

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 228**

51 Int. Cl.:

A61K 35/407 (2015.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2014 PCT/EP2014/064437**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001124**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2014 E 14753019 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3016665**

54 Título: **Medio acondicionado de células madre de hígado de adultos y su uso en el tratamiento de trastornos del hígado**

30 Prioridad:

05.07.2013 EP 13175442

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

08.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NAJIMI, MUSTAPHA;
SOKAL, ETIENNE y
BERARDIS, SILVIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 759 228 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medio acondicionado de células madre de hígado de adultos y su uso en el tratamiento de trastornos del hígado

Campo de la invención

5 La invención se refiere en general a los campos médicos, (bio-)farmacéuticos y farmacológicos, y se refiere particularmente a productos, incluidas sustancias, composiciones y kits de piezas, así como a métodos y usos útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos, tales como, pero sin limitación, enfermedades y trastornos que afectan al hígado.

Antecedentes de la invención

10 Las diversas afecciones causadas por órganos enfermos o de otro modo dañados o funcionalmente dañados pueden tratarse mediante el trasplante de órganos. En particular, el trasplante de corazón, riñones, hígado, pulmones, páncreas, intestino y timo se puede realizar de forma rutinaria con una tasa razonable de éxito. Sin embargo, todavía existen algunos inconvenientes importantes en el trasplante de órganos, en particular la escasez de órganos, la necesidad de encontrar un donante compatible para cada paciente receptor para minimizar el rechazo del órgano trasplantado y la necesidad de la inmunosupresión de por vida, como se resume en relación con el trasplante de hígado (Zarrinpar A y Busuttill R, 2013).

15 En los últimos años, las terapias basadas en la administración de varios tipos de células se han desarrollado cada vez más para la medicina regenerativa en seres humanos. El trasplante de células puede proporcionar una valiosa terapia alternativa, temporal o adicional (complementaria) al trasplante de órganos. Las células mesenquimales del estroma/células madre (MSC) representan un tipo de célula muy investigado para aplicaciones clínicas, tales como las terapias basadas en células para la medicina regenerativa, debido a la relativa facilidad con la que dichas células se pueden cosechar de diversos tejidos y expandirse *in vitro* para una mejor caracterización con respecto a su perfil de marcador, propiedades de autorrenovación y capacidad de diferenciación (Ren G et al., 2012; Wang S et al., 2012).

20 Además de servir como fuente de células para reemplazar las células endógenas perdidas o inactivas, las MSC también ejercen efectos positivos en los tejidos y órganos al secretar moléculas (incluidas las citoquinas, proteínas de la matriz extracelular, quimioquinas, factores de crecimiento y enzimas) como entidades solubles o microvesículas. Dichos mecanismos de acción están detrás de la atribución de una variedad de efectos paracrinos de las MSC en las células endógenas, de gran importancia para establecer terapias basadas en las MSC, tales como la inmunomodulación, remodelación de tejidos, migración celular, proliferación y supervivencia (Atoui R y Chiu RC, 2012; Keating A. 2012; Baglio S et al., 2012).

25 Esta evidencia sugiere que las proteínas secretadas por las MSC (el llamado secretoma de MSC) pueden estar contribuyendo no solo a los mecanismos por los cuales las MSC ejercen sus efectos, sino que también ejercen directamente algunos de esos efectos solas, como una composición libre de células. Por lo tanto, el secretoma de MSC se ha estudiado en varios sistemas y con diferentes técnicas, mostrando cómo su composición y actividad dependen de su origen celular así como de los parámetros de cultivo celular (Xiao Y et al, 2013; Lavoie J y Rosu-Myles M, 2013).

30 Los secretomas de MSC que se han obtenido utilizando células de diferentes orígenes han revelado distintas composiciones y se han descrito en asociación con diversos usos terapéuticos o usos *in vitro*, y con diferentes enfoques de administración (documentos de patente internacional WO 2008060788; WO 2008070868; WO 2011010966; WO 2010119176; WO 2006121445).

35 También se han obtenido datos relevantes *in vivo*, por ejemplo, mostrando que i) la administración de un bolo intravenoso de medio acondicionado de MSC derivadas de médula ósea mejora la supervivencia en un modelo de rata de insuficiencia hepática fulminante (Parekkadan B et al. 2007) e ii) la infusión de medio acondicionado de MSC proporciona un beneficio de supervivencia significativo en un modelo de lesión hepática aguda inducida por D-galactosamina en la rata, previniendo la liberación de biomarcadores de lesión hepática (van Poll D et al., 2008). Los medios acondicionados de MSC tienen un efecto protector sobre la apoptosis de las células hepáticas después de una lesión hepática aguda (Xagorari A et al., 2013), en el trasplante de hígado de rata de tamaño reducido (Du Z et al., 2013) y en un modelo de lesiones hepáticas de isquemia/reperusión en ratas (Pan G et al., 2012.). Además de su participación en la regeneración del hígado y la recuperación de la función hepática (documento de patente internacional WO 2009057165; documento de patente europea EP2254586; documento de patente internacional WO 2009150199), se pueden identificar componentes específicos del secretoma de MSC que proporcionan actividad antitumoral (Cavallari C et al., 2013).

40 En conjunto, las terapias regenerativas de células/tejidos están claramente ganando importancia en la medicina moderna. Sin embargo, las terapias basadas en células tienen algunos inconvenientes. Por ejemplo, las células pueden causar reacciones inmunes cuando se administran, lo que requiere inmunosupresión; existe un riesgo, incluso si es muy limitado, de que las células madre puedan proliferar de manera inapropiada *in vivo*; las células pueden perder viabilidad y, por lo tanto, eficacia terapéutica si no se manejan con cuidado; etc. Los medios acondicionados de MSC

pueden proporcionar alguna mejora, pero persiste la necesidad de identificar composiciones adicionales y potencialmente mejoradas útiles en la terapia regenerativa de células/tejidos, y posiblemente en otras indicaciones.

Herrera et al. (2013, Hepatology 57:311-319 divulga que las células madre del hígado humano mejoran la lesión del hígado en un modelo de fallo fulminante del hígado.

- 5 Herrera et al. (2006, Stem cells, Alphamed Press, Dayton, OH, Estados Unidos, 24:2840-2850) describe el aislamiento y caracterización de una población de células madre de hígado humano adulto.

Herrera et al. (2010, Journal of Cellular and Molecular Medicine 14:1605-1618) divulga que microvesículas derivadas de células madre de hígado humano adulto aceleran la regeneración hepática en ratas hepatectomizadas.

Compendio de la invención

- 10 La presente invención proporciona un tema como se establece en cualquiera y todos de (i) a (xvi) a continuación:

(i) Un medio acondicionado libre de células que contiene proteínas solubles y/o microvesículas y que se obtiene mediante el cultivo de células mastocitos/progenitoras derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y la separación del medio de cultivo celular de las células, en donde las células mastocitos/progenitoras derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC) son positivas a la albúmina, positivas a vimentina, positivas a la alfa actina del músculo liso, negativas a citoqueratina-19 y negativas a CD133.

- 15

(ii) El medio acondicionado libre de células según (i), en donde las ADHLSC expresan además al menos un marcador seleccionado de CD90, CD73, CD44, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2.

(iii) El medio acondicionado libre de células según (i) o (ii), en donde el medio está libre de suero.

- 20 (iv) Una composición libre de células que se puede obtener fraccionando el medio acondicionado libre de células según cualquiera de (i) a (iii), en donde dicho fraccionamiento puede comprender el filtrado, digestión enzimática, centrifugación, adsorción y/o separación por cromatografía del medio acondicionado libre de células.

(v) El medio acondicionado libre de células según cualquiera de (i) a (iii), o la composición libre de células según (iv), que comprende al menos una de las proteínas solubles seleccionadas del grupo que consiste en el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina (CCL11), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) a una concentración de al menos 1 ng/ml.

- 25

(vi) El medio acondicionado libre de células según cualquiera de (i) a (iii), o (v), o la composición libre de células según uno cualquiera de (iv) o (v), en donde dichas microvesículas son menores de 0,40 µm.

- 30 (vii) El medio acondicionado libre de células según uno cualquiera de (i) a (iii), o (v) a (vi), o la composición libre de células según uno cualquiera de (iv) a (vi) que se concentra al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces.

(viii) El medio acondicionado libre de células según uno cualquiera de (i) a (iii), (v) o (vi), o la composición libre de células según uno cualquiera de (iv) a (vi) que se diluye al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces.

- 35

(ix) Un método para producir un medio acondicionado libre de células que comprende las etapas de cultivar células mastocitos/progenitoras derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de las células, en donde las células mastocitos/progenitoras derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC) son positivas a la albúmina, positivas a vimentina, positivas a la alfa actina del músculo liso, negativas a citoqueratina-19 y negativas a CD133, opcionalmente en donde:

- 40

(a) el medio de cultivo celular es un medio libre de suero; y/o

(b) el medio de cultivo celular se separa de las ADHLSC después de cultivar las ADHLSC en el medio de cultivo celular durante al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas o al menos 24 horas.

- 45 (x) Un método para producir un medio acondicionado libre de células que comprende el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina (CCL11), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) a una concentración de al menos 1 ng/ml que comprende las etapas de cultivar células mastocitos/progenitoras derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de las células, en donde las células mastocitos/progenitoras derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC) son positivas a la albúmina, positivas a vimentina, positivas a la alfa actina del músculo liso, negativas a citoqueratina-19 y negativas a CD133.
- 50

(xi) El método según (ix) o (x), en donde las ADHLSC además expresan al menos un marcador seleccionado de CD90, CD73, CD44, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2.

(xii) El medio acondicionado libre de células de cualquiera de (i) a (iii), o (v) a (viii), o la composición libre de células de cualquiera de (iv) a (viii), para su uso como un medicamento.

5 (xiii) Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno cualquiera del medio acondicionado libre de células de uno cualquiera de (i) a (iii), o (v) a (viii), o la composición libre de células de cualquiera de (iv) a (viii), opcionalmente que comprende además uno o más ingredientes activos exógenos.

10 (xiv) El medio acondicionado libre de células de uno cualquiera de (i) a (iii), o (v) a (viii), la composición libre de células de uno cualquiera de (iv) a (viii), o la formulación farmacéutica según (xiii), para uso en el tratamiento de un trastorno fibrótico.

(xv) El medio acondicionado libre de células de uno cualquiera de (i) a (iii), o (v) a (viii), la composición libre de células de uno cualquiera de (iv) a (viii), o la formulación farmacéutica según (xiii), para uso en el tratamiento de un trastorno del hígado.

15 (xvi) El medio acondicionado libre de células de uno cualquiera de (i) a (iii), o (v) a (viii), la composición libre de células de uno cualquiera de (iv) a (viii), o la formulación farmacéutica según (xiii), para uso en el tratamiento de una lesión de órgano, fallo de órgano, o para uso en el trasplante de órganos o células.

20 Como se ha ilustrado para realizaciones representativas no limitativas de la invención en la sección experimental, una composición libre de células obtenida mediante el cultivo de células mastocitos/progenitoras derivadas de hígado humano adulto (ADHLSC; documento de patente internacional WO2007/071339; Najimi M et al., 2007; Khuu D et al., 2012) en un medio de cultivo celular y aislamiento del medio acondicionado resultante (ADHLSC-CM) tiene componentes y propiedades inesperadamente ventajosos, tales como efectos antifibróticos. Las composiciones de ADHLSC-CM, basadas en ADHLSC-CM, y otros productos relacionados y derivados, pueden usarse en procesos de cultivo celular o como medicamentos, más particularmente para el tratamiento de enfermedades que involucran la lesión de órganos, fallo de órgano, en el trasplante de órganos o células, o la alteración, inflamación, degeneración y/o proliferación patológicas de células dentro de un tejido u órgano, en particular dentro del hígado.

25 Dichas composiciones libres de células comprenden, o se derivan, de medios de cultivo celular que han sido acondicionados por el cultivo de las ADHLSC, en particular aquellos que coexpresan al menos un marcador mesenquimatoso seleccionado de (seleccionado del grupo que consiste en) CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso con al menos un marcador hepático seleccionado de (seleccionado del grupo que consiste en) albúmina, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2. Aún más preferiblemente, las ADHLSC se caracterizan por ser positivas a la albúmina, positivas para vimentina, positivas para la α -actina del músculo liso, negativas para la citoqueratina 19 y negativas para CD133.

30 El medio acondicionado de ADHLSC comprende cantidades útiles de una variedad de moléculas biológicas específicas, que incluyen entre otras los factores de crecimiento, quimioquinas, metaloproteasas de matriz y citoquinas pro y antiinflamatorias cuya combinación dentro del ADHLSC-CM puede proporcionar actividades biológicas útiles. La composición ventajosa y las propiedades del medio acondicionado de las ADHLSC hacen que este medio acondicionado sea claramente cualitativa y funcionalmente diferente de otros medios acondicionados, en particular los obtenidos de células estrelladas hepáticas y células madre mesenquimales (MSC). En consecuencia, ADHLSC-CM o sus fracciones proporcionan nuevos productos y métodos que son útiles en una amplia variedad de aplicaciones, en particular para el tratamiento de enfermedades. En vista del origen hepático de las ADHLSC y el beneficio comprobado del trasplante de ADHLSC en el hígado lesionado, tales enfermedades pueden en particular, pero sin limitación, incluir enfermedades que afecten al hígado.

35 Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona un medio acondicionado libre de células que se puede obtener cultivando células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separando el medio de cultivo celular de las células. Este medio acondicionado libre de células ADHLSC también se puede denotar aquí como "medio acondicionado por ADHLSC", o simplemente ADHLSC-CM. El medio puede obtenerse preferiblemente usando medio libre de suero.

40 Un aspecto adicional de la invención proporciona un producto derivado de ADHLSC-CM, que es una composición libre de células que se puede obtener fraccionando ADHLSC-CM. Tal fraccionamiento puede comprender aplicar una o más tecnologías conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, el filtrado, digestión enzimática, centrifugación, adsorción y/o separación por cromatografía, a ADHLSC-CM.

45 El ADHLSC-CM, así como las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, típicamente contendrán proteínas solubles y/o microvesículas. Si ADHLSC-CM contiene potencialmente estos dos tipos de componentes, dependiendo de la tecnología que se pueda aplicar para obtener o fraccionar las composiciones libres de células como se muestra en el presente documento, esto puede proporcionar un enriquecimiento (o una selección) de ambos o de solo uno de estos tipos de componentes.

Según la especificación, el ADHLSC-CM, así como las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, pueden contener proteínas solubles que comprenden:

(a) al menos una de las proteínas solubles seleccionadas del grupo que consiste en: factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina (CCL11), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8); y, opcionalmente

(b) al menos una de las proteínas solubles seleccionadas del grupo que consiste en metaloproteasas de matriz, factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas.

Dichas proteínas solubles pueden estar presentes preferiblemente en ADHLSC-CM, o en las composiciones sin células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, a una concentración de al menos 1 ng/ml. En particular, uno o más de HGF, VEGF, CCL11, IL-6 o IL-8 (preferiblemente todos ellos) pueden estar presentes en una concentración de al menos 1 ng/ml.

El ADHLSC-CM, así como las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, contienen microvesículas que se caracterizan y, cuando es apropiado, se seleccionan según su tamaño (por ejemplo, tamaño más pequeño que 0,40 µm), peso molecular y/o composición.

Las concentraciones particularmente deseadas de tales proteínas solubles y/o microvesículas dentro del ADHLSC-CM, o dentro de las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, se pueden obtener, por ejemplo, concentrando (o diluyendo) adecuadamente la preparación respectiva al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces. Por lo tanto, la especificación también describe el ADHLSC-CM así concentrado o así diluido, así como las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para producir un medio acondicionado libre de células que comprende las etapas de cultivar las ADHLSC en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de ADHLSC. Por ejemplo, el método puede realizarse usando un medio de cultivo celular que es un medio libre de suero, modificando condiciones específicas de cultivo celular, y/o separando el medio de cultivo celular de las ADHLSC después de cultivar ADHLSC en el medio de cultivo celular durante al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas o al menos 24 horas. Tales ADHLSC preferiblemente coexpresan al menos un marcador mesenquimal seleccionado de CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso con al menos un marcador hepático seleccionado de la albúmina, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para producir una composición libre de células que comprende el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina (CCL11), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) a una concentración de al menos 1 ng/ml, que comprende las etapas de cultivar células madre/progenitoras de hígado humano derivadas de adultos (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de las células.

El ADHLSC-CM y las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, como se pretende en este documento, pueden ser adecuados para diversas aplicaciones. Dichas aplicaciones generalmente pueden abarcar la exposición de las células, tal como preferiblemente, pero sin limitación, células de origen hepático, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, al ADHLSC-CM o a las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM.

La presente especificación describe ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, para su uso como un medicamento.

Dichos usos médicos, por ejemplo, profilácticos o terapéuticos, pueden implicar el uso de ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM solos o en combinación con uno o más ingredientes activos exógenos, que se pueden agregar adecuadamente. Los ejemplos de tales ingredientes activos exógenos incluyen células (por ejemplo, las ADHLSC u otras células adecuadas para aplicaciones *ex vivo* o *in vivo*), proteínas (por ejemplo, metaloproteasas de matriz, factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas, hormonas, antígenos o anticuerpos), nutrientes (por ejemplo, azúcares o vitaminas) y/o productos químicos (por ejemplo, fármacos con propiedades inmunomoduladoras, antifibróticas o antivíricas) que no estaban inicialmente presentes en el ADHLSC-CM o en las composiciones libres de células, y que se sabe que son eficaces como medicamentos para la indicación deseada.

La presente especificación también describe formulaciones farmacéuticas que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de ADHLSC-CM o de las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM. Las formulaciones farmacéuticas también pueden comprender opcionalmente una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más ingredientes activos exógenos, que pueden ser del tipo descrito anteriormente, por ejemplo, células, proteínas, nutrientes y/o productos químicos. La especificación describe además una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de ADHLSC-CM o de las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, y uno o más ingredientes activos

exógenos. Los ingredientes activos exógenos pueden ser del tipo descrito anteriormente, por ejemplo, células, proteínas, nutrientes y/o productos químicos.

La especificación describe además el ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, o la formulación farmacéutica como se define en el presente documento, para su uso en el tratamiento (como profilaxis o terapia) de una serie de trastornos tales como los trastornos fibróticos, trastornos hepáticos, daño o insuficiencia de los órganos, o cualquier otro trastorno patológico, inflamación, degeneración y/o proliferación dentro de un órgano o tejido. Por lo tanto, también se describe en el presente documento el uso del ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, o la formulación farmacéutica como se define en el presente documento, para la preparación de un medicamento para tratar una serie de trastornos tales como los trastornos fibróticos, trastornos del hígado, daño o fallo de los órganos, o cualquier otro trastorno patológico, inflamación, degeneración y/o proliferación dentro de un órgano o tejido.

Además, el ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, o la formulación farmacéutica como se define en el presente documento, o una combinación de dos o más de los mismos, se pueden usar en el trasplante de órganos o células, en un ejemplo preferido, como un tratamiento subsidiario que se puede administrar antes, después o al realizar un trasplante. También se describe en el presente documento por lo tanto el uso del ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, o la formulación farmacéutica como se define en el presente documento, o una combinación de dos o más de los mismos, para la preparación de un medicamento para el trasplante de órganos o células, en un ejemplo preferido, como un tratamiento subsidiario que puede administrarse antes, después o al realizar el trasplante.

La presente especificación describe además un método para tratar un trastorno (tal como en particular un trastorno fibrótico, trastorno hepático o lesión o fallo de los órganos) en un sujeto que necesita dicho tratamiento que comprende la administración de una cantidad eficaz terapéutica o profilácticamente del ADHLSC-CM, o la composición libre de células que se puede obtener fraccionando ADHLSC-CM, o la formulación farmacéutica como se definió anteriormente, al sujeto, aplicando el método y la frecuencia de administración apropiados.

Estos y otros aspectos y realizaciones preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas. El contenido de las reivindicaciones adjuntas se incorpora por este medio específicamente en esta memoria descriptiva.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: perfil de secretoma en el medio de cultivo acondicionado de células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC-CM) y células estrelladas hepáticas (HSC-CM) en ausencia de suero. La secreción de HGF es significativamente mayor en ADHLSC-CM (A), pero un análisis más amplio de factores de crecimiento y secreción de citoquinas en ADHLSC-CM y HSC-CM muestra que muchas otras proteínas están más secretadas en ADHLSC-CM (B, C). Para el análisis de las diferencias estadísticamente relevantes entre ADHLSC-CM y HSC-CM, *** denota un valor de $p < 0,001$, ** denota un valor de $p < 0,01$ y * denota un valor de $p < 0,05$. ns: no significativo.

