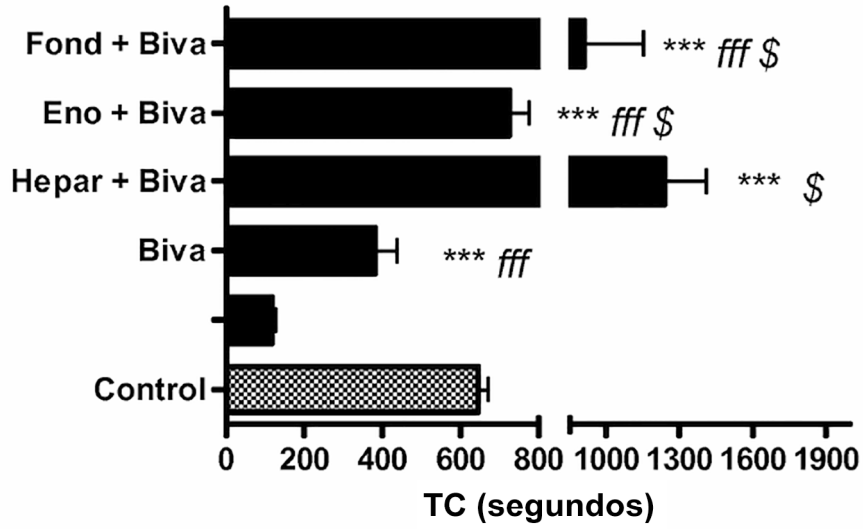




FIG 6

E



F

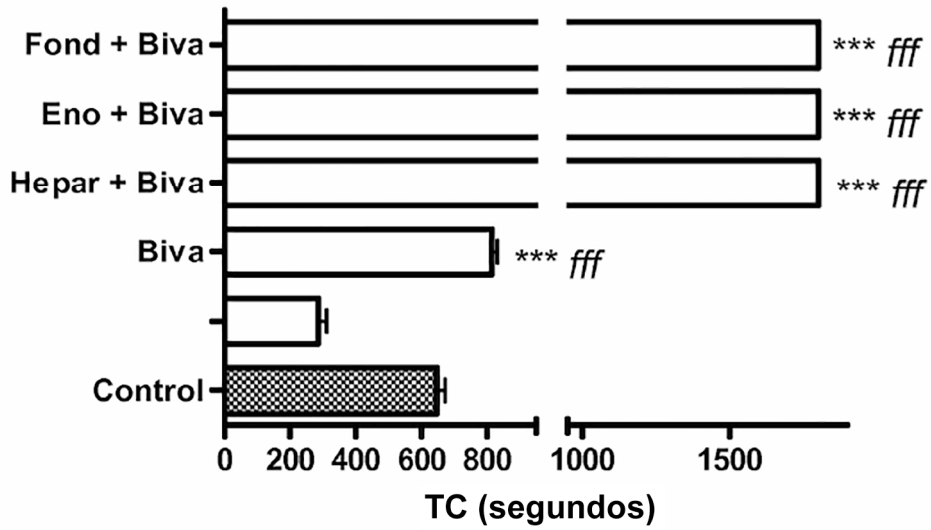
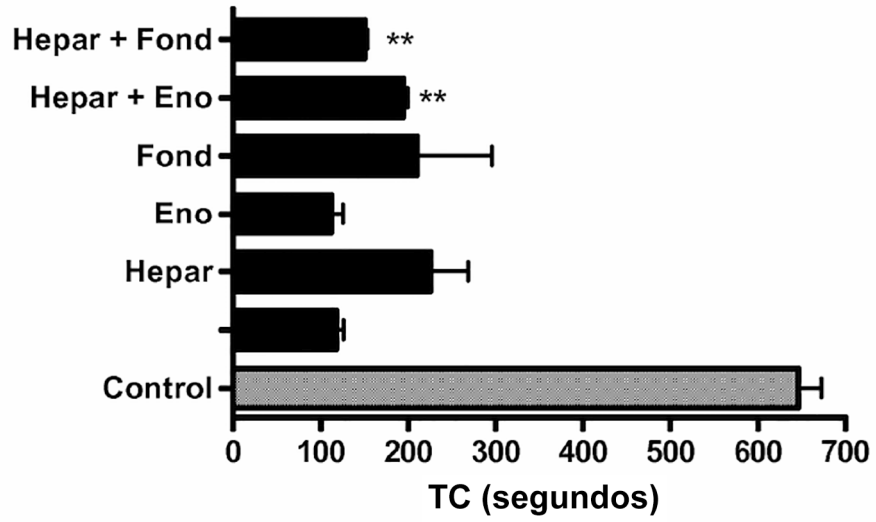