Fig. 2: efecto de las ADHLSC sobre el número y viabilidad de las HSC en el sistema de cocultivo Transwell®. El efecto de exponer las HSC a las ADHLSC se determina comparando el número de HSC cuando se cultiva en ausencia de ADHLSC (control, 0/1) o cuando se cultiva a una baja relación de ADHLSC/HSC (1/100) en distintos puntos de tiempo (A), y luego utilizando el ensayo bioquímico CCK-8 para determinar el número de HSC post-siembra (B). Para el análisis de diferencias estadísticamente relevantes entre las dos condiciones, ** denota un valor de $p < 0,01$. n: número de donantes para los que se realizó el experimento.

Fig. 3: efecto de las ADHLSC en la proliferación y adherencia de las HSC. El ensayo se basa en la determinación de las HSC flotantes o adherentes en el sistema de cocultivo Transwell® después de cultivar las HSC durante 24 horas en presencia de las ADHLSC que secretan moléculas biológicas que pasan a través de la membrana tratada con colágeno que separa las dos cámaras y tiene un tamaño de poro de $0,4 \mu\text{m}$ (A) o cultivando directamente las HSC en ADHLSC-CM o HSC-CM (B). El efecto sobre el número de las HSC flotantes o adherentes también se ha probado con relaciones ADHLSC/HSC más bajas (1/1000 y 1/10000), pero el número de células flotantes también disminuyó en consecuencia, lo que sugiere que la relación 1/100 es una condición experimental particularmente efectiva para evaluar el efecto de ADHLSC. Para el análisis de diferencias estadísticamente relevantes entre las dos condiciones, ** denota un valor de $p < 0,01$ y * denota un valor de $p < 0,05$. n: número de donantes para los que se realizó el experimento.

Fig. 4: análisis de los efectos del ADHLSC-CM y el HSC-CM sobre la adherencia de las HSC. Las HSC flotantes posterior a la siembra (A) y las HSC adherentes (B) se determinan en puntos de tiempo intermedios después de agregar ADHLSC-CM o HSC-CM. Para el análisis de diferencias estadísticamente relevantes entre los efectos de ADHLSC-CM y HSC-CM, ** denota un valor de $p < 0,01$ y * denota un valor de $p < 0,05$. n: número de donantes para los que se realizó el experimento.

Fig. 5: efectos de las ADHLSC y del ADHLSC-CM sobre el ciclo celular y la proliferación de las HSC. El efecto se evalúa mediante tinción con yoduro de propidio (A, B) y mediante inmunotinción con Ki-67 (C), y muestra el efecto cuantitativo de exponer las HSC a las ADHLSC en el sistema de cocultivo Transwell® (A) o al agregar directamente

- ADHLSC-CM (B, C) sobre el porcentaje de HSC en un estado dado. La inmunotinción Ki67 de las HSC mostró una disminución significativa del número de núcleos inmunoteñidos de las HSC preincubadas durante 24 horas con ADHLSC-CM. De manera similar al efecto sobre las HSC flotantes o adherentes (véase la Fig. 3), a relaciones ADHLSC/HSC más bajas (1/1000 y 1/10000), el efecto sobre el número de HSC que están en la fase G0/G1 o G2/M no es estadísticamente significativo, lo que confirma que la relación 1/100, como se muestra en la Figura, es una condición experimental particularmente efectiva para evaluar el efecto del secretoma de las ADHLSC. Para el análisis de diferencias estadísticamente relevantes entre las diferentes condiciones o entre ADHLSC-CM y HSC-CM, *** denota un valor de $p < 0,001$ y * denota un valor de $p < 0,05$; se indican otros valores de p relevantes. ns: no significativo n: número de donantes con los que se realizó el experimento.
- Fig. 6: efecto de las ADHLSC en la secreción de las HSC de factores relevantes para la fibrogénesis en el sistema de cocultivo Transwell®, tales como el colágeno tipo I (A) y HGF o IL-6 (B). Después de ser expuesto a las ADHLSC durante 24 horas, el medio en la cámara que contenía las HSC se substituyó con medio libre de suero y se incubó durante 24 horas más antes de medir la concentración de estas proteínas que se secretan en este medio libre de suero. Para el análisis de las diferencias estadísticamente relevantes entre los efectos de diferentes condiciones, ** denota un valor de $p < 0,01$. n: número de donantes para los que se realizó el experimento.

Descripción de realizaciones

- Como se usa en el presente documento, las formas singulares "uno", "una", "el", y "los" incluyen referentes tanto en singular como en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- Los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido de" como se usan en el presente documento son sinónimos con "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros recitados, elementos o etapas del método adicionales. Los términos también abarcan "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", que disfrutan de significados bien establecidos en la terminología de patentes.
- La recitación de rangos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de los rangos respectivos, así como los puntos finales recitados.
- El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor que se puede medir tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, está destinado a abarcar variaciones de y desde el valor especificado, tales como variaciones de +/-10% o menos, preferiblemente +/-5% o menos, más preferiblemente +/-1% o menos, y aún más preferiblemente +/-0,1% o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para realizar en la invención divulgada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" es él mismo también específicamente, y preferiblemente, divulgado.
- Mientras que los términos "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más miembros o al menos un miembro de un grupo de miembros, son claros per se, por medio de una mayor ejemplificación, el término abarca, entre otras cosas, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 , etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros. En otro ejemplo, "uno o más" o "al menos uno" pueden referirse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.
- Se incluye la discusión de los antecedentes de la invención en el presente documento para explicar el contexto de la invención. Esto no debe tomarse como una admisión de que ninguno de los materiales mencionados fue publicado, conocido o parte del conocimiento general común en cualquier país a partir de la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.
- A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Por medio de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la invención. Cuando se definen términos específicos en conexión con un aspecto particular de la invención o una realización particular de la invención, dicha connotación se aplica a lo largo de esta especificación, es decir, también en el contexto de otros aspectos o realizaciones de la invención, a menos que se defina lo contrario.
- En los siguientes pasajes, diferentes aspectos o realizaciones de la invención se definen con más detalle. Cada aspecto o realización así definido puede combinarse con cualquier otro(s) aspecto(s) o realización(es) a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.
- En referencia a lo largo de esta especificación a "una realización", "una realización" significa que un aspecto, estructura o característica particular descrito en relación con la realización está incluido en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariencias de las frases "en una realización" o "en alguna realización" en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización, aunque pueden. Además, los aspectos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada, como sería evidente para un experto en la materia a partir de esta divulgación, en una o más realizaciones. Además, aunque algunas realizaciones descritas en el presente documento incluyen algunas pero no otras características

incluidas en otras realizaciones, las combinaciones de características de diferentes realizaciones están destinadas a estar dentro del alcance de la invención y forman diferentes realizaciones, como entenderían los expertos en la materia. Por ejemplo, en las reivindicaciones adjuntas, cualquiera de las realizaciones reivindicadas puede usarse en cualquier combinación.

- 5 Como se ilustra para las realizaciones no limitativas representativas de la invención en la sección experimental, los presentes inventores se dieron cuenta de que una composición libre de células obtenida cultivando células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC; documento de patente internacional WO2007/071339; Najimi M et al., 2007; Khuu D et al., 2012) en medio de cultivo celular y aislando el medio acondicionado resultante (ADHLSC-CM) tiene componentes y propiedades inesperadamente ventajosos, tales como efectos antifibróticos. Las composiciones de ADHLSC-CM basadas en ADHLSC-CM, y otros productos relacionados y derivados, se pueden usar en procesos de cultivo celular o como medicamentos, más particularmente para el tratamiento de enfermedades que involucran las lesiones de los órganos, fallo de los órganos o la alteración, inflamación, degeneración y/o proliferación patológicas de células dentro de un tejido o un órgano, en particular dentro del hígado.
- 10
- 15 El término "células madre o progenitoras hepáticas derivadas de hígado humano de adultos", abreviado como "ADHLSC", como se usa en el presente documento, denota específicamente las células madre o progenitoras humanas originadas a partir de hígado humano adulto como se describe en el documento de patente internacional WO 2007/071339 y se describe en la bibliografía relevante (Najimi et al. 2007; Khuu D et al., 2012). Por lo tanto, el medio acondicionado de las ADHLSC como se enseña en el presente documento (ADHLSC-CM) se obtiene cultivando ADHLSC.
- 20

Adecuadamente, las ADHLSC se obtienen mediante el uso de muestras de hígado adulto, y se caracterizan por la coexpresión de al menos un marcador mesenquimal (preferiblemente uno, más de uno o todos los marcadores CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso) con marcadores hepáticos (preferiblemente uno o más de albúmina, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2). En particular, las ADHLSC típicamente coexpresan α -actina de músculo liso y/o vimentina y albúmina (ALB), pero también se caracterizan por otros criterios, tales como la morfología (morfología de tipo mesenquimal con un citoplasma amplio de forma aplanada, que crece en monocapas), la capacidad de diferenciarse en hepatocitos o células similares a los hepatocitos y no diferenciarse en tipos de células mesodérmicas, y la falta de expresión de otros marcadores tales como citoqueratina-7, citoqueratina-19, Oct-4, CD45, CD34, CD133 y CD117. Por lo tanto, los ejemplos de las ADHLSC que se pueden usar para obtener ADHLSC-CM son positivas a la albúmina, positivas a vimentina, positivas a alfa-actina del músculo liso, negativas a citoqueratina-19 y negativas a CD133.

25

30

Por medio de orientación adicional, las ADHLSC pueden caracterizarse porque coexpresan al menos un marcador mesenquimal con el marcador de hepatocitos albúmina (ALB). Más particularmente, las ADHLSC pueden coexpresar la α -actina de músculo liso (ASMA) y ALB. Aún más particularmente, las ADHLSC pueden coexpresar vimentina, ASMA y ALB. Aún más particularmente, las ADHLSC pueden coexpresar ASMA y ALB, o vimentina, ASMA y ALB, y ser negativas para la citoqueratina-19 (CK-19). La negatividad de las ADHLSC para CK-19 puede determinarse particularmente a nivel de proteína, por ejemplo, mediante la inmunocitoquímica. Aún más particularmente, las ADHLSC pueden expresar CD90, CD73, CD44, vimentina, ASMA y ALB, y ser negativas para CK-19. Las ADHLSC también suelen expresar normalmente otros marcadores, tales como CD29, CD13, citocromo P450 3A4 (CYP3A4), CYP1B1, alfafetoproteína (AFP) y alfa-anti-tripsina. En un ejemplo particular, las ADHLSC pueden caracterizarse así como positivas a CD90, CD29 y CD44, positivas para albúmina, positivas para vimentina y positivas para ASMA, y negativas para CD45, CD34, CD117 y CK-19. En otro ejemplo, las ADHLSC se pueden caracterizar porque expresan CD90, CD73, CD29, CD44, CD13, vimentina, ASMA, ALB, AFP, CYP3A4 y alfa-anti-tripsina. En un ejemplo adicional, las ADHLSC pueden caracterizarse porque expresan CD90, CD73, CD29, CD44, CD13, vimentina, ASMA, ALB, AFP, CYP3A4 y alfa-anti-tripsina, y son negativas para CK-19, y CK-7. En todavía otro ejemplo adicional, las ADHLSC pueden caracterizarse porque expresan CD90, CD73, CD29, CD44, CD13, vimentina, ASMA, ALB, AFP, CYP3A4 y alfa-anti-tripsina, y son negativas para CK-19, CK-7, CD133, CD117, CD45, CD34 y HLA-DR. La positividad y negatividad de las ADHLSC para los diversos marcadores se puede determinar preferiblemente a nivel de proteína, por ejemplo, por inmunocitoquímica. A modo de ejemplo y sin limitación, las ADHLSC pueden mostrar el perfil de expresión del marcador tal como se encuentra en las células depositadas por la Universidad Católica de Luvaina (representada por el profesor Bernard Coulie, rector de la UCL de 2004 a 2009) el 20 de febrero de 2006 en virtud del Tratado de Budapest con las Colecciones belgas coordinadas de microorganismos (Budapest Treaty with the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMBP) con el número de acceso LMBP 6452CB. Se apreciará que las líneas celulares derivadas de células ADHLSC también están abarcadas en el término.

35

40

45

50

En donde se dice que una célula es positiva (o expresa, es decir, comprende la expresión de) un marcador particular, esto significa que una persona experta concluirá la presencia o evidencia de una señal diferente, por ejemplo, detectable por anticuerpos (por ejemplo, inmunocitoquímica o inmunotransferencia) para ese marcador cuando se realiza la medición adecuada, en comparación con los controles adecuados (negativos). Donde el método permite la evaluación cuantitativa del marcador, las células positivas pueden en promedio generar una señal que es significativamente diferente del control, por ejemplo, pero sin limitación, al menos 1,5 veces mayor que la señal generada por las células de control, por ejemplo, al menos 4 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces más, o (preferiblemente) incluso más.

55

60

La expresión de los anteriores marcadores específicos de células se puede detectar usando cualquier técnica inmunológica adecuada conocida en la técnica (tal como la inmunocitoquímica o adsorción de afinidad, análisis de transferencia Western, FACS, ELISA, micromatrices de proteínas, etc.) o cualquier tecnología de secuenciación adecuada para identificar y cuantificar proteínas de muestras biológicas. Los datos de secuencia para los marcadores enumerados en esta divulgación son conocidos y pueden obtenerse de bases de datos públicas como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

Como medio de orientación adicional, los términos "progenitoras" o "células progenitoras" son sinónimos y se refieren en general a una célula no especializada o relativamente menos especializada y con capacidad para la proliferación que puede en condiciones apropiadas dar lugar a al menos un tipo de célula relativamente más especializada, tal como entre otras cosas a células progenitoras relativamente más especializadas o eventualmente a células diferenciadas terminalmente. 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 experimentar previamente la división celular, o si dicha otra célula se produce después de una o más rondas de división celular y/o diferenciación de la célula progenitora.

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

El término "célula madre o progenitora adulta", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula madre o progenitora presente en u obtenida de (tal como aislada de) un organismo en la etapa fetal o después del nacimiento, como por ejemplo en cualquiera de las etapas comúnmente conocidas como "recién nacido", "bebé", "niño", "joven", "adolescente" o "adulto". Por ejemplo, las ADHLSC pueden originarse de fetos humanos o de sujetos humanos en cualquier momento después del nacimiento, preferiblemente a término completo, por ejemplo, de 0-1 mes de edad después del nacimiento, o al menos 1 mes de edad después del nacimiento, por ejemplo, al menos 2 meses, al menos 3 meses, por ejemplo, al menos 4 meses, al menos 5 meses, por ejemplo, al menos 6 meses 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 años o más de edad después del nacimiento.

Las ADHLSC pueden aislarse adecuadamente del hígado humano mediante los métodos enseñados en el documento de patente internacional WO 2007/071339 y descritos adicionalmente por Najimi et al. 2007.

Las ADHLSC también pueden modificarse genéticamente de manera adecuada antes de usarse para producir ADHLSC-CM por los métodos enseñados en el documento de patente internacional WO 2007/071339, en particular para aumentar la capacidad de replicación de las ADHLSC, para mejorar el crecimiento y/o actividad de las ADHLSC, para sobreexpresar de forma constitutiva o inducible un polipéptido, un anticuerpo o una hormona normalmente expresados (y secretados, o no) por los hepatocitos.

Por lo tanto, las ADHLSC se pueden obtener u obtener directamente mediante un método que comprende: (a) disociar el hígado adulto o una parte del mismo para obtener una población de células primarias de dicho hígado adulto o parte del mismo, (b) colocar en placa la población de células primarias en un sustrato que permita la adhesión de las células al mismo, y (c) cultivar las células de la población celular primaria, que se han adherido a dicho sustrato, durante al menos 7 días, preferiblemente al menos 10, al menos 13 o al menos 15 días hasta que la población celular cultivada es al menos 40% y preferiblemente al menos 70% confluyente, permitiendo así la aparición y proliferación de las células madre/progenitoras en la población celular; y (d) aumentar la proporción de las células madre o progenitoras en la población celular pasando la población celular al menos una vez y preferiblemente al menos dos veces, obteniendo así preferiblemente una población sustancialmente homogénea de las células madre/progenitoras. En la etapa (b), preferiblemente, se coloca en placa la población de células parenquimales hepáticas. Típicamente, la población celular puede pasar entre 2 y 8 veces en la etapa (d), durante la cual las ADHLSC se expanden y producen ADHLSC-CM que puede aislarse y caracterizarse.

En un ejemplo particular, el método puede comprender: (a) disociar el hígado adulto humano o una parte del mismo para formar una población de células primarias a partir de dicho hígado adulto o parte del mismo, (b) colocar en placas la población de células primarias en un sustrato que permita la adherencia de las células al mismo, (c) cultivar las células de la población celular primaria, que se han adherido a dicho sustrato, durante al menos 7 días en un medio de cultivo que comprende suero y una combinación de al menos dos factores de crecimiento añadidos exógenamente elegidos del factor de crecimiento epidérmico (EGF), dexametasona e insulina, preferiblemente al menos dexametasona e insulina, más preferiblemente dexametasona e insulina pero no EGF, y (d) intercambiar el medio por medio basal que comprenda glucosa alta a una concentración entre 3.000 mg/l y 6.000 mg/l y cultivar adicionalmente las células, por lo que las ADHLSC emergen y proliferan. En la etapa (b), preferiblemente, se coloca en placas la población de células parenquimales hepáticas. La aparición de las ADHLSC puede facilitarse permitiendo que las

células se vuelvan confluentes aproximadamente en un 70% y pasando las células al menos una vez, y típicamente entre 2 y 8 veces.

En otro ejemplo, el método puede comprender: (a) disociar, preferiblemente mediante un método de collagenasa de dos etapas, el hígado adulto o una parte del mismo de un sujeto humano, para formar una población de células primarias de dicho hígado adulto o parte del mismo; (b) colocar en placa la población de células primarias sobre un sustrato recubierto con colágeno tipo I en medio E de Williams que comprende suero de ternera fetal, preferiblemente 10% (v/v), EGF, preferiblemente 25 ng/ml, insulina, preferiblemente 10 pg/ml y dexametasona, preferiblemente 1 µM; (c) permitir la adherencia de las células de la población de células primarias a dicho sustrato durante 24 horas y luego intercambiar el medio por un medio nuevo que tenga la composición como en (b); (d) cultivar las células en dicho medio de (c) durante dos semanas, preferiblemente 15 días; (e) intercambiar el medio por DMEM que comprende glucosa alta y FCS, preferiblemente 10%, y cultivar adicionalmente las células, por lo que las células progenitoras o madre de la invención emergen y proliferan; (f) permitir que las células se vuelvan confluentes en aproximadamente un 70% y pasar las células al menos una vez y preferiblemente al menos dos veces, en donde las células se colocan en placas sobre el sustrato como en (b) y se cultivan en un medio como en (e). En la etapa (b) preferiblemente la población de células del parénquima hepático está colocada en placas. Típicamente, la población celular puede pasarse entre 2 y 8 veces en la etapa (f).

Se apreciará que en los métodos anteriores, más específicamente durante el cultivo y el paso de las células, las células ADHLSC emergentes se vuelven sobrerrepresentadas gradualmente en la población celular, hasta que se obtiene una población sustancialmente homogénea de las ADHLSC. Este proceso no implica la selección de colonias individuales de células en estas etapas.

El ejemplo específico descrito por Najimi et al. 2007 (supra) es el siguiente. Las suspensiones de células individuales se resuspendieron en medio E de Williams (Invitrogen) suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS) (Perbio, Hyclone), 25 ng/ml de EGF (Peprotech), 10 µg/ml de insulina, dexametasona 1 mM y 1% de penicilina/estreptomina (P/S) (Invitrogen). Las células se colocaron en seis pocillos de placas recubiertas con colágeno I de cola de rata (Greiner Bio-one) y se cultivaron a 37° C en una atmósfera completamente humidificada que contenía 5% de CO₂. Después de 24 horas, se cambió el medio para eliminar las células no adherentes y luego se renovó cada 3 días, mientras que el cultivo se siguió microscópicamente todos los días. El medio de cultivo se cambió entonces a DMEM con altas concentraciones de glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% de FCS y 1% de P/S para acelerar la eliminación de los hepatocitos. Entonces un tipo de célula con una morfología de tipo mesenquimatoso emergió espontáneamente, proliferó y llenó el espacio vacío en la placa del pocillo como se observó por microscopía de contraste de fase. Al alcanzar el 70% de confluencia, las células se levantaron con 0,25% de tripsina y EDTA 1 mM y se volvieron a colocar en placa a una densidad de 1×10^4 células/cm². Las células ADHLSC de tercer a octavo paso se caracterizaron adicionalmente.

Las ADHLSC pueden obtenerse u obtenerse directamente por cualquiera de los métodos anteriores.