FIG 6

G



H

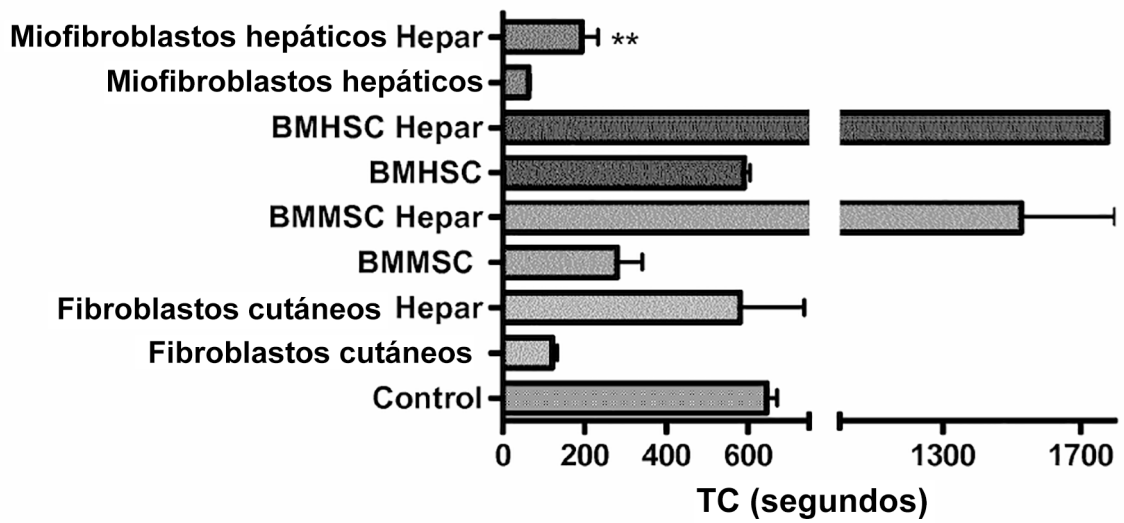


FIG 6

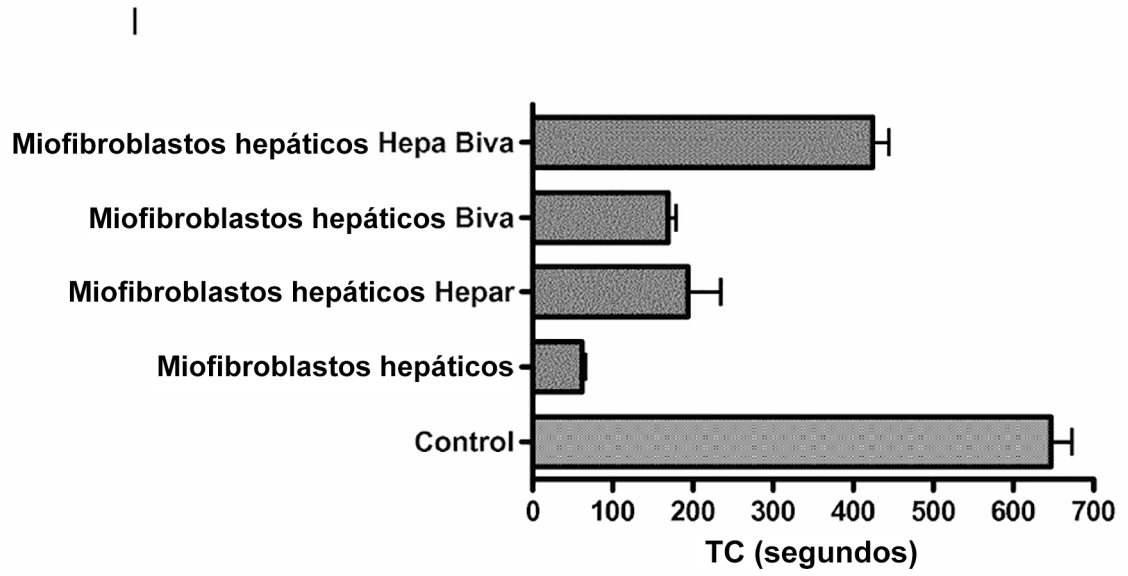


FIG 7

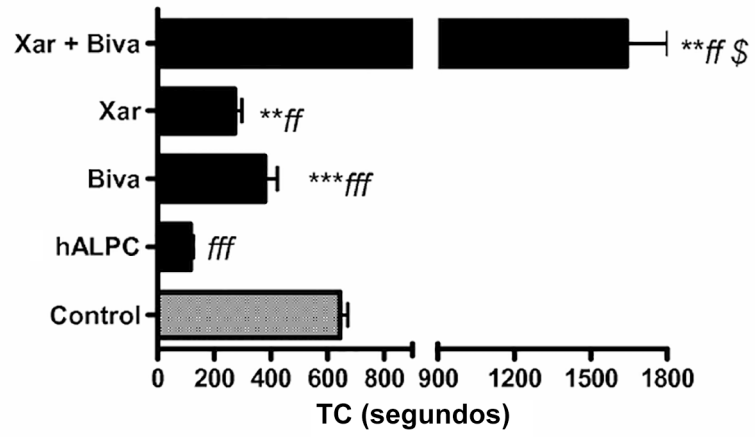


FIG 8

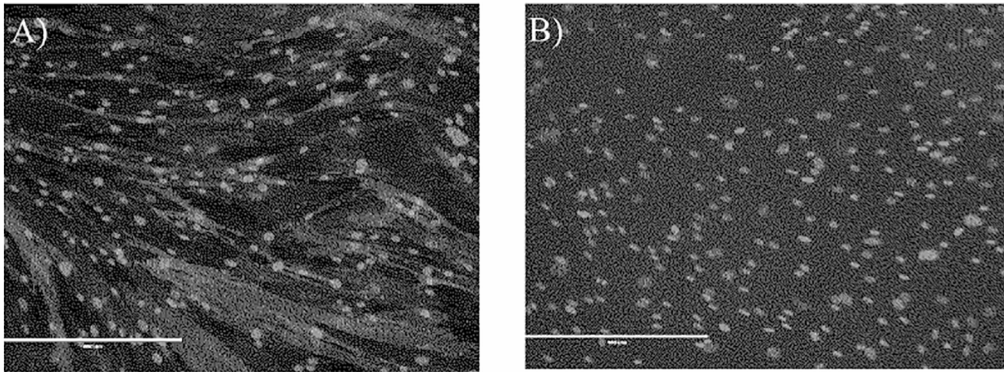


FIG 9

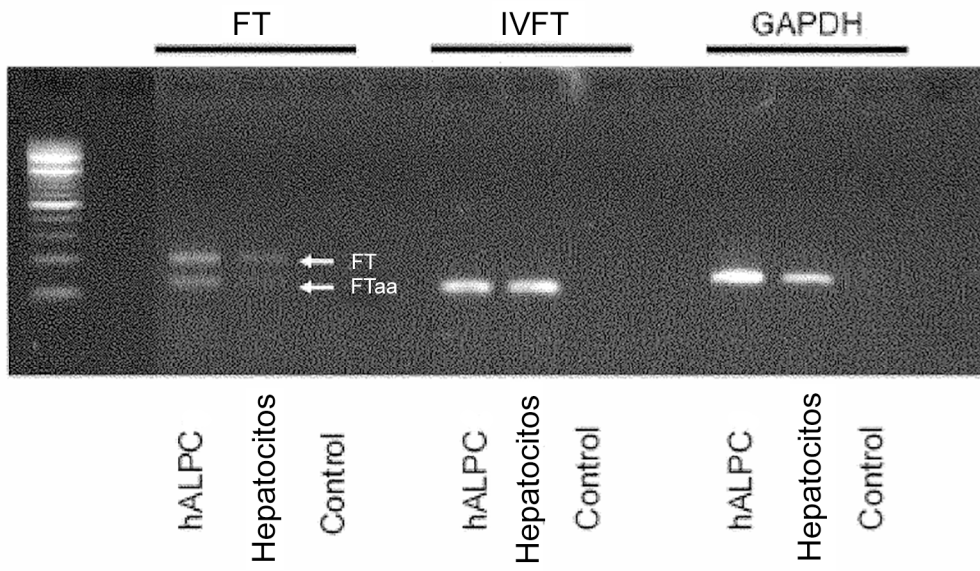


FIG 10

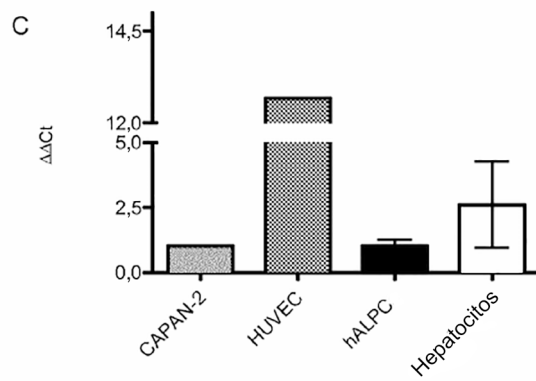
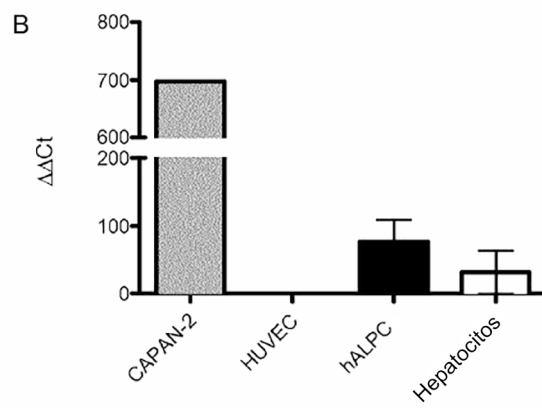
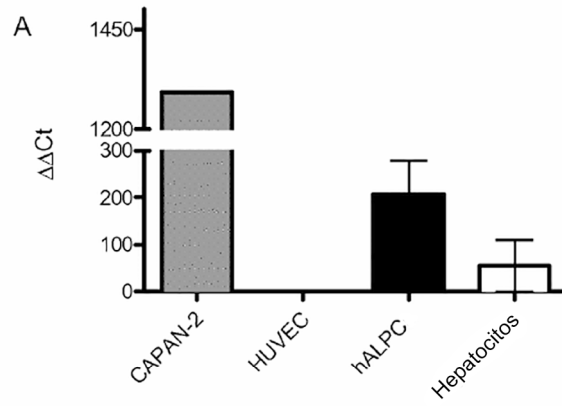