Por consiguiente, un método para producir un medio acondicionado libre de células como se enseña en el presente documento puede comprender la etapa de obtener las ADHLSC por cualquiera de los métodos anteriores, cultivar las ADHLSC en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de las ADHLSC.

Las frases sinónimas "sin células" y "libre de células" son generalmente bien entendidas, y en el presente contexto pueden significar particularmente que una composición tal como un medio acondicionado esencialmente no contiene células (ADHLSC) viables, especialmente esencialmente no contiene células (ADHLSC) viables. El grado en que una composición, tal como un medio acondicionado, está libre de células tiende a determinarse en gran medida por la efectividad de los métodos disponibles para separar las células de los medios de cultivo, tales como, por ejemplo, centrifugación o filtración, o repeticiones y/o combinaciones de tales métodos. Para fines prácticos, una composición tal como un medio acondicionado puede considerarse libre de células cuando contiene 5×10^2 o menos células/ml, preferiblemente 100 o menos células/ml, más preferiblemente 50 o menos células/ml, incluso más preferiblemente 25 o menos células/ml, aún más preferiblemente 10 o menos células/ml, aún más preferiblemente 5 o menos células/ml, y lo más preferiblemente ninguna (es decir, 0) células/ml; preferiblemente estos recuentos denotan células viables. Se pueden usar métodos convencionales de recuento de células, tales como la microscopía óptica o citometría de flujo, o el plaqueo y la determinación de unidades de formación de placas y colonias (UFCs). Se pueden utilizar métodos convencionales de determinación de la viabilidad celular, tales como los ensayos de exclusión de colorantes (por ejemplo, azul de tripano o yoduro de propidio).

El término "medio" como se usa en el presente documento abarca ampliamente cualquier medio de cultivo celular que conduzca al mantenimiento y/o proliferación de células; más particularmente propicio para el mantenimiento de las ADHLSC, preferiblemente propicio para la proliferación de ADHLSC. Típicamente, el medio será un medio de cultivo líquido, lo que facilita su fácil manipulación (por ejemplo, la decantación, pipeteo, centrifugación, filtración y similares).

El medio de cultivo adecuado se define en las referencias específicas (documento de patente internacional WO2007/071339; Khuu D et al., 2012) y en los Ejemplos, pero puede adaptarse para obtener el enriquecimiento (o el agotamiento) de elementos específicos. Por ejemplo, el ADHLSC-CM puede obtenerse usando medio sin suero y/o

en presencia o ausencia de nutrientes específicos. La densidad y el número de las ADHLSC en el cultivo celular se puede adaptar al volumen deseado y/o la concentración de proteínas del ADHLSC-CM.

Típicamente, el medio comprenderá una formulación de medio basal como se conoce en la técnica. Muchas formulaciones de medios basales (disponibles, por ejemplo, de la American Type Culture Collection, ATCC; o de Invitrogen, Carlsbad, California) se pueden usar para cultivar las células ADHLSC del presente documento, incluidos, entre otros, el medio mínimo esencial de Eagle (MEM), medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo modificado alfa (alfa-MEM), medio basal esencial (BME), medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), medio BGJb, Mezcla de nutrientes F-12 (Ham), Leibovitz L-15, DMEM/F-12, medio esencial de Eagle modificado (EMEM), RPMI-1640, medio 199, MB 752/1 de Waymouth o medio E de Williams, y sus modificaciones y/o combinaciones. Las composiciones de los medios basales anteriores se conocen generalmente en la técnica y está dentro de la habilidad de un experto en la técnica modificar o modular las concentraciones de medios y/o suplementos de medios según sea necesario para las células cultivadas. Un medio basal particularmente preferido, especialmente para el cultivo de las ADHLSC, puede ser DMEM.

Dichas formulaciones de medios basales contienen ingredientes necesarios para el mantenimiento y la proliferación de células de mamíferos, que son conocidos *per se*. A modo de ilustración y no de limitación, estos ingredientes pueden incluir sales inorgánicas (en particular sales que contienen Na, K, Mg, Ca, Cl, P y posiblemente Cu, Fe, Se y Zn), tampones fisiológicos (por ejemplo, HEPES, bicarbonato), nucleótidos, nucleósidos y/o bases de ácido nucleico, ribosa, desoxirribosa, aminoácidos, vitaminas, antioxidantes (por ejemplo, glutatión) y fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, piruvato de sodio, acetato de sodio), etc.

A modo de ejemplo, un medio para cultivar células de mamífero tales como las ADHLSC puede contener entre 1,0 g/l y 10,0 g/l de D-glucosa, preferiblemente entre 3,0 g/l y 6,0 g/l de D-glucosa, más preferiblemente entre 4,0 g/l y 5,0 g/l de D-glucosa, y lo más preferiblemente 4,50 g/l de glucosa.

Para su uso en cultivo, los medios basales se pueden suplementar con uno o más componentes adicionales. Por ejemplo, se pueden usar suplementos adicionales para suministrar a las células los oligoelementos y sustancias necesarias para el mantenimiento, crecimiento y/o expansión óptimos de las ADHLSC. Además, se pueden agregar suplementos antioxidantes en concentraciones apropiadas, por ejemplo, β -mercaptoetanol o N-acetil-L-cisteína. Si bien muchos medios basales ya contienen aminoácidos, algunos aminoácidos pueden complementarse más tarde, por ejemplo, L-glutamina, que se sabe que es menos estable cuando está en solución. Un medio puede suministrarse además con compuestos antibióticos y/o antimicóticos, tales como, típicamente, mezclas de penicilina y estreptomina, y/o otros compuestos, ejemplificados, pero no limitados a, anfotericina, ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, ácido micofenólico, ácido nalidíxico, neomicina, nistatina, paromomicina, polimixina, puromicina, rifampicina, espectinomicina, tetraciclina, tilosina y zeocina.

Los lípidos y los portadores de lípidos también se pueden usar para suplementar los medios de cultivo celular. Dichos lípidos y portadores pueden incluir, pero sin limitación, ciclodextrina, colesterol, ácido linoleico conjugado con albúmina, ácido linoleico y ácido oleico conjugado con albúmina, ácido linoleico no conjugado, ácido linoleico-oleico-araquidónico conjugado con albúmina, ácido oleico no conjugado y conjugado con albúmina entre otros. La albúmina se puede usar de manera similar en formulaciones libres de ácidos grasos.

También se contempla la suplementación de medios de cultivo celular con plasma o suero de mamíferos. El plasma o los sueros a menudo contienen factores y componentes celulares que facilitan la viabilidad y expansión celular. Opcionalmente, el plasma o el suero pueden inactivarse por calor. La inactivación por calor se usa en la técnica principalmente para eliminar el complemento. La inactivación por calor típicamente implica incubar el plasma o el suero a 56° C durante de 30 a 60 minutos, por ejemplo, 30 minutos, con agitación constante, después de lo cual el plasma o el suero se dejan enfriar gradualmente a temperatura ambiente. Una persona experta estará al tanto de las modificaciones y requisitos comunes del procedimiento anterior. Opcionalmente, el plasma o el suero pueden esterilizarse antes del almacenamiento o uso. Los medios habituales de esterilización pueden incluir, por ejemplo, filtración a través de uno o más filtros con un tamaño de poro más pequeño que 1 μ m, preferiblemente más pequeño que 0,5 μ m, por ejemplo, más pequeño que 0,45 μ m, 0,40 μ m, 0,35 μ m, 0,30 μ m o 0,25 μ m, más preferiblemente 0,2 μ m o más pequeño, por ejemplo, 0,15 μ m o más pequeño, 0,10 μ m o más pequeño. Los sueros o plasmas adecuados para su uso en medios como se enseña en el presente documento pueden incluir suero o plasma humano, o suero o plasma de animales no humanos, preferiblemente mamíferos no humanos, tales como, por ejemplo, primates no humanos (por ejemplo, lémures, monos, simios), suero o plasma fetal o adulto bovino, de caballo, porcino, de cordero, cabra, perro, conejo, ratón o rata, etc., o cualquier combinación de los mismos. Un medio como se enseña en el presente documento puede comprender suero o plasma bovino, preferiblemente suero o plasma fetal bovino (de ternero), más preferiblemente suero fetal bovino (de ternero) (FCS o FBS). Los medios tal como se enseñan en el presente documento pueden comprender suero o plasma humano, tal como suero o plasma humano autólogo o alogénico, preferiblemente suero humano, tal como suero humano autólogo o alogénico, más preferiblemente suero o plasma humano autólogo, incluso más preferiblemente suero humano autólogo.

El suero o el plasma pueden preferiblemente sustituirse en medios como se enseña en el presente documento mediante reemplazos del suero, tal como para proporcionar medios libres de suero (es decir, medios definidos químicamente). La provisión de medios libres de suero puede ser ventajosa particularmente con vistas a la

- administración de los medios o fracción(es) de los mismos a sujetos, especialmente a sujetos humanos (por ejemplo, bioseguridad mejorada). Por el término "reemplazo del suero" se entiende en términos generales cualquier composición que pueda usarse para reemplazar las funciones (por ejemplo, mantenimiento celular y función de soporte del crecimiento) del suero animal en un medio de cultivo celular. Un reemplazo de suero convencional puede comprender típicamente vitaminas, albúmina, lípidos, aminoácidos, transferrina, antioxidantes, insulina y elementos traza. Muchos aditivos de reemplazo del suero comercializados, tales como el KnockOut Serum Replacement (KOSR), N2, B27, suplemento de insulina-transferrina-selenio (ITS) y G5 son bien conocidos y están fácilmente disponibles para los expertos en la materia.
- El reemplazo de plasma o suero o de suero puede estar comprendido en medios como se enseña en el presente documento en una proporción (reemplazo de volumen de plasma o suero o de suero/volumen de medio) entre aproximadamente 0,5% v/v y aproximadamente 40,0% v/v, preferiblemente entre aproximadamente 5,0% v/v y aproximadamente 20,0% v/v, por ejemplo, entre aproximadamente 5,0% v/v y aproximadamente 15,0% v/v, más preferiblemente entre aproximadamente 8,0% v/v y aproximadamente 12,0% v/v, por ejemplo, aproximadamente 10,0% v/v.
- Un medio particularmente preferido, especialmente para el cultivo de las ADHLSC, puede ser DMEM que contenga entre 3,0 g/l y 6,0 g/l de D-glucosa, más preferiblemente entre 4,0 g/l y 5,0 g/l de D-glucosa, lo más preferible 4,50 g/l de glucosa; suplementado con entre 5,0% v/v y 15,0% v/v de suero de ternera fetal (FCS), preferiblemente entre 8,0% v/v y 12,0% v/v de FCS, lo más preferible 10,0% v/v de FCS; y adecuadamente suplementado con antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin. El FCS se sustituye preferiblemente por una cantidad adecuada de reemplazo de suero.
- El término "medio acondicionado" se refiere a un medio que ha sido expuesto a (es decir, en contacto con, cultivado con) células cultivadas en cultivo durante un tiempo suficiente para incluir al menos un componente adicional en el medio, dicho componente producido por las células, que no estaba presente en el medio antes de exponerlo a las células. En otras palabras, un "medio acondicionado" puede considerarse como una composición que comprende productos de secreción celular, tales como, entre otros, proteínas de secreción celular y metabolitos celulares, que previamente han apoyado el mantenimiento y/o la proliferación de células.
- El período de tiempo suficiente para incluir dicho al menos un componente adicional en el medio puede ser en particular suficiente para lograr la secreción por ADHLSC de productos de secreción mixtos (incluyendo proteínas y microvesículas secretadas) en el medio. A modo de ejemplo, dicho período de tiempo puede ser al menos aproximadamente 1 hora, preferiblemente al menos aproximadamente 3 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 6 horas, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 12 horas, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 18 horas, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 24 horas, tal como por ejemplo al menos aproximadamente 36 horas o al menos aproximadamente 48 horas. Típicamente, dicho período de tiempo no será más de aproximadamente 72 horas, más típicamente no más de aproximadamente 60 horas, incluso más típicamente no más de aproximadamente 48 horas.
- Por lo tanto, un medio acondicionado tal como ADHLSC-CM puede obtenerse u obtenerse directamente cultivando las ADHLSC en un medio de cultivo celular, acondicionando así el medio y separando el medio de cultivo celular de las células, obteniendo así el medio acondicionado. Los términos "cultivo" o "cultivo celular" son comunes en la técnica y en general se refieren al mantenimiento de las células y potencialmente a la proliferación de células *in vitro*. Típicamente, las células animales, como las células de mamíferos, tales como las células humanas, se cultivan exponiéndolas (es decir, poniéndolas en contacto) con un medio de cultivo celular adecuado en un recipiente o contenedor adecuado para un experimento (por ejemplo, una placa de 96, 24 o 6 pocillos, un matraz T-25, T-75, T-150 o T-225, o una fábrica de células), en condiciones conocidas en la técnica que conducen al cultivo celular *in vitro*, tal como una temperatura de 37° C, 5% v/v CO₂ y > 95% de humedad.
- Con respecto a las condiciones del cultivo celular, el material para el cultivo celular (por ejemplo, placas, matraces o biorreactores) puede seleccionarse entre los definidos en el documento de patente internacional WO2007/071339, o ponerse a disposición más recientemente e identificarse como adaptado para cultivar células tipo MSC u otras células primarias en particular usando condiciones de uso particulares que hacen posible generar ADHLSC-CM según los requisitos de Buenas Prácticas de Manufactura para productos farmacéuticos basados en células. Preferiblemente, se puede usar cualquier recubrimiento, tratamiento u otro método apropiado para preparar la superficie donde se adhieren y proliferan las células primarias o MSC (y ADHLSC en particular). Por ejemplo, la superficie puede recubrirse con materiales biológicos tales como proteínas de adhesión y de adhesión a la matriz extracelular (por ejemplo, el colágeno, laminina, fibronectina, sulfato de heparina, hialuronidato o sulfato de condroitina, ya sea aplicados individualmente o como mezclas), matrices (por ejemplo, Matrigel™; BD Biosciences). De lo contrario, se puede usar una superficie pretratada (tales como materiales de cultivo celular CELLBIND™, superficies sintéticas Ultra-Web® o superficies tratadas con péptidos sintéticos). Otras condiciones de cultivo celular que pueden adaptarse finamente para obtener ADHLSC-CM que tiene la composición y propiedades deseadas incluyen la temperatura, densidad celular en la siembra y tensión de oxígeno.
- El término "*in vitro*" generalmente denota el exterior, o el exterior del cuerpo animal o humano. El término "*ex vivo*" se refiere típicamente a tejidos o células extraídos de un cuerpo animal o humano y mantenidos o propagados fuera del

cuerpo, por ejemplo, en un recipiente de cultivo. Debe entenderse que el término "*in vitro*" como se usa en el presente documento incluye "*ex vivo*". El término "*in vivo*" generalmente denota dentro de, sobre o interno al cuerpo animal o humano.

5 Cuando se prepara un medio acondicionado, las células por la acción de las cuales se va a acondicionar el medio pueden ponerse en contacto con el medio en una variedad de densidades celulares iniciales. A modo de ejemplo, las células adherentes, es decir, las células capaces de adherirse al plástico de cultivo de tejidos o al (a los) sustrato(s) adherente(s) adecuado(s), tales como ADHLSC, pueden ponerse en contacto con el medio en una confluencia celular inicial de al menos aproximadamente 50%, por ejemplo, al menos aproximadamente 55%, o de al menos aproximadamente 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente 65%, o de al menos aproximadamente 70%, por ejemplo, al menos aproximadamente 75%, o de al menos aproximadamente 80%, por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, o de al menos aproximadamente 90%, por ejemplo, al menos aproximadamente 95%, tal como 96%, 97%, 98%, 99%, o incluso 100% de confluencia celular inicial. El término "confluencia" se refiere a la densidad de las células cultivadas a la que las células se ponen en contacto entre sí cubriendo sustancialmente todas las superficies disponibles para la proliferación celular (es decir, totalmente confluentes).

15 A modo de ejemplo, las células adherentes, tales como las ADHLSC, pueden ponerse en contacto con el medio a una densidad celular inicial de al menos aproximadamente 1000 células/cm² de área de superficie de crecimiento, por ejemplo, de al menos aproximadamente 10.000 células/cm², o de al menos aproximadamente 25.000 células/cm², o de al menos aproximadamente 50.000 células/cm² de área de superficie de crecimiento, por ejemplo, al menos aproximadamente 75.000 células/cm², o de al menos aproximadamente 100.000 células/cm², por ejemplo, al menos aproximadamente 125.000 células/cm² de densidad celular inicial. Por ejemplo, las células adherentes, tales como las ADHLSC, pueden ponerse en contacto con el medio a una densidad celular inicial de no más de aproximadamente 200.000 células/cm², típicamente no más de aproximadamente 175.000 células/cm², más típicamente no más de aproximadamente 150.000 células/cm² de densidad celular inicial. Por lo tanto, a modo de ejemplo, las células adherentes, tales como las ADHLSC, generalmente pueden ponerse en contacto con el medio a una densidad celular inicial de entre aproximadamente 50.000 células/cm² y aproximadamente 125.000 células/cm², tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 75.000 células/cm² y aproximadamente 100.000 células/cm², tal como, por ejemplo, aproximadamente 80.000 células/cm².

30 Cuando se prepara un medio acondicionado, el medio a acondicionar puede proporcionarse en volúmenes comunes en cultivo de tejidos. Típicamente, las células adherentes, tales como las ADHLSC, pueden ponerse en contacto con entre aproximadamente 0,10 ml/cm² de superficie de crecimiento y aproximadamente 0,40 ml/cm² de superficie de crecimiento del medio, más típicamente entre aproximadamente 0,15 ml/cm² y aproximadamente 0,35 ml/cm², incluso más típicamente entre aproximadamente 0,20 ml/cm² y aproximadamente 0,30 ml/cm².

35 Preferiblemente, particularmente pero sin limitación cuando el medio acondicionado o producto(s) derivados del mismo están destinados a la administración a sujetos, especialmente a sujetos humanos, el medio puede carecer de suero o plasma xenogénico, es decir, suero o plasma que se origina de un organismo de una especie distinta de la especie del sujeto al cual se administrarán el medio acondicionado o producto(s) derivado del mismo. En un ejemplo, cualquier plasma o suero contenido en el medio solo puede ser suero o plasma alogénico, es decir, suero o plasma que se origina de un miembro de la misma especie que la especie del sujeto al que se administra el medio acondicionado o producto(s) derivados del mismo, pero no del sujeto. En otro ejemplo, cualquier plasma o suero contenido en el medio solo puede ser suero o plasma autólogo, es decir, suero o plasma que se origina del sujeto al que se administrará el medio acondicionado o producto(s) derivado(s) del mismo. En todavía otro ejemplo particularmente preferido, el medio puede carecer de suero o plasma, es decir, ser un medio libre de suero. La provisión de estos medios puede mejorar el perfil de bioseguridad y/o el perfil inmunológico del medio.

45 El método para producir un medio acondicionado libre de células puede comprender las etapas de cultivar las ADHLSC, que en particular coexpresan al menos un marcador mesenquimal seleccionado de CD90, CD73, CD44, vimentina y α -actina de músculo liso con al menos un marcador hepático seleccionado de albúmina, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2, en un medio de cultivo celular y separando el medio de cultivo celular de ADHLSC. Este método se puede realizar utilizando un medio de cultivo celular y separando el medio de cultivo celular de las ADHLSC después de cultivar las ADHLSC en puntos de tiempo dados (por ejemplo, al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas o al menos 24 horas) en el ámbito de obtener un ADHLSC-CM que tiene una composición enriquecida (o empobrecida) en proteínas solubles y/o microvesículas que son o degradadas (o inestables) en los medios acondicionados o secretadas por las ADHLSC no de manera regular sino solo antes o después de un cierto número de horas (y por lo tanto no se acumulan progresivamente en el ADHLSC-CM). Los puntos de tiempo relevantes pueden ser muy cortos (por ejemplo, 2 horas o menos) o más largos, tales como a las 24 horas (como en los Ejemplos), a las 36 horas o más horas. Al obtener muestras de ADHLSC-CM en estos puntos de tiempo o en los intermedios (tales como 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas o 18 horas) y analizar dichas muestras para determinar su composición y/o actividades, se puede determinar el momento óptimo para obtener el ADHLSC-CM deseado.

60 Preferiblemente, particularmente pero sin limitación, cuando el medio acondicionado o producto(s) derivado(s) del mismo está destinado a la administración a sujetos, especialmente a sujetos humanos, el medio puede fabricarse de manera que se garantice el cumplimiento de las pautas de las buenas prácticas de fabricación (GMP). El medio

acondicionado puede esterilizarse, tal como convenientemente pasándolo a través de un filtro microbiológico que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,20 µm, por ejemplo, entre 0,20 µm y 0,25 µm, por ejemplo, 0,21 µm, 0,22 µm, 0,23 µm o 0,24 µm.