FIG 11

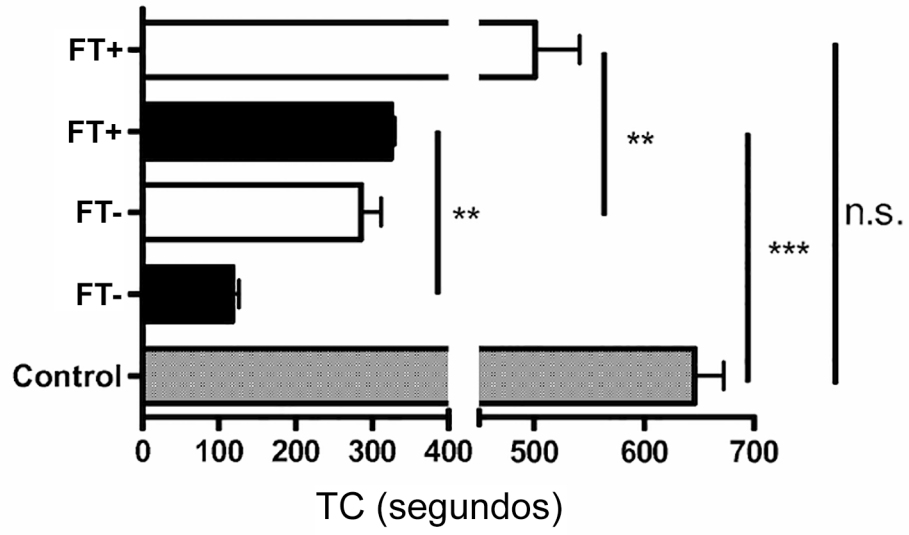


FIG 12

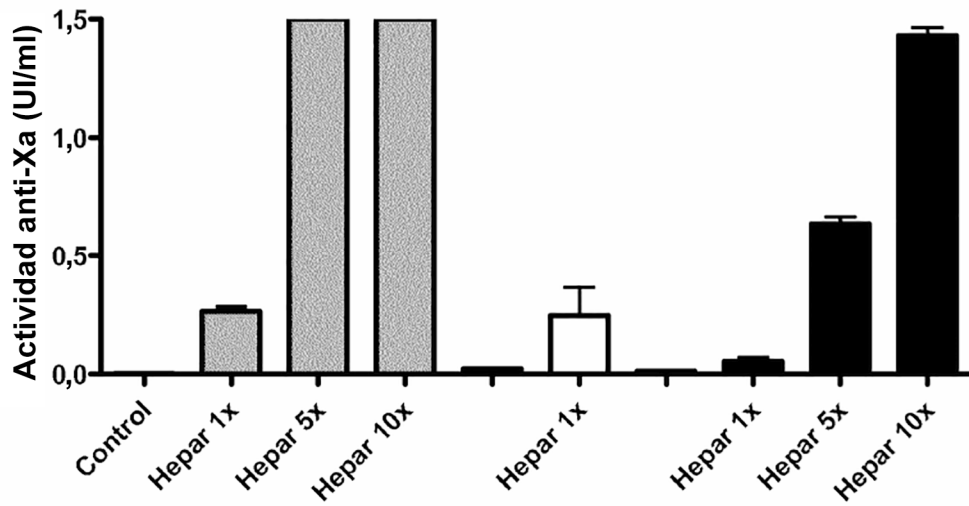
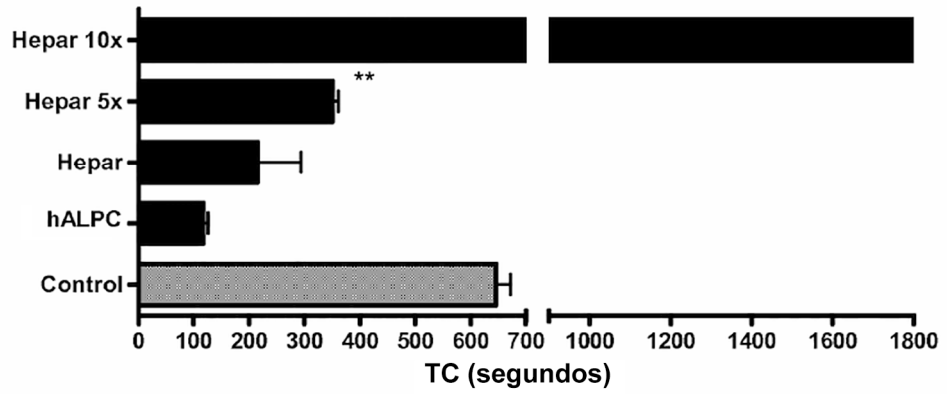