5 Un medio acondicionado puede separarse de las células utilizadas para acondicionar el medio mediante cualquier técnica disponible. Las técnicas convencionales incluyen, por ejemplo, la eliminación del medio de un recipiente de cultivo por decantación o pipeteo, centrifugación del medio para sedimentar las células, fragmentos de células y partículas presentes en el mismo (por ejemplo, centrifugación a entre aproximadamente 100 x g y aproximadamente 2.000 x g, como entre aproximadamente 500 x g y aproximadamente 1.500 x g, tal como aproximadamente 1.000 x g, durante aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, tal como entre aproximadamente 10 minutos y 10 minutos, tal como durante aproximadamente 15 minutos), filtración del medio para filtrar las células, fragmentos de células y partículas presentes en ellos (por ejemplo, filtración a través de un filtro microbiológico estándar que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1,0 µm o menos, preferiblemente de aproximadamente 0,8 µm o menos, más preferiblemente de aproximadamente 0,6 µm o menos, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,4 µm o menos, tal como preferiblemente aproximadamente 0,2 µm). Se apreciará que se pueden emplear repeticiones y/o combinaciones de tales métodos para lograr una separación comparativamente más completa.

Por lo tanto, la separación de ADHLSC-CM de las ADHLSC se puede realizar simplemente transfiriendo el sobrenadante del recipiente de cultivo de las ADHLSC (por decantación o pipeteo) en un recipiente separado y, opcionalmente, repitiendo y/o combinando la filtración (por ejemplo, filtración a través de un filtro microbiológico estándar que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1,0 µm o menos, preferiblemente de aproximadamente 0,8 µm o menos, preferiblemente de aproximadamente 0,6 µm o menos, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,4 µm o menos, tal como preferiblemente de aproximadamente 0,2 µm) o centrifugación breve de este sobrenadante de cultivo celular a baja velocidad (por ejemplo, centrifugación a entre aproximadamente 100 x g y aproximadamente 2.000 x g, tal como entre aproximadamente 500 x g y aproximadamente 1.500 x g, tal como a aproximadamente 1.000 x g, durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, tal como entre aproximadamente 10 minutos y 20 minutos, tal como durante aproximadamente 15 minutos), en el ámbito de la granulación de cualquier célula restante, restos celulares o partículas. De esta manera, se obtiene una preparación libre de células como sobrenadante de la centrifugación y luego se puede usar para determinar la identidad y concentración de las moléculas biológicas que están presentes, tales como proteínas solubles o microvesículas tal como se define a continuación, y según tecnología comúnmente disponible tal como los inmunoensayos, espectrometría o ensayos enzimáticos.

Como se establece en la sección experimental, los inventores demostraron que en un sistema de cocultivo en donde las ADHLSC se separaron de las células estrelladas hepáticas (HSC) mediante un inserto de membrana de PTFE de poro de 0,4 µm, las ADHLSC ejercieron efectos deseables sobre las HSC. Esto ilustra que al menos algunos productos de secreción de las ADHLSC, que ejercen un efecto sobre las HSC, pasan a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,4 µm. Por consiguiente, el medio acondicionado se puede filtrar a través de un filtro que tiene un tamaño de poro no menor de aproximadamente 0,4 µm, tal como, por ejemplo, que tiene un tamaño de poro entre aproximadamente 0,4 µm y aproximadamente 1,0 µm o menos, preferiblemente entre aproximadamente 0,4 µm y aproximadamente 0,8 µm o menos, más preferiblemente entre aproximadamente 0,4 µm y aproximadamente 0,6 µm o menos, tal como aproximadamente 0,4 µm, por ejemplo, 0,40 µm, 0,41 µm, 0,42 µm, 0,43 µm, 0,44 µm o 0,45 µm.

40 El medio acondicionado puede esterilizarse, tal como convenientemente pasándolo a través de un filtro microbiológico que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,20 µm, por ejemplo, entre 0,20 µm y 0,25 µm, por ejemplo, 0,21 µm, 0,22 µm, 0,23 µm o 0,24 µm.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un producto derivado de ADHLSC-CM, que es una composición libre de células que se puede obtener fraccionando ADHLSC-CM ("Fracción de ADHLSC-CM").

45 Por lo tanto, ADHLSC-CM se puede usar directamente para evaluar la actividad biológica o para cualquier aplicación apropiada, pero se puede usar para obtener una composición libre de células después de otras etapas de procesamiento, tales como fraccionamiento o cualquier otra etapa de procesamiento apropiada que se pueda combinar para permitir obtener composiciones libres de células que contengan todas (o parte) de las moléculas biológicas secretadas por ADHLSC en ADHLSC-CM, en particular utilizando cualquier técnica de separación de proteínas apropiada .

50 El fraccionamiento de ADHLSC-CM se puede realizar por filtración, para distinguir entre los componentes que pasan a través de la membrana y los retenidos. Dependiendo de las características de la membrana y la composición y/o uso deseados, la fracción de interés puede ser una u otra. Por ejemplo, al hacer uso de membranas que tienen un tamaño de poro de 0,4 µm, 0,2 µm o menos, la fracción que atraviesa la membrana posiblemente se enriquecerá en proteínas solubles y microvesículas más pequeñas, mientras que la membrana retendrá microvesículas más grandes. Esas dos fracciones pueden representar distintas composiciones libres de células derivadas de ADHLSC-CM que pueden probarse y luego usarse para diferentes aplicaciones.

Otros medios para fraccionar ADHLSC-CM implican la digestión enzimática de ADHLSC-CM (para eliminar componentes específicos de ADHLSC-CM), centrifugación (especialmente a alta velocidad, para granular

componentes específicamente deseados o no deseados de ADHLSC-CM), adsorción (mediante el uso de heparina u otro compuesto que retenga componentes específicamente deseados o no deseados de ADHLSC-CM), y/o separación por cromatografía (incluyendo cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía en gel, intercambio iónico, cromatografía de afinidad por quelatos metálicos, purificación por HPLC y cromatografía de interacción hidrofoba), usando matrices o cuentas que tienen un tamaño específico hidrofobicidad y/o afinidad por un ligando.

El ADHLSC-CM y las fracciones de ADHLSC-CM comprenden proteínas solubles, juntas o no con microvesículas. Dichas proteínas solubles forman combinaciones específicas en donde la proporción entre proteínas y su absoluto puede variar. Sin embargo, ADHLSC-CM está particularmente enriquecido en una serie de factores de crecimiento y citoquinas que, por sí solas, o preferiblemente en una combinación que comprende parte o todas ellas, contribuyen a definir la composición básica y, al menos en parte, las principales actividades biológicas de ADHLSC-CM. Estas proteínas solubles son el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la eotaxina (CCL11), la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-8 (IL-8). Cada uno, algunos o todos ellos están presentes en una concentración de al menos 1 ng/ml. Las proteínas solubles adicionales que pueden estar presentes en concentraciones similares (pero a concentraciones más bajas) se seleccionan de las metaloproteasas de matriz (tales como MMP-2 y MMP-1), factores de crecimiento (tales como GM-CSF o PDGF-bb, quimiocinas (tales como RANTES o MIP-1a), y citoquinas (tales como IFN-gamma, TNF-alfa, IL-10 u otras proteínas que pertenecen al grupo de interleucinas), y otras que pueden identificarse separando y analizando ADHLSC-CM según la afinidad, actividad o tamaño (por ejemplo, por debajo de 3 kDa, 10 kDa, 20 kDa o 50 kDa) de las proteínas. Dependiendo de la concentración real de dichas proteínas solubles dentro de la fracción de ADHLSC-CM, puede usarse en consecuencia para purificar cualquiera de dichas proteínas.

La identificación de proteínas solubles que están presentes en ADHLSC-CM y que caracterizan una o más de sus características biológicas y funcionales, se puede realizar mediante el uso de las tecnologías que se aplican comúnmente para determinar el secretoma de un tipo de célula o una población celular, en paralelo al transcriptoma y el proteoma generales, como se describe en la bibliografía (Eichelbaum K et al. 2012; Mukherjee P y Mani S, 2013). En particular, los principales hallazgos sobre la composición y las actividades del secretoma de ADHLSC según lo presentado por ADHLSC-CM pueden determinarse en relación con las actividades hepáticas, como se muestra en la bibliografía para otros tipos de secretomas celulares para tratamientos en la medicina regenerativa dirigida al hígado (Wu X y Tao R, 2012; Khuu D et al., 2012; Puglisi M et al. 2011). Algunas de las actividades relevantes para el hígado de tales secretomas que se han demostrado (al menos *in vitro*) incluyen la disminución de la capacidad de invasión de las células tumorales del hígado (Li G et al., 2010; Cavallari C et al., 2013; Qiao L et al., 2008; documento de patente internacional WO 2011070001), capacidad de respuesta a la estimulación sérica inflamatoria (Yagi H et al, 2009), o bloqueo de la transición epitelial a mesenquimal relevante para las actividades fibróticas (Ueno T et al., 2013).

Cuando el ADHLSC-CM, así como las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM, contienen también (o solo) microvesículas, pueden caracterizarse y, cuando sea apropiado, seleccionarse según su tamaño (por debajo de 1, 0,8, 0,4 o 0,2 μm), peso molecular (superior a 100 kDa, 300 kDa, 500 kDa o 1.000 kDa), y/o composición (en términos de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos) utilizando tecnologías tales como la filtración, (ultra)centrifugación (por ejemplo, a una fuerza g comprendida entre aproximadamente 20,000 y 300,000 g, preferiblemente entre aproximadamente 80,000 y 200,000 g) o cromatografía.

El término "fracción", como se usa en el presente documento, tiene como objetivo denotar ampliamente el resultado de un proceso de separación, en el que una mezcla (por ejemplo, un sólido, líquido, soluto o suspensión) se divide, es decir, se separa en dos o más cantidades más pequeñas ("fracciones") en las que cambia la composición. Por lo tanto, la composición de una fracción se altera en comparación con, es decir, es distinta de la composición de la mezcla sometida al fraccionamiento.

Particularmente se pretende en el presente documento fracciones "activas" del medio acondicionado de ADHLSC-CM ("Fracciones de ADHLSC-CM"), es decir, fracciones que retienen al menos parcialmente la actividad o actividades deseadas del medio acondicionado de las ADHLSC. Por ejemplo, una fracción activa de ADHLSCCM puede retener algunas, por ejemplo, una o más, pero no todas las actividades de ADHLSC-CM. En otro ejemplo, una fracción activa de ADHLSC-CM puede retener todas las actividades de ADHLSC-CM, pero en menor grado que ADHLSC-CM. En otro ejemplo más, una fracción activa de ADHLSC-CM puede retener todas las actividades de ADHLSC-CM, en el mismo grado que ADHLSC-CM. La retención de una actividad o actividades dadas en una fracción de ADHLSC-CM puede evaluarse fácilmente mediante ensayos adecuados *in vitro* o *in vivo*.

Como se pretende en el presente documento, una "fracción" de ADHLSC-CM puede todavía contener preferiblemente una pluralidad de componentes. Por ejemplo, una "fracción" de ADHLSC-CM puede contener preferiblemente una pluralidad de, por ejemplo y sin limitación, al menos aproximadamente 5, o al menos aproximadamente 10, o al menos aproximadamente 20, o al menos aproximadamente 30, o al menos aproximadamente 40, o al menos aproximadamente 50, o al menos aproximadamente 100 o más proteínas solubles distintivas.

Por medio de una explicación adicional, cualquier método de fraccionamiento conocido puede usarse para fraccionar ADHLSC-CM. Por ejemplo, los componentes de las proteínas pueden separarse de ADHLSC-CM como una fracción de proteína utilizando métodos estándar, tales como la centrifugación y la ultracentrifugación para eliminar las estructuras membranosas y los ácidos nucleicos grandes, y el tratamiento con nucleasa (ADNasa, ARNasa) para

eliminar los ácidos nucleicos. De este modo, puede obtenerse una fracción enriquecida en o que comprende principalmente (o sea, que consiste esencialmente en o incluso consiste en) los constituyentes proteicos del ADHLSC-CM. Tal fracción de proteína puede fraccionarse adicionalmente en dos o más sub-fracciones de proteína, por ejemplo sobre la base de uno cualquiera o más de (1) carga (por ejemplo, el fraccionamiento basado en el punto isoelectrico utilizando geles graduados en el pH o columnas de intercambio iónico), (2) tamaño o peso molecular (por ejemplo, fraccionamiento usando cromatografía de exclusión por tamaño o electroforesis en gel), (3) polaridad/hidrofobia (por ejemplo, fraccionamiento usando cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía de fase inversa), (4) afinidad a una sustancia (por ejemplo, fraccionamiento usando cromatografía de inmunofinidad) o (5) unión a sulfato de heparina (por ejemplo, fraccionamiento usando una columna de heparina). Como se pretende en el presente documento, una fracción de proteínas de secreción de las ADHLSC puede todavía contener preferiblemente una pluralidad de componentes, por ejemplo, una pluralidad de proteínas de secreción.

Tal fraccionamiento puede comprender así aplicar una o más tecnologías conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración, digestión enzimática, centrifugación, adsorción y/o separación por cromatografía, a ADHLSC-CM.

Por lo tanto, también se proporciona una fracción aislada del medio acondicionado de ADHLSC, teniendo dicha fracción una composición distinta de la composición del medio acondicionado. Un aspecto relacionado proporciona un método para producir la fracción del medio acondicionado de ADHLSC que comprende aislar la fracción del medio acondicionado.

El término "aislado" con referencia a un componente particular generalmente denota que dicho componente existe en separación de, por ejemplo, ha sido separado de o preparado y/o mantenido separado de uno o más componentes de su entorno natural. El término "aislado" como se usa en el presente documento también puede abarcar preferiblemente el calificador "purificado". A modo de ejemplo, el término "purificado" con referencia a una sustancia no requiere la pureza absoluta. En cambio, denota que dicha sustancia se encuentra en un entorno discreto en el que su abundancia (expresada convenientemente en términos de masa, peso o concentración) en relación con otras sustancias relevantes es mayor que en el material que fue sometido a la purificación. Un entorno discreto denota un medio único, tal como por ejemplo una solución, gel, precipitado, liofilizado, etc. únicos.

Por ejemplo, las microvesículas pueden separarse de ADHLSC-CM como una fracción de microvesículas utilizando métodos estándar. Las microvesículas derivadas de células (MV) son pequeñas vesículas liberadas por células que expresan los antígenos característicos de la célula de la que se originan y transportan los componentes de la membrana y el citoplasma y se han descrito como un nuevo mecanismo de comunicación celular. La MV puede contribuir a la regeneración y reparación de tejidos. La MV puede ser típicamente de forma esferoide con diámetros dentro del rango de 50 nm a 5 µm, más típicamente entre 0,2 y 1 µm. Si la partícula no tiene forma esferoide, los valores mencionados anteriormente se refieren a la dimensión más grande de la partícula. Las microvesículas se desprenden de casi todos los tipos de células que se originan directamente de la membrana plasmática de la célula y reflejan el contenido antigénico de las células de las que se originan. Las microvesículas pueden desempeñar un papel en la comunicación intercelular entre las células, incluso en sitios distantes, y pueden transportar ARNm, ARNm y proteínas que pueden tener diversos efectos sobre las células que interactúan con ellas, tales como la inmunomodulación o la proliferación. Los métodos para aislar la fracción MV pueden incluir ultracentrifugación, por ejemplo, ultracentrifugación (repetida) de ADHLSC-CM a 100.000 g durante 1 hora a 4° C, y resuspensión de la pelet en un medio o tampón adecuado. De este modo, se obtiene una fracción de ADHLSC-CM enriquecida en o que comprende principalmente (por ejemplo, que consiste esencialmente o incluso que consiste en) MV del CM.

También se proporciona en el presente documento una fracción de ADHLSC-CM aislada de dichas proteínas de secreción mixtas, teniendo dicha fracción una composición distinta de la composición de las proteínas de secreción mixtas. El término "proteínas de secreción mixtas" se usa en el presente documento para referirse convenientemente a la colección o la pluralidad de productos proteicos de las ADHLSC encontrados en ADHLSC-CM.

Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a compuestos formados por una cadena única de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El término "proteína" tal como se usa en el presente documento puede ser sinónimo de los términos "péptido" y "polipéptido" (es decir, los dos últimos términos están dentro del ámbito del término "proteína") o pueden referirse, además, a un polipéptido (un compuesto formado por una sola cadena de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos) complejados con uno o más polipéptidos iguales o distintos. El complejo puede mantenerse mediante interacciones no covalentes y/o enlaces covalentes, por ejemplo, enlaces disulfuro, entre los polipéptidos constituyentes. Además, el término "proteína" puede referirse a péptidos, polipéptidos o proteínas en los que uno o más residuos de aminoácidos se modifican por modificación post-translacional, que incluye, pero no se limitan a, glucosilación, fosforilación, formación de enlaces disulfuro intra o intermoleculares, y similares.

La frase "proteínas de secreción mixtas" no debe considerarse como una indicación de que la colección de proteínas se limitaría a aquellas que han sido secretadas por la maquinaria de secreción de las células. En cambio, la frase está destinada a cubrir cualquier proteína celular que haya ingresado al medio. Sin embargo, las proteínas que han sido secretadas por la maquinaria de secreción de las células pueden constituir miembros prominentes y preferidos de la colección.

Una preparación de microvesículas mixtas aisladas producidas por las ADHLSC representa una fracción de ADHLSC-CM, dicha fracción tiene una composición distinta de la composición del ADHLSC-CM inicial. El término "microvesículas mixtas" se usa en el presente documento para referirse convenientemente a la colección o la pluralidad de microvesículas producidas por las ADHLSC, encontradas en ADHLSC-CM, y preferiblemente aisladas como una fracción de ADHLSC-CM.

ADHLSC-CM o la fracción de ADHLSC-CM puede concentrarse en comparación con el medio separado directamente de las células utilizadas para acondicionarlo, o en comparación con las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM. Por ejemplo, los productos pueden estar así concentrados al menos aproximadamente 5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 25 veces, o al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces. Se puede emplear cualquier técnica adecuada para eliminar el exceso de componentes líquidos y concentrar el ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, tal como sin limitación, la ultrafiltración, evaporación, diálisis, liofilización y similares. Por ejemplo, los productos líquidos pueden concentrarse usando unidades de ultrafiltración para la centrifugación con membranas que tienen un tamaño de poro y/o un límite de peso muy pequeños. Las proteínas y otros componentes solubles de los productos líquidos pueden concentrarse mediante el uso de unidades de ultrafiltración con un límite de peso molecular de 3 kD (Amicon Ultra-PL 3, Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). El producto líquido que se concentra por ultrafiltración retiene la mayoría de sus proteínas y actividades biológicas generales debido a que sus componentes no pasan a través del filtro. De lo contrario, al usar un límite mayor y/o etapas preliminares de centrifugación diferencial, la concentración puede estar asociada a un fraccionamiento adicional de ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM (por ejemplo, eliminando componentes de menor peso y tamaño molecular).

ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, puede diluirse en comparación con el medio separado directamente de las células utilizadas para acondicionarlo, o en comparación con las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM. Por ejemplo, los productos pueden diluirse así al menos aproximadamente 5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 25 veces. A modo de ejemplo, los productos pueden diluirse así no más de aproximadamente 50 veces, por ejemplo, no más de aproximadamente 40 veces o no más de aproximadamente 30 veces. Por lo tanto, a modo de ejemplo, los productos pueden diluirse entre aproximadamente 5 veces y aproximadamente 50 veces, o entre aproximadamente 10 veces y aproximadamente 40 veces, o entre aproximadamente 20 veces y aproximadamente 30 veces, por ejemplo, aproximadamente 25 veces. Los productos líquidos pueden diluirse adecuadamente mezclándolos con un disolvente acuoso, por ejemplo, agua destilada, solución fisiológica (0,90% p/v de NaCl), medio, tampón y similares. La dilución, o la reconstitución de una preparación de productos líquidos previamente liofilizada o de otro modo (crio-)conservada, puede realizarse agregando la cantidad requerida de medios no acondicionados o cualquier solución libre de células apropiada, tal como un tampón (por ejemplo, PBS) u otras soluciones fisiológicas que sean compatibles con otros usos (por ejemplo, administración a un sujeto).

Por lo tanto, en cualquier momento antes, durante o después del fraccionamiento, se puede obtener la concentración deseada de las proteínas solubles y/o microvesículas dentro de ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM concentrando adecuadamente (o diluyendo) dicha preparación al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces o de cualquier manera intermedia apropiada (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 veces, 7 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o 75 veces). Si es necesario, las etapas de concentración y dilución pueden alternarse para obtener un producto de ADHLSC-CM que presente la actividad, el volumen y/o composición apropiados para su uso posterior.

También se proporcionan cualquiera de los productos mencionados anteriormente, en particular ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, o sus combinaciones con otros productos, que son adecuados para usos terapéuticos. Por lo tanto, un aspecto proporciona ADHLSC-CM o las fracciones de ADHLSC-CM o cualquier otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) divulgado(s) en el presente documento, incluyendo combinaciones de dicho(s) producto(s) con ADHLSC o cualquier otra preparación celular que pueda administrarse para obtener una actividad terapéutica, para usar como medicamento. Dada la diversidad de acciones útiles de los productos que se derivan de ADHLSC-CM, tales como sus acciones tróficas, inmunomoduladoras y/o antifibróticas, pueden proporcionar beneficios en una variedad de indicaciones médicas, ejemplos de los cuales se establecen en otra parte de esta especificación.

Si tales ADHLSC-CM o fracciones de ADHLSC-CM se prueban inicialmente sin incluir otros compuestos exógenos, la adición de tales compuestos puede ser apropiada para tener un efecto terapéutico mejorado (si no sinérgico) a concentraciones específicas. Una lista de compuestos exógenos que son ingredientes activos que se pueden combinar con ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM incluye células (en particular las que tienen origen hepático y/o función mesenquimal, tales como las ADHLSC u otras células adecuadas para aplicaciones ex vivo o in vivo), proteínas (por ejemplo, metaloproteasas de matriz, factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas, hormonas, antígenos o anticuerpos), nutrientes (por ejemplo, azúcares o vitaminas) y/o productos químicos (por ejemplo, fármacos con propiedades terapéuticas inmunomoduladoras, antifibróticas, antiviricas u otras) que inicialmente no estaban presentes en ADHLSC-CM o en una fracción de ADHLSC-CM y que se sabe que son eficaces como medicamento para una indicación dada. El uso de modelos animales específicos y datos clínicos, así como la comprensión del

mecanismo biológico subyacente, pueden contribuir a definir qué compuestos adicionales se pueden agregar, a qué concentración y, finalmente, qué método u horario de administración usar.

5 En consecuencia, dichos usos médicos, por ejemplo, profilácticos o terapéuticos, pueden implicar el uso de ADHLSC-CM, una fracción de ADHLSC-CM u otra (combinación de) producto(s) adecuada como se divulga en este documento solos o en combinación con uno o más ingredientes activos exógenos, que se pueden agregar adecuadamente.

El ADHLSC-CM o la fracción de ADHLSC-CM puede formularse adecuadamente como una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de cualquier ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM.

10 Por consiguiente, un aspecto adicional proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM u otra (combinación) de producto(s) adecuada como se divulga en este documento. Las formulaciones farmacéuticas también pueden comprender opcionalmente una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más ingredientes activos exógenos, que pueden ser del tipo descrito anteriormente, por ejemplo, células, proteínas, nutrientes y/o productos químicos.

Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones farmacéuticas pueden formularse convenientemente en composiciones o kits de partes.

15 Las formulaciones farmacéuticas que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, pueden contener excipientes y otros compuestos que permitan la correcta conservación, estabilidad o administración de la composición farmacéutica. Además, se puede proporcionar una cantidad adicional farmacéuticamente eficaz de uno o más ingredientes activos exógenos (células, proteínas, nutrientes y/o productos químicos) en la formulación farmacéutica según el análisis preliminar definido como se describió brevemente anteriormente.

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

25 Como se usa en el presente documento, "vehículo" o "excipiente" incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes, tampones (tales como, por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), solubilizantes, coloides, medios de dispersión, vehículos, rellenos, agentes quelantes (tales como, por ejemplo, EDTA o glutatión), aminoácidos (tales como, por ejemplo, glicina), proteínas, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, aromatizantes, espesantes, agentes para lograr un efecto de depósito, recubrimientos, agentes antifúngicos, conservantes, antioxidantes, agentes de control de la tonicidad, agentes retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se puede contemplar su uso en las composiciones terapéuticas.

35 Vehículos ilustrativos y no limitantes para usar en la formulación de las composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, composiciones acuosas con o sin inclusión de codisolventes orgánicos adecuadas para uso intravenoso (IV) o para inyecciones en otros lugares, liposomas o vesículas, microesferas, microesferas y microsomas que contienen tensioactivos, polvos, comprimidos, cápsulas, supositorios, suspensiones acuosas, aerosoles y otros vehículos evidentes para un experto en la materia.

40 Las composiciones farmacéuticas como se pretende en el presente documento, tales como en particular el ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, se pueden formular esencialmente para cualquier vía de administración, tal como por ejemplo, sin limitación, administración oral (como, por ejemplo, ingestión oral o inhalación), administración intranasal (como, por ejemplo, inhalación intranasal o aplicación a la mucosa intranasal), administración parenteral (tal como, por ejemplo, inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrahepática, intraesplénica, intraperitoneal o intraesternal), transdérmica o transmucosal (tal como, por ejemplo, administración oral, sublingual, intranasal), administración tópica, rectal, vaginal o instilación intratraqueal, y similares. De esta manera, los efectos terapéuticos alcanzables por los métodos y composiciones de la invención pueden ser, por ejemplo, sistémicos, locales, específicos de tejido, etc., dependiendo de las necesidades específicas de una aplicación dada de la invención.

50 Por ejemplo, para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos lacados, comprimidos recubiertos (por ejemplo, recubiertos de azúcar), gránulos, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas, jarabes, emulsiones o suspensiones. En un ejemplo, sin limitación, la preparación de formas de dosificación oral se puede llevar a cabo adecuadamente mezclando de manera uniforme e íntima una cantidad adecuada del compuesto activo en forma de polvo, opcionalmente incluyendo también uno o más vehículos sólidos finamente divididos, y formulando la mezcla en una pastilla, comprimido o cápsula. Los vehículos sólidos ejemplares pero no limitativos incluyen el fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares (tales como, por ejemplo, glucosa, manosa, lactosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (tales como, por ejemplo, manitol), dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de baja fusión y resinas de intercambio iónico. Los comprimidos que contienen la composición farmacéutica se pueden preparar

mezclando de manera uniforme e íntima el ingrediente activo con un vehículo sólido tal como el descrito anteriormente para proporcionar una mezcla que tenga las propiedades de compresión necesarias, y luego compactar la mezcla en una máquina adecuada con la forma y el tamaño deseados. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada, una mezcla de compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los vehículos adecuados para cápsulas y supositorios de gelatina blanda son, por ejemplo, las grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o endurecidos, etc.

Por ejemplo, para la administración por inhalación o en aerosol oral o nasal, las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos ilustrativos, tales como, por ejemplo, en solución con solución salina, polietilenglicol o glicoles, DPPC, metilcelulosa, o en mezcla con agentes dispersantes en polvo, además empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración en forma de aerosoles o pulverizaciones son, por ejemplo, las soluciones, suspensiones o emulsiones de los compuestos de la invención o sus sales fisiológicamente tolerables en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como etanol o agua, o una mezcla de tales disolventes. Si se requiere, la formulación también puede contener adicionalmente otros auxiliares farmacéuticos, tales como los tensioactivos, emulsionantes y estabilizadores, así como un propelente. De manera ilustrativa, la administración puede realizarse mediante el uso de un dispositivo de administración de un solo uso, un nebulizador de neblina, un inhalador de polvo activado por la respiración, un inhalador de dosis medida en aerosol (MDI) o cualquier otro de los numerosos dispositivos de administración de nebulizador disponibles en la técnica. Además, también se pueden utilizar las tiendas de niebla o la administración directa a través de tubos endotraqueales.

Los ejemplos de vehículos para la administración a través de las superficies mucosas dependen de la ruta particular, por ejemplo, oral, sublingual, intranasal, etc. Cuando se administran por vía oral, los ejemplos ilustrativos incluyen grados farmacéuticos de manitol, almidón, lactosa, estearato de magnesio, sacárido de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y similares, prefiriéndose el manitol. Cuando se administran por vía intranasal, ejemplos ilustrativos incluyen el polietilenglicol, fosfolípidos, glicoles y glicolípidos, sacarosa y/o metilcelulosa, suspensiones en polvo con o sin agentes de carga tales como la lactosa y conservantes tales como el cloruro de benzalconio, EDTA. En una realización particularmente ilustrativa, el fosfolípido 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) es usado como un vehículo acuoso isotónico a aproximadamente 0,01-0,2% para la administración intranasal del compuesto de la presente invención a una concentración de aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/ml.

Por ejemplo, para la administración parenteral, las composiciones farmacéuticas pueden formularse ventajosamente como soluciones, suspensiones o emulsiones con disolventes, diluyentes, solubilizantes o emulsionantes adecuados, etc. Los disolventes adecuados son, sin limitación, agua, solución salina fisiológica o alcoholes, por ejemplo, etanol, propanol, glicerol, además de soluciones de azúcares tales como soluciones de glucosa, azúcar invertido, sacarosa o manitol, o alternativamente mezclas de los diversos disolventes mencionados. Las soluciones o suspensiones inyectables pueden formularse según la técnica conocida, utilizando diluyentes o disolventes adecuados no tóxicos, parenteralmente aceptables, tales como el manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio, o agentes de dispersión o agentes humectantes y agentes de suspensión, tales como aceites estériles, sin sabor y fijos, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos y ácidos grasos, incluyendo el ácido oleico. Los agentes y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de la invención también pueden liofilizarse y los liofilizados obtenidos pueden usarse, por ejemplo, para la producción de preparaciones para inyección o infusión. Por ejemplo, un ejemplo ilustrativo de un vehículo para uso intravenoso incluye una mezcla de etanol USP al 10%, propilenglicol o polietilenglicol 600 USP al 40% y el resto agua para inyección USP (WFI). Otros vehículos ilustrativos para uso intravenoso incluyen 10% de etanol USP y WFI USP; 0,01-0,1% de trietanolamina en WFI USP; o 0,01-0,2% de dipalmitoil difosfatidilcolina en WFI USP; y 1-10% de escualeno o emulsión parenteral de aceite vegetal en agua.

Ejemplos ilustrativos de vehículos para uso subcutáneo o intramuscular incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa al 5% en WFI y trietanolamina al 0,01-0,1% en dextrosa al 5% o cloruro de sodio al 0,9% en WFI USP, o 1 a 2 o 1 a 4 mezcla de etanol USP al 10%, propilenglicol al 40% y el resto una solución isotónica aceptable tal como dextrosa al 5% o cloruro de sodio al 0,9%; o 0,01-0,2% de dipalmitoil difosfatidilcolina en WFI USP y 1 a 10% de escualeno o emulsiones parenterales de aceite vegetal en agua.

Cuando se prefieren formulaciones acuosas, tales formulaciones pueden comprender uno o más tensioactivos. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de una dispersión micelar que comprende al menos un tensioactivo adecuado, por ejemplo, un tensioactivo fosfolípido. Los ejemplos ilustrativos de fosfolípidos incluyen diacil fosfatidil glicerol, tales como el dimiristoil fosfatidil glicerol (DPMG), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG), y diestearoil fosfatidil glicerol (DSPG), diacil fosfatidil colinas, tales como la dimiristoil fosfatidilcolina (DPMC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y diestearoil fosfatidilcolina (DSPC); ácidos diacil fosfatídicos, tales como el ácido dimiristoil fosfatídico (DPMA), ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA) y ácido diestearoil fosfatídico (DSPA); y diacilfosfatidil etanolaminas tales como la dimiristoil fosfatidil etanolamina (DPME), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE) y diestearoil fosfatidil etanolamina (DSPE). Típicamente, una relación molar de tensioactivo: sustancia activa en una formulación acuosa será de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, más típicamente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, sin embargo, se puede usar cualquier cantidad efectiva de tensioactivo en una formulación acuosa para adaptarse mejor a los objetivos específicos de interés.

Cuando se administran por vía rectal en forma de supositorios, estas formulaciones se pueden preparar mezclando los compuestos según la invención con un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao, ésteres de glicéridos sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero se licuan y/o se disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

- 5 Vehículos adecuados para microcápsulas, implantes o varillas son, por ejemplo, los copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico.

Un experto en esta técnica reconocerá que la descripción anterior es ilustrativa más que exhaustiva. De hecho, muchas técnicas de formulaciones adicionales y excipientes farmacéuticamente aceptables y soluciones portadoras adicionales son bien conocidas por los expertos en la técnica, como es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en este documento en una variedad de regímenes de tratamiento.

La dosificación o cantidad de las sustancias activas presentes utilizadas, opcionalmente en combinación con uno o más de otros compuestos activos para ser administrados, depende del caso individual y, como es habitual, se adapta a las circunstancias individuales para lograr un efecto óptimo. Por lo tanto, depende de la naturaleza y la gravedad del trastorno a tratar, y también del sexo, la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el modo y el tiempo de administración, y la capacidad de respuesta individual del ser humano o animal a ser tratado, la vía de administración, eficacia, estabilidad metabólica y duración de la acción de los compuestos utilizados, si la terapia es aguda o crónica o profiláctica, o si se administran otros compuestos activos además del agente o agentes de la invención.

Sin limitación, dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis diaria típica de un producto como se divulga en el presente documento puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 1 g/kg de peso corporal o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, una dosis diaria de un producto como se divulga en el presente documento puede variar de aproximadamente 1mg/kg a 1g/kg de peso corporal. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 10,0 mg/kg, 20,0 mg/kg, 50,0 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg o 500 mg/kg de peso corporal (o cualquier combinación de los mismos) puede administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, todos los días, cada dos días, cada semana o cada dos o tres semanas.

Cuando el ingrediente activo comprende o consiste en microvesículas, la formulación farmacéutica puede estar en una forma de dosificación adecuada para la administración de las microvesículas en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 µg/kg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 µg/kg, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 120 µg/kg de peso corporal.

Los productos divulgados en este documento pueden usarse solos o en combinación con cualquier otro ingrediente activo útil en el tratamiento de la afección a la que se dirige ("terapia de combinación"). Las terapias de combinación como se contemplan en el presente documento pueden comprender la administración de al menos una sustancia activa de la presente invención y al menos otro ingrediente farmacéuticamente o biológicamente activo. Dicha(s) sustancia(s) activa(s) presente(s) y dicho(s) ingrediente(s) farmacéutica o biológicamente activo(s) pueden administrarse en la(s) misma(s) formulación(es) farmacéutica(s) o diferente(s), simultánea o secuencialmente en cualquier orden.

Los presentes productos y composiciones farmacéuticas son útiles para tratar pacientes. Los términos "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a animales, preferiblemente animales de sangre caliente, más preferiblemente vertebrados, incluso más preferiblemente mamíferos, aún más preferiblemente primates, y lo más preferiblemente pacientes humanos. El término "mamífero" incluye cualquier animal clasificado como tal, incluidos, entre otros, los seres humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, animales de deporte, animales domésticos, animales de compañía y animales de experimentación, tales como, por ejemplo, ratones, ratas, hámsters, conejos, perros, gatos, cobayas, bueyes, vacas, ovejas, caballos, cerdos y primates, por ejemplo, monos y simios. Particularmente preferidos son los sujetos humanos, que incluyen ambos sexos y todas las categorías de edad de los mismos. Los sujetos animales no humanos también pueden incluir formas prenatales de animales, tales como, por ejemplo, embriones o fetos. Los sujetos humanos también pueden incluir fetos, pero por preferencia no embriones.

Como se usa en el presente documento, una frase como "un sujeto que necesita tratamiento" incluye sujetos que se beneficiarían del tratamiento de una afección dada. Dichos sujetos pueden incluir, sin limitación, aquellos que han sido diagnosticados con dicha afección, aquellos propensos a desarrollar dicha afección y/o aquellos en quienes se debe prevenir dicha afección.

"Los términos "tratar" o "tratamiento" abarcan tanto el tratamiento terapéutico de una enfermedad o afección ya desarrollada, tal como la terapia de una enfermedad proliferativa ya desarrollada, así como medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o disminuir las posibilidades de incidencia de una afección no deseada, tal como para prevenir la aparición, el desarrollo y la progresión de enfermedades proliferativas. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, sin limitación, el alivio de uno o más síntomas o uno o más marcadores

biológicos, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y similares. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.

5 El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto activo o agente farmacéutico que logra un beneficio medicinal en un sujeto, por ejemplo, un beneficio profiláctico o terapéutico. Por lo tanto, la "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto activo o agente farmacéutico que inhibe o retrasa en un sujeto la aparición de un trastorno como es buscado por un investigador, veterinario, médico u otro clínico. El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una
10 cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sujeto que está siendo buscada por un investigador, veterinario, médico u otro clínico, que puede incluir entre otras cosas, el alivio de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. Se conocen métodos en la técnica para determinar las dosis terapéuticas y profilácticamente eficaces para los presentes productos.

15 El medio ADHLSC-CM y las fracciones de ADHLSC-CM pueden ejercer valiosos efectos terapéuticos en una pluralidad de patologías. En particular, pero sin limitación, las acciones tróficas (por ejemplo, regulación de la supervivencia, proliferación, crecimiento y diferenciación celular), las acciones inmunomoduladoras y/o las acciones antifibrosis de los productos pueden desempeñar un papel destacado.

20 El medio ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM puede administrarse por vía intravenosa (por ejemplo, intraportal), intrahepática, intraesplénica o intraperitoneal, simultáneamente o por separado de otros medicamentos, así como también utilizar un sistema de administración que comprende una fuente de la composición de células libres seleccionada junto con un dispensador operable para administrar el medio acondicionado a un tejido u órgano diana. El sistema de suministro puede implicar el cultivo de las ADHLSC en un biorreactor extracorpóreo (o cualquier otro dispositivo apropiado) que comprenda un compartimento de tratamiento de fluidos y un compartimento de cultivo celular, y una barrera selectivamente permeable (por ejemplo, una membrana, un cartucho de ultrafiltración o un haz
25 de fibras huecas) que separa el compartimento de tratamiento de fluidos y el compartimento celular, en donde el compartimento de cultivo celular comprende las ADHLSC. Este sistema puede comprender además una entrada de fluido biológico y una salida de fluido biológico, en donde la entrada y la salida de fluido biológico permiten la comunicación de fluidos entre el compartimento de tratamiento de fluido y un torrente sanguíneo del sujeto.

30 El medio ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento, puede usarse en el tratamiento (como profilaxis o terapia) de una serie de trastornos tales como los trastornos fibróticos, trastornos del hígado, lesión o fallo orgánico, o cualquier otro trastorno patológico, inflamación, degeneración y/o proliferación dentro de un órgano o tejido. El ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM pueden ser autólogos para el sujeto (si las ADHLSC del mismo sujeto se usaron para producir el ADHLSC-CM) o alogénicas para el sujeto (si las ADHLSC de otro sujeto fueron
35 utilizados para producir el ADHLSC-CM).

Además, el ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento, se puede usar como soporte para el trasplante de un órgano (en particular el hígado) o células (en particular, trasplante de las ADHLSC, hepatocitos o MSC específicas del órgano y/o diferenciación), como un tratamiento subsidiario que se puede administrar antes, después o al realizar el trasplante.

40 El ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento, se puede usar en el tratamiento de la lesión orgánica o fallo orgánico, preferiblemente en el caso donde el órgano sea el hígado, o para usar en el tratamiento de la acumulación excesiva de tejido fibroso, preferiblemente en donde la acumulación excesiva de tejido fibroso afecta al hígado, o para usar en el tratamiento de una enfermedad hepática, o para usar en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, preferiblemente en donde la
45 enfermedad proliferativa afecta al hígado.

50 El ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento, también se puede usar para prevenir o tratar trastornos hepáticos, en particular aquellos trastornos que implican la alteración patológica, inflamación, degeneración y/o proliferación de células hepáticas, tales como los trastornos fibróticos hepáticos, insuficiencia hepática, insuficiencia hepática aguda o crónica, infecciones hepáticas agudas, colangitis, cirrosis biliar. Los trastornos fibróticos hepáticos pueden estar asociados o ser causados por la diabetes, síndromes metabólicos, hepatitis vírica, hepatitis crónica persistente o activa, hepatitis autoinmune, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad del hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF), cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, atresia biliar, enfermedad hepática congénita, carcinoma hepatocelular o fibrosis hepática coincidente con la ingestión crónica o
55 repetida de alcohol, con infección, con trasplante hepático o con lesión hepática inducida por fármacos.

El ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se describe en el presente documento, puede administrarse después de que se establezca un diagnóstico inicial, evaluación de riesgo o progresión de la enfermedad específica mediante análisis de biopsias o sobre la base del nivel elevado en el plasma de algunos marcadores del daño, disfunción, fibrosis, alteración o necrosis hepáticos. Estos marcadores

bioquímicos asociados con la actividad y el estado del hígado pueden seleccionarse entre los divulgados en la bibliografía y, en particular, la alanina aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT), fosfatasa alcalina (AP), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), citoqueratina-18 (CK-18) o resistina. En particular, el trastorno hepático puede ser una enfermedad del hígado graso en la que la elevación de uno o más de estos marcadores está asociado a una esteatosis más o menos significativa en el hígado, como puede confirmarse mediante una biopsia hepática.

El ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento, se puede usar para prevenir o tratar trastornos fibróticos, que incluyen, pero no se limitan a, trastornos fibróticos hepáticos, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis prostática, fibrosis mamaria, fibrosis muscular cardíaca y otros trastornos relacionados con el aumento de marcadores específicos de fibrosis, es decir, cualquiera de los marcadores bioquímicos, serológicos o cualquier otra característica clínica o ecográfica, que pueda correlacionarse con la presencia de una enfermedad fibrótica. Ejemplos de marcadores bioquímicos y serológicos incluyen, pero no se limitan a, componentes de la matriz extracelular (tales como laminina, tenascina, fibronectina, tipos específicos de colágenos).

El fallo orgánico como se pretende en el presente documento puede incluir, por ejemplo, la insuficiencia hepática, tal como la insuficiencia hepática crónica e insuficiencia hepática aguda. A modo de ejemplo y sin limitación, la insuficiencia hepática ocurre cuando grandes partes del hígado se dañan y el hígado ya no puede realizar su función fisiológica normal. La insuficiencia hepática se puede diagnosticar mediante cualquier análisis de la función hepática. La insuficiencia hepática puede diagnosticarse (por ejemplo, diagnosticarse inicialmente) basándose en los síntomas de un sujeto. Los síntomas asociados con insuficiencia hepática incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes, náuseas, pérdida de apetito, fatiga, diarrea, ictericia, sangrado anormal/excesivo (por ejemplo, coagulopatía), abdomen hinchado, desorientación mental o confusión (por ejemplo, encefalopatía hepática), somnolencia y coma. La insuficiencia hepática crónica ocurre durante meses o años y es causada con mayor frecuencia por un virus (por ejemplo, VHB y VHC), consumo excesivo de alcohol a largo plazo, cirrosis, hemocromatosis y desnutrición.

La insuficiencia hepática aguda es la aparición de complicaciones graves después de los primeros signos de enfermedad hepática (por ejemplo, la ictericia). La insuficiencia hepática aguda incluye una serie de afecciones, todas las cuales implican un daño severo a los hepatocitos o necrosis. En la mayoría de los casos de insuficiencia hepática aguda, se produce una necrosis masiva de hepatocitos; sin embargo, la insuficiencia hepatocelular sin necrosis es característica del hígado graso del embarazo y el síndrome de Reye. El estado mental alterado (encefalopatía hepática) y la coagulopatía en el contexto de una enfermedad hepática generalmente definen la insuficiencia hepática aguda. En consecuencia, la insuficiencia hepática aguda generalmente se define clínicamente como el desarrollo de coagulopatía, generalmente una relación internacional normalizada (una medida del tiempo que tarda la sangre en coagularse en comparación con un valor promedio-INR) de más de 1,5, y cualquier grado de alteración mental (encefalopatía) en un paciente sin cirrosis preexistente y con una enfermedad de menos de 26 semanas de duración. La insuficiencia hepática aguda (o insuficiencia hepática aguda sobre crónica) indica que el hígado ha sufrido un daño severo que resulta en la disfunción del 80-90% de las células hepáticas.

La insuficiencia hepática aguda ocurre cuando el hígado falla rápidamente. La insuficiencia hepática hiperaguda se caracteriza por insuficiencia hepática en una semana. La insuficiencia hepática aguda se caracteriza por la insuficiencia hepática en un plazo de 8 a 28 días. La insuficiencia hepática subaguda se caracteriza por la insuficiencia hepática dentro de las 4-12 semanas. En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos en el presente documento son particularmente adecuados para el tratamiento de la insuficiencia hepática hiperaguda, aguda y subaguda, todas las cuales se denominan en el presente documento "insuficiencia hepática aguda". Las causas comunes de insuficiencia hepática aguda incluyen, por ejemplo, la hepatitis vírica, exposición a ciertos fármacos y toxinas (por ejemplo, hidrocarburos fluorados (por ejemplo, tricloroetileno y tetracloroetano), amanita phalloides (por ejemplo, se encuentra comúnmente en la "oronja verde"), acetaminofeno (paracetamol), halotanos, sulfonamidas, fenitoínas), isquemia hepática relacionada con el corazón (por ejemplo, infarto de miocardio, paro cardíaco, cardiomiopatía y embolia pulmonar), insuficiencia renal, oclusión del flujo venoso hepático (por ejemplo síndrome de Budd-Chiari), enfermedad de Wilson, hígado graso agudo del embarazo, abscesos amebianos y tuberculosis diseminada.

La insuficiencia hepática aguda abarca tanto la insuficiencia hepática fulminante (FHF) como la insuficiencia hepática sub-fulminante (o insuficiencia hepática de inicio tardío). La FHF se usa generalmente para describir el desarrollo de encefalopatía dentro de las 8 semanas posteriores al inicio de los síntomas en un paciente con un hígado previamente sano. La insuficiencia hepática subfulminante se reserva para pacientes con enfermedad hepática durante hasta 26 semanas antes del desarrollo de encefalopatía hepática.

La FHF generalmente se define como la insuficiencia grave de las funciones hepáticas en ausencia de enfermedad hepática preexistente. FHF puede resultar de la exposición de un individuo susceptible a un agente capaz de producir daño hepático grave. Los ejemplos de tales agentes incluyen agentes infecciosos, alcohol excesivo, metabolitos hepatotóxicos y compuestos hepatotóxicos (por ejemplo, drogas de abuso). Otras causas incluyen anomalías congénitas, enfermedades autoinmunes y enfermedades metabólicas. En muchos casos, se desconoce la etiología precisa de la afección (es decir, es idiopática). La FHF puede diagnosticarse, por ejemplo, utilizando los ensayos de función hepática descritos anteriormente.

Por medio de otro ejemplo, el fallo de múltiples órganos generalmente se define como la pérdida de células parenquimatosas asociada con una respuesta inflamatoria local y sistémica. Más específicamente, el fallo orgánico es el fallo de un sistema esencial en el cuerpo que requiere intervención médica. El síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS), es una función orgánica alterada en un paciente grave que requiere intervención médica para realizar la homeostasis. MODS generalmente involucra dos o más órganos. MODS generalmente resulta de una infección, lesión (accidente, cirugía), hipoperfusión e hipermetabolismo. Después de un evento de inicio, se produce una respuesta inflamatoria incontrolada, que causa daño tisular y desencadena respuestas locales y sistémicas. La insuficiencia respiratoria es común en las primeras 72 horas después del insulto original, la insuficiencia hepática es común en los primeros 5-7 días, el sangrado gastrointestinal puede ocurrir a los 10-15 días y la insuficiencia renal es común a los 11-17 días. Las tasas de mortalidad para MODS varían de 30% a 100%. Actualmente no hay un régimen terapéutico efectivo disponible para revertir los MODS establecidos.

A modo de ejemplo y sin limitación, la fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular, incluido el colágeno, que ocurre en la mayoría de los tipos de enfermedades hepáticas crónicas. La fibrosis hepática avanzada produce cirrosis, insuficiencia hepática e hipertensión portal, y a menudo requiere un trasplante de hígado. Un evento clave en la etiología de la fibrosis hepática es la activación inadecuada o excesiva de las células estrelladas hepáticas.

El término "enfermedad hepática" se aplica a muchas enfermedades y trastornos que hacen que el hígado funcione incorrectamente o deje de funcionar, y esta pérdida de la función hepática es indicativa de enfermedad hepática. Por lo tanto, los ensayos de la función del hígado se utilizan con frecuencia para diagnosticar la enfermedad hepática. Los ejemplos de tales ensayos incluyen, entre otros, los siguientes:

(1) Ensayos para determinar los niveles de enzimas séricas tales como lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), donde un aumento en los niveles de enzimas indica una enfermedad hepática. Un experto en la materia entenderá razonablemente que estos ensayos enzimáticos solo indican que el hígado ha sufrido daños. No evalúan la capacidad del hígado para funcionar. Se pueden usar otras pruebas para evaluar la capacidad de funcionamiento del hígado.

(2) Ensayos para determinar los niveles séricos de bilirrubina. Los niveles séricos de bilirrubina se informan como bilirrubina total y bilirrubina directa. Los valores normales de la bilirrubina sérica total son de 0,1–1,0 mg/dl (es decir, aproximadamente de 2-18 mmol/l). Los valores normales de bilirrubina directa son de 0,0–0,2 mg/dl (de 0-4 mmol/l). Los aumentos en la bilirrubina sérica son indicativos de enfermedad hepática.

(3) Ensayos para determinar los niveles de proteína sérica, por ejemplo, la albúmina y las globulinas (o sea, alfa, beta, gamma). Los valores normales para las proteínas séricas totales son de 6,0-8,0 g/dl (60-80 g/l). Una disminución en la albúmina sérica es indicativa de enfermedad hepática. Un aumento en la globulina es indicativo de enfermedad hepática. Otras pruebas incluyen tiempo de protrombina, relación internacional normalizada, tiempo de coagulación activada (ACT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT), tiempo de consumo de protrombina (PCT), fibrinógeno, factores de coagulación; alfafetoproteína y alfafetoproteína L3 (porcentaje).

En otro aspecto, el ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, o la formulación farmacéutica que los comprende, o combinaciones de los mismos, pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

El término "enfermedad o trastorno proliferativo" generalmente se refiere a cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por el crecimiento y la proliferación de células neoplásicas, ya sean benignas, premalignas o malignas. El término enfermedad proliferativa generalmente incluye todas las células y tejidos transformados y todas las células y tejidos cancerosos. Las enfermedades o trastornos proliferativos incluyen, pero no se limitan a, crecimiento celular anormal, tumores benignos, lesiones premalignas o precancerosas, tumores malignos y cáncer. Ejemplos de enfermedades y/o trastornos proliferativos son las neoplasias benignas, premalignas y malignas localizadas en cualquier tejido u órgano, tales como la próstata, colon, abdomen, huesos, senos, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas. (suprarrenal, paratiroidea, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pélvico, piel, tejidos blandos, bazo, torácico o tracto urogenital. Un órgano que puede verse afectado preferentemente es el hígado.

El tema adicional cubierto por los aspectos de la invención incluye una cualquiera o una combinación de dos o más de las ADHLSC (u otro tipo adecuado de célula tal como hepatocitos primarios o células madre o progenitoras adecuadas de hígado u otro origen), ADHLSC-CM o una fracción de ADHLSC-CM, u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento, o la formulación farmacéutica como se divulga en el presente documento, para su uso en la inhibición de la fibrogénesis y la fibrosis *in vivo*.

La inhibición de la fibrogénesis y la fibrosis *in vivo* se puede emplear ventajosamente en el tratamiento de enfermedades fibróticas, que comúnmente se caracterizan por la acumulación excesiva de tejido fibroso en detrimento de las células parenquimatosas y, por lo tanto, por una función reducida debido a la pérdida de células parenquimatosas.

También se proporciona el uso de uno cualquiera o una combinación de dos o más de las ADHLSC, el ADHLSC-CM, una fracción de ADHLSC-CM u otra (combinación de) producto(s) adecuado(s) como se describe en este documento,

o la formulación farmacéutica como se describe en este documento, para inhibir la fibrogénesis *in vitro*. También se proporcionan los métodos correspondientes para inhibir la fibrogénesis *in vitro*.

Dicha combinación de productos biológicos se puede probar en un sistema de cultivo que utiliza las HSC; utilizando sistemas de cocultivo basados en las ADHLSC como el descrito en los Ejemplos como referencia, por ejemplo, el cocultivo en un sistema Transwell®, en donde las células están separadas por una membrana semipermeable que impide el intercambio de células, pero permite el paso de la mayoría de componentes extracelulares. Como se expone en la sección experimental, los inventores demostraron que en un sistema de cocultivo donde las ADHLSC fueron separadas de las HSC mediante un inserto de membrana de PTFE de poro de 0,4 µm, las ADHLSC ejercieron efectos deseables sobre las HSC. Esto ilustra al menos cómo se pueden comparar tales productos combinados con los productos de secreción de las ADHLSC que ejercen un efecto sobre las HSC, al pasar a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,4 µm, en particular obteniéndose una fracción de ADHLSC-CM que contiene microvesículas que son más pequeñas de 0,4µm.

Los términos "células estrelladas hepáticas" o "HSC" se conocen bien en la técnica. A modo de orientación adicional, estos términos denotan células hepáticas no parenquimatosas que residen en el espacio de Disse dentro de la unidad de microcirculación hepática, y se pueden distinguir mediante microscopía fluorescente intravital (IVFM) debido a la autofluorescencia de su vitamina A intracelular.

También se describe en el presente documento, una formulación farmacéutica que comprende las HSC y uno cualquiera o una combinación de dos o más de ADHLSC, ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM u otro(s) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento. La formulación farmacéutica puede comprender además hepatocitos, por ejemplo, hepatocitos primarios o hepatocitos diferenciados *in vitro* de células progenitoras adecuadas, por ejemplo, MSC o ADHLSC.

Además, se describe en el presente documento una formulación farmacéutica que comprende hepatocitos y uno cualquiera o una combinación de dos o más de ADHLSC, ADHLSC-CM o las composiciones libres de células que se obtienen fraccionando ADHLSC-CM u otro(s) producto(s) adecuado(s) como se divulga en el presente documento.

Estas formulaciones farmacéuticas pueden formularse adecuadamente como se describió en detalle anteriormente. La composición de una formulación farmacéutica que comprende células vivas puede imponer ciertos requisitos, como por ejemplo, las composiciones pueden comprender un sistema de tampón adecuado (por ejemplo, un sistema tampón de fosfato o carbonato) para lograr un pH deseable, más usualmente un pH casi neutro, y pueden comprender suficiente sal para garantizar condiciones isoosmóticas para evitar el estrés osmótico de las células. Por ejemplo, una solución adecuada para estos fines puede ser una solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactado, como se conoce en la técnica. Además, las composiciones pueden comprender una proteína transportadora, por ejemplo, albúmina, que puede aumentar la viabilidad de las células. Dichos requisitos son bien apreciados por la persona experta

Cuando las formulaciones farmacéuticas tal como se formulan a lo largo de esta especificación comprenden células, tales como, sin limitación, hepatocitos o ADHLSC, u otras células madre o progenitoras de origen hepático (u otro), las células pueden administrarse a sujetos humanos sin limitación en dosis que varían de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{12} células, tales como preferiblemente dosis de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^{10} células, o dosis de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^9 células, por ejemplo, aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , o aproximadamente de 1×10^9 células. Sin embargo, la determinación precisa de una dosis terapéuticamente eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluido su tamaño, edad, tamaño del daño tisular y cantidad de tiempo desde que ocurrió el daño, y los expertos en la técnica pueden determinarlo fácilmente. de esta divulgación y del conocimiento de la técnica.

Dichas formulaciones farmacéuticas pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades discutidas en otra parte de esta especificación, más particularmente enfermedades hepáticas. Más particularmente, las formulaciones farmacéuticas que comprenden células pueden estar destinadas al trasplante del hígado.

Además, el ADHLSC-CM puede usarse en métodos para identificar un compuesto biológicamente activo para el tratamiento de una enfermedad hepática, comprendiendo el método;

(a) obtener una o más fracciones de un ADHLSC-CM;

(b) analizar la capacidad de una o más de las fracciones para aumentar o disminuir una o más actividades biológicas (tales como metabolismo, proliferación, supervivencia, activación, apoptosis, migración, injerto o diferenciación) de una o más células encontradas en el hígado (tales como hepatocitos, células estrelladas hepáticas, miofibroblastos hepáticos o células sinusoidales hepáticas) *in vivo*, *in vitro* y/o *ex vivo*;

(c) seleccionar una fracción del ADHLSC-CM que aumenta o disminuye una o tales actividades; y

(d) identificar una o más moléculas presentes en la fracción seleccionada.

La presente especificación también describe el tema tal como se presenta en las siguientes cláusulas:

1. Un medio acondicionado libre de células que se puede obtener cultivando células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adulto (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separando el medio de cultivo celular de las células.
2. El medio acondicionado sin células según la cláusula 1, en donde el medio está libre de suero.
- 5 3. Una composición libre de células que se puede obtener fraccionando el medio acondicionado libre de células según las cláusulas 1 o 2.
4. La composición libre de células según la cláusula 3, en donde dicho fraccionamiento comprende filtrar, digerir enzimáticamente, centrifugar, adsorber y/o separar por medio de cromatografía el medio acondicionado libre de células.
- 10 5. El medio acondicionado libre de células según la cláusula 1 o 2, o la composición libre de células según la cláusula 3 o 4, que contiene proteínas solubles y/o microvesículas.
6. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5, o la composición libre de células según una cualquiera de las cláusulas 3 a 5, que comprende:
 - 15 (a) al menos una de las proteínas solubles seleccionadas del grupo que consiste en: factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina (CCL11), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8); y, opcionalmente
 - (b) al menos una de las proteínas solubles seleccionadas del grupo que consiste en metaloproteasas de matriz, factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas.
- 20 7. El medio acondicionado libre de células según las cláusulas 5 o 6, o la composición libre de células según las cláusulas 3 a 6, en donde las proteínas solubles están presentes en una concentración de al menos 1 ng/ml.
8. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 7, o la composición libre de células según una cualquiera de las cláusulas 3 a 7, en donde dichas microvesículas se seleccionan según su tamaño, peso molecular, y/o composición.
- 25 9. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 8, o la composición libre de células según una cualquiera de las cláusulas 3 a 8 que se concentra al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces.
- 30 10. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 8, o la composición libre de células según una cualquiera de las cláusulas 3 a 8 que se diluye al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces.
11. Un método para producir un medio acondicionado libre de células que comprende las etapas de cultivar las ADHLSC en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de ADHLSC.
12. El método para producir un medio acondicionado libre de células según la cláusula 11, en donde:
 - 35 (a) el medio de cultivo celular es un medio libre de suero; y/o
 - (b) el medio de cultivo celular se separa de las ADHLSC después de cultivar ADHLSC en el medio de cultivo celular durante al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas o al menos 24 horas.
- 40 13. El medio acondicionado libre de células de cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10 o la composición libre de células de una cualquiera de las cláusulas 3 a 10, para su uso como medicamento.
14. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10 o la composición libre de células de cualquiera de las cláusulas 3 a 10, para usar como medicamento en combinación con uno o más ingredientes activos exógenos.
- 45 15. Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno cualquiera de los medios acondicionados libres de células de una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10 o la composición libre de células de cualquiera de las cláusulas 3 a 10.
16. Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación de cualquiera de los medios acondicionados libres de células de una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10 y/o la composición libre de células de una cualquiera de las cláusulas 3 a 10, y uno o más ingredientes activos exógenos.

17. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10, la composición libre de células de una cualquiera de las cláusulas 3 a 10, o la formulación farmacéutica según una cualquiera de las cláusulas 15 o 16, o una combinación de dos o más de los mismos, para usar en el tratamiento de un trastorno fibrótico.

5 18. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10, la composición libre de células de una cualquiera de las cláusulas 3 a 10, o la formulación farmacéutica según una cualquiera de las cláusulas 15 o 16, o una combinación de dos o más de los mismos, para usar en el tratamiento de un trastorno hepático.

19. El medio acondicionado libre de células de cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10, la composición libre de células de una cualquiera de las cláusulas 3 a 10, o la formulación farmacéutica según una cualquiera de las cláusulas 15 o 16, o una combinación de dos o más de los mismos, para su uso en el tratamiento de lesiones o fallas orgánicas.

10 20. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las cláusulas 1, 2 o 5 a 10, la composición libre de células de una cualquiera de las cláusulas 3 a 10, o la formulación farmacéutica según una cualquiera de las cláusulas 15 o 16, o una combinación de dos o más de los mismos, para uso en trasplante de órganos o células.

15 21. Un método para tratar un trastorno en un sujeto que necesita dicho tratamiento que comprende la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las cláusulas 1, 2, 5 a 10, la composición libre de células de una cualquiera de las cláusulas 3 a 10, o la formulación farmacéutica de las cláusulas 15 o 16, o de una combinación de dos o más de los mismos, al sujeto.