FIG 13

A)



B)

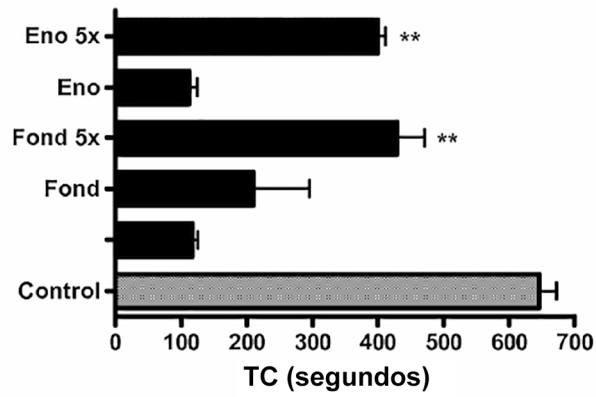




FIG 14

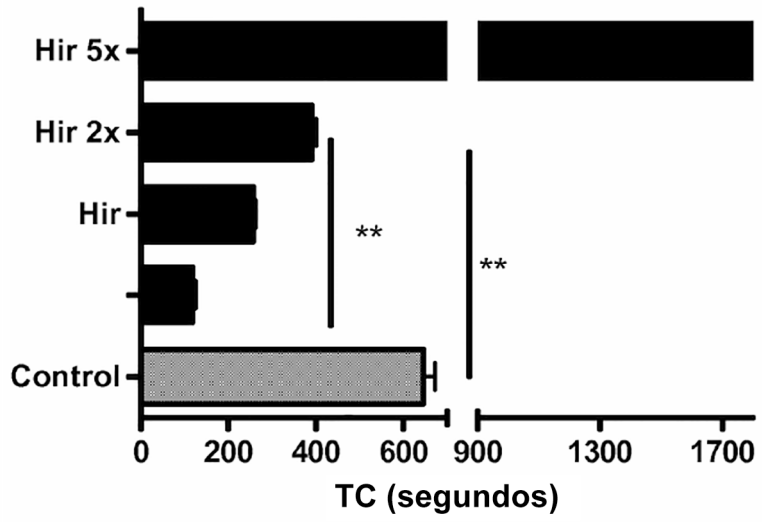


FIG 15