Los aspectos y realizaciones de la invención aquí descritos están respaldados además por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

20 Ejemplo 1 - Perfil del Secretoma de las ADHLSC y HSC como se establece en los medios acondicionados

Materiales y métodos

Aislamiento y cultivo de ADHLSC y HSC

25 El protocolo y los experimentos fueron aprobados por los comités éticos del Hospital St-Luc y la facultad de medicina de la Universidad Católica de Lovaina. Se obtuvo un acuerdo del Ministerio de Salud belga para el Banco de Hepatocitos y Células Madre Hepáticas. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito y firmado para cada hígado humano utilizado en el estudio actual. Se utilizaron cuatro donantes en el estudio actual, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Número de donante (Edad)	Sexo	Razón de la muerte	Grupo sanguíneo	Tiempo de isquemia
89 (3 días)	H	Respiratorio	A+	4 horas
93 (2 años)	M	Enfermedad metabólica (hígado transplantado)	O+	1 hora y 43 minutos
97 (7 meses)	M	Meningitis	A+	5 horas y 30 minutos
98 (7 días)	H	Parada cardiorespiratoria	O-	4 horas y 20 minutos

30 Las ADHLSC se obtuvieron posteriormente al cultivo primario de la fracción del parénquima hepático obtenida previamente después de una perfusión de colagenasa en dos etapas, filtración y centrifugación a baja velocidad, como se describió previamente (Najimi M et al., 2007; documento de patente internacional WO2007/071339). Las HSC se aislaron de la fracción no parenquimatosa correspondiente usando un paso de centrifugación en gradiente Nycodenz® (Myegaard, Oslo, Noruega) como se describió previamente (Guimaraes E et al. 2010).

35 Ambos tipos de células se cultivaron usando DMEM que contenía 4,5 g/l de glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% v/v de suero de ternera fetal (PAA) y 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), a 37° C en una atmósfera completamente humidificada (5% CO₂). Al alcanzar el 80% de confluencia, las células se recogieron con 0,05% de tripsina-EDTA (Invitrogen) y se volvieron a sembrar a una densidad de 5000 células/cm². La viabilidad de las células recuperadas se evaluó utilizando el ensayo de exclusión de azul de tripano.

40 *Citometría de flujo*

Las células se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) disponible comercialmente a una concentración de 2 x 10⁵ células/ml. Para la inmunotinción intracelular, la permeabilización celular se realizó con citofix/citoperm durante 20 minutos a 4° C (BD Pharmingen). Luego se lavaron las células y se

incubaron durante 30 minutos a 4° C con los anticuerpos marcados con fluorescencia (véase la Tabla 2). Los isotipos de control correspondientes se usaron en paralelo para evaluar la unión no específica. Después del lavado, las células se suspendieron en fijador estabilizador (Stabilizing Fixative BD Pharmingen) antes de la lectura con un citómetro de flujo CANTO II. Los análisis se realizaron con el software BD FACSDiva.

5

Tabla 2

Ab	F	Cl	Sum.	Ref.	Conc.
Anti-CD29	APC	MslgGI, k	BD	559883	1/10
Anti-CD44	FITC	MslgG2b, k	BD	555478	1/10
Anti-CD45	PE-Cy7	MslgG1, k	BD	557748	1/10
Anti-CD73	PE	MslgG1, k	BD	550257	1/10
Anti-CD90	APC	MslgG1, k	BD	559869	1/10
Anti-CD117	APC	MslgG1, k	BD	550412	1/10
Anti-CD133/2	PE	MslgG1	Miltenyi	130-080-901	1/5

(Ab: especificidad de los anticuerpos, F: fluorocromo, Cl: isotipo correspondiente, Supl.: proveedor comercial, Ref.: referencia del proveedor, Conc: concentración para análisis de citometría de flujo)

Producción de medios acondicionados para las ADHLS y HSC (ADHLS-CM y HSC-CM)

10 Cuando se alcanzó el 60-70% de confluencia, las células se lavaron y el medio acondicionado se reemplazó con medio nuevo sin suero fetal de ternera al 10% v/v. Después de 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron para ensayos adicionales. Las células correspondientes se recogieron para contar y evaluar la viabilidad. La concentración de proteína secretada se expresa como nanogramos (ng) o picogramos (pg) que son secretados en 24 horas por 10^5 células durante 24 horas.

15 *ELISA*

Los análisis ELISA se realizaron en sobrenadantes del cultivo recogidos 24 horas después de la incubación con medio sin suero. Los factores de crecimiento y las concentraciones de citoquinas se calcularon para 10^5 células. La medición de la absorbancia a 450 nm se realizó con un lector de placas Víctor X4 (PerkinElmer).

20 El análisis de secreción de colágeno se realizó utilizando un kit de ELISA para el Péptido C de procolágeno tipo I (Takara Bio Inc, Japón). Los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1) en los sobrenadantes de cultivo se analizaron usando kits de ELISA Quantikine de R&D Systems. Para los kits de HGF y TGF β 1, se sustrajo una lectura a 570 nm a la lectura de 450 nm para corregir las imperfecciones ópticas de las placas. Los experimentos se realizaron según las instrucciones del fabricante. Para el ELISA TGF β 1, las muestras se activaron por acidificación seguido de neutralización para hacer detectable el TGF β 1, latente usando el inmunoensayo Quantikine TGF β 1.

25 *Análisis luminex*

30 Se utilizaron el kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (que incluye IL-1b, IP-10, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-188, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, Eotaxina, FGF, GM-CSF, interferón-gamma (IFN- γ), MIP-1a, MIP-1b, RANTES, TNF α , IL-1ra, IL-5, IL-8, IL-12, IL-17, G-CSF, MCP-1, PDGF-bb y VEGF; Bio-Rad) y la tecnología Luminex (Bio-Plex 200, Biorad) para investigar el secretoma de ambos tipos de células hepáticas. El principio de la técnica se basa en cuentas codificadas con colores y permite detectar hasta 100 citoquinas simultáneamente. El anticuerpo primario dirigido contra la proteína objetivo se conjuga con las perlas teñidas. Después de varios lavados para eliminar las proteínas no unidas, se agrega un anticuerpo biotinilado secundario a la reacción. Luego se agrega estreptavidina-ficoeritina (estreptavidina-PE) para unir el anticuerpo biotinilado. Midiendo la intensidad de la fluorescencia relativa, se puede

35 medir la reacción antígeno-anticuerpo. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, después de la humectación previa de la placa, se añadieron 50 μ l de las perlas en cada pocillo y se lavaron dos veces. Se añadieron a la placa 50 μ l de las muestras (sobrenadantes de cultivo sin suero recuperados después de 24 horas de cultivo). La placa se agitó durante 30 segundos y luego se incubó durante 45 minutos en un agitador de placa a 120 rpm a temperatura ambiente. 40 La placa se lavó tres veces con el tampón de lavado Bio-Plex y se añadieron 25 ml de anticuerpo de detección en cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos en un agitador de placa a 120 rpm. La placa se lavó tres veces con el tampón de lavado Bio-Plex y se añadió 50 μ l de la solución de estreptavidina-PE a cada pocillo. La placa se agitó

durante 30 segundos y se incubó durante 10 minutos en un agitador de placa a 120 rpm. Finalmente, después de tres lavados de la placa con el tampón de lavado Bio-Plex, se volvieron a suspender las perlas con 125 µl de tampón de ensayo Bio-Plex. La máquina Luminex leyó la placa y los datos se analizaron con Bio-Plex Manager 6.0.

Estadística

- 5 Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar del promedio (SEM). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba *t* de Student para la comparación de dos grupos. La significación estadística de las diferencias entre las muestras o condiciones se estableció con los valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$.

Resultados

10 Las ADHLSC y HSC se aislaron de cuatro donantes de hígado independientes. Para cada uno de ellos, se obtuvieron las HSC y ADHLSC en paralelo y luego se cultivaron en las mismas condiciones de cultivo y se siguieron concomitantemente. La morfología fibroblástica mostrada por ambos tipos de células se mantuvo estable en los diferentes pasajes estudiados y la duplicación acumulativa de la población fue similar para los dos tipos de células. El fenotipo mesenquimal de ambos tipos de células se investigó mediante la exploración de la expresión de varios marcadores apropiados específicos mediante citometría de flujo. Ambos tipos de células fueron inmuno-positivas para la mayoría de los marcadores de membrana ampliamente utilizados para caracterizar las células madre mesenquimales. Este fue el caso de los marcadores de células madre mesenquimales (tales como CD73 y CD90) y los marcadores de matriz extracelular (tales como CD29 y CD44) para los cuales los niveles de expresión no fueron significativamente diferentes entre las ADHLSC y HSC en los pasajes analizados. El fenotipo mesenquimal de ambos tipos de células también fue respaldado por la expresión negativa de marcadores hematopoyéticos tales como CD45, CD117 y CD133, como se demostró mediante citometría de flujo. Por lo tanto, estos datos confirmaron la presencia de marcadores mesenquimales en las ADHLSC y HSC como se había informado anteriormente (Kordes C et al., 2007; Kordes C et al., 2013; Najimi M et al., 2007).

25 El secretoma de las ADHLSC y HSC en los cuatro donantes se analizó parcialmente mediante el uso del medio acondicionado de cultivos celulares en inmunoensayos específicos de proteínas. Los experimentos se realizaron en sobrenadantes recogidos 24 horas después de la incubación con medio sin suero, obteniéndose un medio acondicionado que se denomina ADHLSC-CM y HSC-CM, respectivamente.

30 El análisis comenzó detectando proteínas conocidas por ser expresadas por HSC activadas. No se observaron diferencias significativas entre HSC-CM y ADHLSC-CM en la concentración de péptido C de procolágeno tipo I secretado (aproximadamente 130 ng/ml/10⁵ células/24 horas) y TGFβ1 secretada, una de las citoquinas pro-fibróticas más potente e involucradas en respuestas inflamatorias e inmunes (aproximadamente 90 ng/ml/10⁵ células/24 horas). Se observa una diferencia significativa entre el HSC-CM y ADHLSC-CM en la secreción de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un mitógeno de hepatocitos con propiedades antiinflamatorias y que tiene funciones fisiológicas cruciales, incluida la protección y regeneración de órganos. Después de una lesión hepática, se sabe que el HGF es secretado por órganos distantes tales como el bazo, los pulmones y los riñones, así como por células sinusoidales tales como las células de Kupffer y las HSC. El ADHLSC-CM contiene aproximadamente tres veces más HGF que las HSC (Fig. 1A).

40 La secreción de un panel más grande de los principales factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas se realizó utilizando una tecnología multiplex. Las ADHLSC aparecen claramente secretando niveles estadísticamente significativos más altos de VEGF, IFN-γ, eotaxina (CXCL11), IL-8 e IL-10 en comparación con las HSC, con una concentración superior a 1 ng/ml/10⁵/24 horas en el ADHLSC-CM. A niveles absolutos más bajos (es decir, igual o inferior a 1 ng/ml/10⁵/24 horas, PDGF-bb, TNF-α, IP-10, IL-5, IL-7, IL-9, IL-12, e IL-13 también están presentes en concentraciones más altas en el ADHLSC-CM (Figs. 1B y 1C). El aumento estadísticamente significativo de la concentración de citoquinas específicas y factores de crecimiento en el ADHLSC-CM puede variar de aproximadamente 2 veces (como para IL-5, IL10 e IL-13) hasta 10 o incluso 30 veces (como para eotaxina, VEGF e IL-8) más que en el HSC-CM. Otras citoquinas (tal como bFGF) fueron indetectables en ambos tipos de células siendo más variables entre los donantes (datos no mostrados).

50 Si dichos datos se comparan con los determinados previamente para los medios acondicionados obtenidos de un progenitor pluripotente hepático diferente (HLSC-CM; como se describe en el documento de patente internacional WO2009/150199) o células madre mesenquimales de médula ósea (MSC-CM; como se describe en el documento de patente internacional WO2009/150199), también es evidente que la composición del ADHLSC-CM es cualitativamente diferente también de estos medios acondicionados, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Proteína	HLSC-CM (Seleccionada de la Tabla1 de WO 2009/150199; expresado como pg/ml/10 ⁶ células/24 horas)	MSC-CM	ADHLSC-CM seleccionada de Fig.1; expresado como pg/ml/10 ⁵ células/24 horas)
Eotaxina	5,1	3,96	≥14335,6
IFN-gamma	38,46	104,73	990±91,8
VEGF	896,9	4961,43	≥45306,2
TNF-alfa	3,7	13,04	362,1±33,3
IL-8	4205,64	51,04	≥28231,7
IP-10	0,0	0,0	867,2±184,2
HGF	5719	2,3	936,6±151,9
IL2	0,0	0,0	160,1±14,7

Incluso si las proteínas citadas en la Tabla 3 representan solo algunos de los ejemplos más representativos, las diferencias entre los datos publicados y los obtenidos usando el ADHLSC-CM también son notables teniendo en cuenta el hecho de que las concentraciones indicadas para los HLSC-CM y MSC-CM en el documento de patente internacional WO2009/150199 son con 10 veces más células. Es evidente que el secretoma de las ADHLSC está particularmente enriquecido con una combinación de proteínas secretadas útiles, tales como factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas que están presentes en diferentes proporciones y cantidades que en otros medios acondicionados conocidos.

Por lo tanto, el secretoma de lasADHLSC, en general y en particular cuando se obtiene específicamente y se caracteriza como el ADHLSC-CM, representa una característica que distingue a las ADHLSC no solo de las HSC sino también de otras células hepáticas o mesenquimales y su secretoma. Estas características moleculares pueden tener un efecto sustancialmente distintivo sobre no solo cómo las ADHLSC mismas proliferan, son biológicamente activo e interactúan con otras células in vivo e in vitro, sino también sobre cómo las ADHLSC pueden afectar las actividades biológicas ejercidas por otros tipos de células dentro del organismo, y en particular dentro del hígado. De hecho, el ADHLSC-CM puede proporcionar efectos beneficiosos potenciales de interés médico, como tal o como una fracción dada del mismo, solo, en combinación o no con las ADHLSC o cualquier otro tratamiento apropiado a base de células, proteínas y/o fármacos.

Ejemplo 2 - Efectos de las ADHLSC en el perfil de proliferación y secreción de las HSC

20 *Materiales y métodos*

Modelo de cocultivo de ADHLSC/HSC

Se usó el sistema de cocultivo indirecto (inserto de membrana de PTFE de poro recubierto con colágeno Transwell® COL de 0,4 µm). En resumen, se sembraron las HSC en la cámara inferior a una densidad de 10.000 células/cm², mientras que se colocó las ADHLSC en el inserto de membrana, con relaciones ADHLSC/HSC (número de células/número de células) de 0/1 (control) y 1/100. Las HSC se recogieron y analizaron en los puntos de tiempo indicados.

Ensayos para comparar los efectos de las ADHLSC y el ADHLSC-CM en las HSC

Los ADHLSC-CM y HSC-CM se obtuvieron como se indicó anteriormente, recogiendo los sobrenadantes de las ADHLSC y HSC, respectivamente, después de 24 horas de cultivo en ausencia de suero. Las HSC se incubaron con las ADHLSC (usando dos sistemas de cocultivo), HSC-CM o ADHLSC-CM durante 24 horas. Los experimentos se realizaron usando las ADHLSC, el ADHLSC-CM, las HSC y el HSC-CM del mismo donante (condiciones autólogas) pero también se repitieron combinando células o medios acondicionados de diferentes donantes, obteniendo resultados cualitativamente similares.

El ensayo bioquímico CCK-8 se realizó utilizando el Kit-8 de recuento celular BioChemika (Fluka; N° de catálogo 96992). El ensayo de yoduro de propidio se realizó según la bibliografía general.

Para el análisis del ciclo celular, se levantaron las HSC con 0,05% de tripsina-EDTA (Invitrogen) después de 24 horas de cocultivo. Después de la centrifugación, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con 700 µl de etanol refrigerado y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron nuevamente con PBS antes de incubarse con una solución que contenía 100 µg/ml de yoduro de propidio (PI, Invitrogen), 0,1 mg/ml de RNasa (Sigma) y 0,01% Triton X-100 (Sigma) durante 30 minutos a 37° C y luego durante 15 minutos en hielo, antes de la lectura con un citómetro de flujo CANTO II. Los análisis se realizaron con el software BD FACSDiva. Las diferentes fases del ciclo celular se determinaron midiendo el área bajo la curva con el software FlowJo.

Para la inmunocitoquímica de Ki-67, las HSC se incubaron 24 horas con los medios acondicionados y luego se fijaron usando paraformaldehído al 3,5%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. La peroxidasa endógena se eliminó utilizando peróxido de hidrógeno al 3,3% durante 3 minutos. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron usando PBS que contenía Triton X-100 al 1% (Sigma) durante 10 minutos. La inmunotinción no específica se evitó mediante incubación de 1 hora en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (Sigma). Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpo Ki67 (Dako) durante 1 hora. Después del lavado, las células se incubaron con anticuerpo secundario (EnVision-Dako) durante 30 minutos. La detección se realizó después de 5 minutos de incubación con DAB líquido y cromógeno de sustrato (Dako). La contratinción se realizó usando hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Luego se montaron las preparaciones para el análisis microscópico (DMIL, Leica, Bélgica). Para cada condición, se analizaron cuatro campos diferentes y se contó un total de 2500 núcleos teñidos/núcleos sin teñir usando el software ImageJ.

Resultados

La fibrogénesis de las HSC activadas contribuye en gran medida a los procesos que originan fibrosis de los tejidos del hígado. Las HSC se "activan" *in vivo* durante una lesión hepática y evolucionan a células similares a miofibroblastos, con el consiguiente aumento de la proliferación celular y la deposición de proteínas de la matriz extracelular. A nivel estructural, las HSC activadas pierden sus grandes gotas de lípidos que contienen vitamina A y regulan hacia arriba la expresión de algunas moléculas de adhesión celular, así como la secreción de citoquinas proinflamatorias. *In vitro*, la parte fibrótica de este proceso de activación se imita cultivando las HSC en placas de cultivo de plástico. El efecto de las ADHLSC en general (y de ADHLSC-CM en particular) sobre la activación de las HSC y la fibrogénesis puede estudiarse *in vitro* mediante el uso de sistemas indirectos de cocultivo en donde las HSC y ADHLSC se cultivan en dos cámaras de cultivo celular que se comunican solo a través de una membrana que tiene una composición, superficie y tamaño de poro específica.

Como las HSC activadas se caracterizan por una mayor tasa de proliferación, los primeros análisis se refirieron a la proliferación de HSC después del cocultivo con las ADHLSC. El análisis del número de células se realizó mediante recuento manual después de que se recogieron las HSC 24 horas, 4 días y 7 días después de la siembra. Usando células de 4 donantes diferentes, se observó una disminución significativa en el número de las HSC. En este experimento, ya se obtuvo una disminución estadísticamente relevante del número de HSC utilizando una relación entre las ADHLSC y HSC de 1/100 y comparándola con las HSC cultivadas en ausencia de las ADHLSC (Fig. 2A). Este efecto inhibitor en una proporción tan baja parece iniciarse en las primeras 24 horas, porque no se notó ningún cambio en la tasa de proliferación del índice entre todos los grupos de células.

Este efecto se confirmó usando la misma relación entre las ADHLSC y HSC y un ensayo bioquímico CCK-8, un ensayo calorimétrico sensible que permite la determinación del número de células viables en los ensayos de proliferación celular (Fig. 2B).

Cuando se evalúa el efecto sobre las HSC adherentes y flotantes, es evidente que una relación de ADHLSC/HSC baja de 1/100 proporciona ya una disminución estadísticamente relevante del recubrimiento de las HSC, ya que el número de HSC flotantes aumenta significativamente (Fig. 3A).

Tal experimento se repite usando solo medio de cultivo acondicionado de ADHLSC, (ADHLSC-CM) para evaluar su efecto sobre la proliferación y adherencia de las HSC, usando el medio de cultivo acondicionado de las HSC (HSC-CM) como control. El efecto del ADHLSC-CM fue cualitativamente similar al efecto observado con las ADHLSC en el sistema de cocultivo, lo que sugiere la participación de factores solubles que son secretados por las ADHLSC y pasan a través de la membrana que separa las dos cámaras (Fig. 3B). Usando citometría de flujo y tinción con yoduro de propidio, no hay diferencia significativa en la inducción de muerte celular entre las HSC cultivadas con ADHLSC-CM y las cultivadas con HSC-CM (datos no mostrados).

Para investigar los mecanismos involucrados en la disminución del número de las HSC debido al ADHLSC-CM, también se analizó la cinética de recubrimiento de las HSC en presencia del ADHLSC-CM o HSC-CM mediante el recuento de las células adherentes y flotantes después de 2, 4, 8 y 24 horas después de la siembra, demostrándose un retraso en el recubrimiento de las HSC cuando se cultivan con el ADHLSC-CM en comparación con el HSC-CM lo que se mantiene en todos los puntos de tiempo (Figs. 4A y 4B).

Los efectos del ADHLSC-CM o de las ADHLSC en el ciclo celular de las HSC se probaron usando tinción con yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo. Se observa claramente un aumento en el número de las HSC que están bloqueadas en la fase G0/G1 y una disminución del número de las HSC en la fase G2/M cuando las HSC se incuban

con las ADHLSC en el sistema de cocultivo (Fig. 5A) o con ADHLSC-CM (Fig. 5B). Dichas evidencias fueron confirmadas por el análisis de tinción Ki67 usando inmunocitoquímica. Se observa una disminución significativa en el número de núcleos de HSC teñidos después de una incubación de 24 horas con el ADHLSC-CM en comparación con las HSC incubadas con HSC-CM (Fig. 5C).

5 En conjunto, estos datos demuestran una clara disminución en el número de las HSC observadas después del cocultivo con ADHLSC o ADHLSC-CM, lo que podría deberse a una inhibición tanto de la eficacia del recubrimiento como de la proliferación celular de las HSC. Es importante señalar que este efecto se obtiene combinando las ADHLSC y HSC de diferentes donantes, así como conteniendo el ADHLSC-CM directamente con HSC y no utilizando el sistema de cocultivo. Esta observación sugiere que un componente del ADHLSC-CM que puede pasar a través de la membrana seleccionada en realidad está actuando proporcionando este efecto sobre las HSC. Se sabe que las HSC activadas secretan colágeno tipo I, uno de los componentes principales de la matriz extracelular. Por lo tanto, se probó la influencia de las ADHLSC en la capacidad de secreción de colágeno de las HSC midiendo la secreción de pro-colágeno I (precursor del colágeno tipo I) usando un ensayo ELISA. Las HSC se incubaron durante 24 horas con las ADHLSC o con ADHLSC-CM. El medio de cultivo se cambió después de 24 horas y se reemplazó con un medio sin suero. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y las HSC se recogieron para contar y evaluar la viabilidad. Se observó una disminución significativa en la cantidad de pro-colágeno I secretado por las HSC después del cocultivo con las ADHLSC a una relación ADHLSC/HSC de 1/100 en comparación con el grupo de control (Fig. 6A). Además, mediante el uso de un ensayo multiplex Luminex, se puede demostrar que la secreción de HGF, un factor de crecimiento conocido por tener propiedades antifibróticas, e IL-6 se incrementa en los sobrenadantes de cultivo de las HSC que se incubaron previamente durante 24 horas con las ADHLSC usando el sistema de cocultivo (Fig. 6B; se obtuvieron datos similares usando el ADHLSC-CM). Al mismo tiempo, los niveles secretados de metaloproteinasas MMP1 y MMP2, enzimas involucradas en la degradación de la matriz extracelular, también aumentan en todos los donantes probados en al menos 1,5 veces (según lo determinado mediante el uso de la tecnología multiplex descrita anteriormente). La combinación de todas estas regulaciones arriba y abajo de proteínas involucradas en la fibrogénesis sugiere que el ADHLSC-CM (y en particular el componente que puede pasar a través de la membrana utilizada en el sistema de cocultivo) tiene un efecto antifibrótico global sobre las HSC que puede ser explotado para aplicaciones terapéuticas, tales como el tratamiento de trastornos fibróticos hepáticos.

Los datos anteriores respaldan que el ADHLSC-CM (y los componentes específicos definidos según el método de preparación, el peso molecular u otras características relevantes) puede usarse como un componente en una composición farmacéutica, o dentro de un método de tratamiento, donde puede ser usado para proporcionar una mezcla biológicamente equilibrada de productos útiles de secreción celular, tales como factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y otros mediadores de actividades fisiológicas. El ADHLSC-CM puede obtenerse mediante las ADHLSC aplicando un enfoque similar al descrito en el Ejemplo 1 como una composición libre de células y luego purificarla y/o concentrarla adicionalmente (por ejemplo, por filtración, fraccionamiento, cromatografía, digestión enzimática, centrifugación, absorción o cualquier otra combinación de ellos), en el ámbito de la obtención de preparaciones del ADHLSC-CM que están enriquecidas en todos, la mayoría o algunos de sus componentes específicos, incluidas proteínas solubles y/o estructuras vesiculares (por ejemplo, microvesículas que tienen un diámetro inferior a 1 μm (tal como particularmente por debajo de 1,0 μm), por debajo de 0,4 μm , debajo de 0,1 μm , o comprendido entre 1 μm (tal como particularmente 1,0 μm) y 0,1 μm , o entre 0,4 μm y 0,1 μm), que son liberadas por las ADHLSC.

Ejemplo 3 - Modelos in vivo y usos farmacéuticos del ADHLSC-CM y composiciones derivadas libres de células

El ADHLSC-CM, las composiciones libres de células que se derivan de ADHLSC-CM, y cualquier otra composición que se obtenga fraccionando y, si es necesario, concentrando (o diluyendo) tales composiciones pueden usarse en una serie de modelos que se seleccionan preferiblemente en base a las actividades biológicas conocidas de las células progenitoras que se aíslan del hígado adulto (es decir, las ADHLSC) y, por lo tanto, se relacionan más preferiblemente con modelos de enfermedades hepáticas humanas que pueden tratarse haciendo uso de tales preparaciones.

Los animales (por ejemplo, ratas, conejos, ratones) se seleccionan y finalmente se tratan para establecer el modelo deseado y luego se inyectan por vía intraperitoneal, intravenosa (yugular, femoral, portal o vena de la cola), intraarterialmente (en la aorta a través de la arteria carótida o femoral), intrahepáticamente, o intraesplénicamente con un volumen dado (por ejemplo, 0,01-1 ml) del ADHLSC-CM, o una cantidad equivalente de la fracción de proteína de ADHLSC-CM, o una cantidad equivalente de la fracción de microvesículas de ADHLSC-CM. Los controles adecuados pueden incluir un medio de cultivo celular idéntico no acondicionado por ninguna célula, o un medio idéntico acondicionado por el cultivo de células estrelladas hepáticas, células madre mesenquimales (tales como MSC de médula ósea) o cualquier otro tipo de células o población, como tal o como una fracción correspondiente de la misma, y solos o en combinación con cualquier otro medicamento o tratamiento apropiado que se aplique simultáneamente, previamente o posteriormente a la administración del ADHLSC-CM, o una cantidad equivalente de la fracción de proteína del ADHLSC-CM, o una cantidad equivalente de la fracción de microvesículas del ADHLSC-CM (incluido el uso de una terapia basada en células basada en las ADHLSC o cualquier otra célula). De esta manera, se puede determinar cualquier tratamiento o régimen farmacológico que pueda actuar sinérgicamente con el ADHLSC-CM, o una cantidad equivalente de la fracción de proteína de ADHLSC-CM, o una cantidad equivalente de la fracción de microvesículas del ADHLSC-CM. La remisión, la supervivencia, la prevención o cualquier otro punto final o marcador

apropiado para medir in vivo (o en tejidos, órganos o fluidos corporales seleccionados) para determinar un efecto terapéutico de la preparación que se administra a los animales se controla en períodos de tiempo predeterminados, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los tratamientos de control positivo o negativo disponibles.

5 Una lista no exhaustiva de tales modelos e indicaciones relacionadas incluye los modelos que se describen en la bibliografía citada en los antecedentes, así como otros como el modelo de insuficiencia hepática fulminante (FHF) inducida por D-galactosamina/endotoxina en ratones, el modelo de la sepsis de ratas de falla multiorgánica inducida por LPS debido a la inyección de LPS (generalmente, en ratas ancianas, se inyecta LPS y se perfora el ciego, lo que origina una peritonitis bacteriana y todas las manifestaciones de falla clínica multiorgánica), el modelo en ratones de insuficiencia renal aguda inducido por el glicerol (por ejemplo, la lesión tubular tóxica aguda en ratones C57B1/6 es inducida por inyección intramuscular de 7,5 ml/kg de peso corporal de solución de glicerol al 50% v/v), el modelo de isquemia/reperusión de fallo renal agudo inducido en ratas (por ejemplo, el tipo de isquemia/reperusión de ARF se induce en ratas anestesiadas mediante pinzamiento temporizado de ambos pedículos renales, interrumpiendo así el suministro de sangre a los riñones causando una lesión isquémica que resulta en la pérdida aguda de función renal, es decir, ARF), el modelo de isquemia inducido por la ligadura de la arteria del ratón (por ejemplo, los ratones se someten a la ligadura de la arteria femoral distal derecha utilizando un método conocido en la técnica, que causa isquemia en una extremidad posterior), el modelo de glomerulonefritis de rata inducida por anticuerpos anti-Thy1-1 (por ejemplo, la glomerulonefritis (GN) es inducida por administración intravenosa en el día 0 de 250 µg/100 g de peso de anticuerpo anti-Thy1-1 (Ab) en la vena femoral de rata hembra Lewis de 6 semanas de edad), los modelos de crecimiento tumoral en ratones o basados en células o químicamente, el modelo de fibrosis hepática en el ratón inducido por el tetracloruro de carbono (CCl₄).

Poniendo un ejemplo más detallado, para la inducción de FHF, se desarrolla la toxicidad letal de lipopolisacárido (LPS) por el tratamiento de ratones SCID (inmunodeficiencia combinada grave) con D-galactosamina (2-amino-2-desoxi-D-galactosa) como se describió anteriormente (Lehmann V et al., 1987). Las cantidades de LPS y D-galactosamina se optimizan para obtener el 100% de letalidad dentro de un intervalo de tiempo experimental deseado, tal como 8, 16 o 24 horas después de la inyección. Mediante un ejemplo más detallado, la enfermedad hepática crónica y la fibrosis hepática se imitan en ratones SCID-Beige mediante el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl₄) durante al menos de 3-4 semanas, y potencialmente hasta 20 semanas, como se describió anteriormente (Pérez Tamayo R, 1983). Los ratones pueden tratarse varias veces a la semana, por ejemplo, tres veces a la semana. Se pueden administrar 0,04 cc de una solución al 40 por ciento de CCl₄ en aceite de oliva o vehículo mediante sonda oral. En modelos como los anteriores, se observa cómo la supervivencia de los animales u otros puntos finales o beneficios adecuados profiláctica o terapéuticamente pueden mejorarse significativamente mediante la administración del ADHLSC-CM o de la fracción proteica del ADHLSC-CM, o de la fracción de microvesículas del ADHLSC-CM en comparación con el vehículo solo, otros tipos de medios (no) acondicionados y/o otros controles positivos o negativos relevantes.

Sobre la base de los resultados obtenidos en estos modelos, las cantidades farmacéuticamente eficaces del ADHLSC-CM, o la fracción de proteína del ADHLSC-CM, o la fracción de microvesículas del ADHLSC-CM pueden formularse y administrarse adecuadamente, en particular a sujetos humanos, por infusión o una o más inyecciones, teniendo en cuenta la concentración total de proteínas y/o el número de células de las que se obtuvo originalmente la preparación basada en el ADHLSC-CM, y luego se adapta la composición farmacéutica al peso del sujeto, estado y tratamientos en curso. El lugar de administración dependerá de la condición u órgano tratado. Cuando la administración sistémica es adecuada, la composición puede infundirse por vía intravenosa. Cuando se desea la administración localizada, esto se puede lograr mediante inyección localizada. A modo de ejemplo, la entrega al hígado se puede realizar a través de la vena porta. El acceso a la vena porta se realiza mediante punción directa bajo guía radiológica o ecográfica, a través de una aguja de punción, a través de un catéter percutáneo, a través de un dispositivo Port-a-cath R, o mediante un dispositivo Broviac R insertado quirúrgicamente en cualquier drenaje vascular a la vena porta, preferiblemente la vena mesentérica inferior, o una vena colónica. El catéter puede dejarse en su lugar durante varias horas, preferiblemente varios días, preferiblemente varias semanas, o preferiblemente varios meses hasta dos años, o preferiblemente más tiempo para repetir las infusiones cuando sea necesario.

Referencias

- Atoui R y Chiu R, 2012. *Cells Transl Med.* 1: 200-5.
- 50 Baglio S et al., 2012. *Front Physiol.* 3: 359.
- Cavallari C et al., 2013. *Oncogene.* 32, 819-826.
- Du Z et al., 2013. *J Surg Res.* 183: 907-15.
- Eichelbaum K et al. 2012. *Nat Biotechnol.* 30: 984-90.
- Guimaraes E y col. 2010. *J Hepatol.* 52: 389-397.
- 55 Keating A. 2012. *Cell Stem Cell.* 10: 709-16.
- Khuu D et al., 2012. *Cell Transplant.* <http://dx.doi.org/10.3727/096368912x659853>.

- Kordes C et al., 2007. *Biochem Biophys Res Commun.* 352: 410-7.
- Kordes C et al., 2013. *Cell Physiol Biochem.* 31: 290-304.
- Lavoie J y Rosu-Myles M, 2013. *Biochimie.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.017>.
- Lehmann V y col. 1987. *J Exp Med.* 165: 657-63.
- 5 Li G et al., 2010. *Cancer Science.* 101: 2546-2553.
- Mukherjee P y Mani S, 2013. *Biochim Biophys Acta.* 1834: 2226-32.
- Najimi M et al., 2007. *Cell Transplant,* 16: 717-728.
- Pan G et al., 2012. *J Surg Res.* 178: 935-48.
- Parekkadan B et al. 2007. *PLoS ONE.* 26: e941.
- 10 Puglisi M et al., 2011. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 860578.
- Qiao L et al., 2008. *Cell Research.* 18: 500-507.
- Ren G et al., 2012. *Stem Cells Trans Med.* 1: 51-58.
- Ueno T et al., 2013. *Kidney Int.* 84 (2): 297-307
- van Poll D et al., 2008. *Hepatology,* 47: 634-43.
- 15 Wang S et al., 2012. *Journal of Hematology & Oncology,* 5:19.
- Wu X y Tao R, 2012. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 11: 360-71.
- Xagorari A et al., 2013. *Int J Clin Exp Pathol.* 6: 831-840.
- Xiao Y et al., 2013, en "Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation" (editor Zhao R; Springer): 33-46.
- 20 Yagi H et al, 2009. *Tissue Eng Part A.* 15: 3377-88.
- Zarrinpar A y Busuttil R, 2013. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology,* 10: 434-440.

REIVINDICACIONES

1. Un medio acondicionado libre de células que contiene proteínas solubles y/o microvesículas y que se puede obtener cultivando células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separando el medio de cultivo celular de las células, en donde las células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC) son positivas a la albúmina, positivas a vimentina, positivas a la alfa-actina del músculo liso, negativas a la citoqueratina-19 y negativas a CD133.
2. El medio acondicionado libre de células según la reivindicación 1, en donde las ADHLSC expresan además al menos un marcador seleccionado de CD90, CD73, CD44, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2.
3. El medio acondicionado libre de células según la reivindicación 1 o 2, en donde el medio está libre de suero.
4. Una composición libre de células que se puede obtener fraccionando el medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho fraccionamiento comprende filtrar, digerir enzimáticamente, centrifugar, adsorber y/o separar por cromatografía el medio acondicionado libre de células.
5. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición libre de células según la reivindicación 4, que comprende al menos una de las proteínas solubles seleccionadas del grupo que consiste en el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina (CCL11), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) a una concentración de al menos 1 ng/ml.
6. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, o la composición libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en donde dichas microvesículas son menores de 0,40 µm.
7. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 6, o la composición libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que se concentra al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces.
8. El medio acondicionado libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 6, o la composición libre de células según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que se diluye al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces.
9. Un método para producir un medio acondicionado libre de células que comprende las etapas de cultivar células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de las células, en donde las células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC) son positivas a la albúmina, positivas a vimentina, positivas a la alfa-actina del músculo liso, negativas a la citoqueratina-19 y negativas a CD133, opcionalmente en donde:
- (a) el medio de cultivo celular es un medio libre de suero; y/o
- (b) el medio de cultivo celular se separa de las ADHLSC después de cultivar las ADHLSC en el medio de cultivo celular durante al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas o al menos 24 horas.
10. Un método para producir una composición libre de células que comprende el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina (CCL11), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) a una concentración de al menos 1 ng/ml que comprende las etapas de cultivar células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC) en un medio de cultivo celular y separar el medio de cultivo celular de las células, en donde las células madre/progenitoras derivadas de hígado humano de adultos (ADHLSC) son positivas a la albúmina, positivas a vimentina, positivas a la alfa-actina del músculo liso, negativas a la citoqueratina-19 y negativas a CD133.
11. El método según la reivindicación 9 o 10, en donde las ADHLSC expresan además al menos un marcador seleccionado de CD90, CD73, CD44, CD29, alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, HNF-4 y transportador MRP2.
12. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 8, o la composición libre de células de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, para su uso como un medicamento.
13. Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno cualquiera de los medios acondicionados libres de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 8 o la composición libre de células de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que comprende opcionalmente además uno o más ingredientes activos exógenos.

14. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 8, la composición libre de células de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o la formulación farmacéutica según la reivindicación 13, para uso en el tratamiento de un trastorno fibrótico.

5 15. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 8, la composición libre de células de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o la formulación farmacéutica según la reivindicación 13, para uso en el tratamiento de un trastorno del hígado.

16. El medio acondicionado libre de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 8, la composición libre de células de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o la formulación farmacéutica según la reivindicación 13, para uso en el tratamiento de lesiones orgánicas, fallo orgánico o para uso en el trasplante de órganos o células.

10

Fig. 1

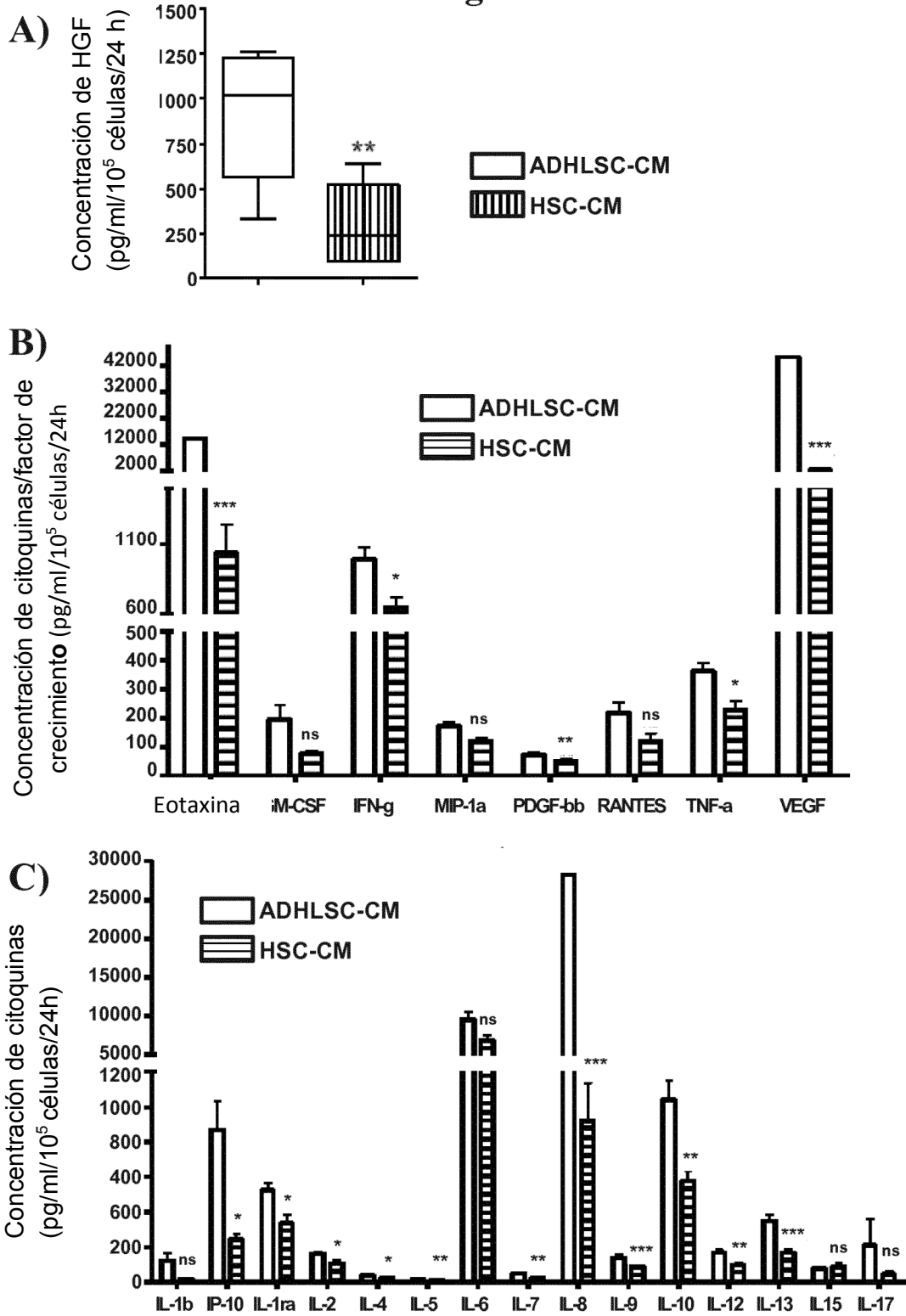
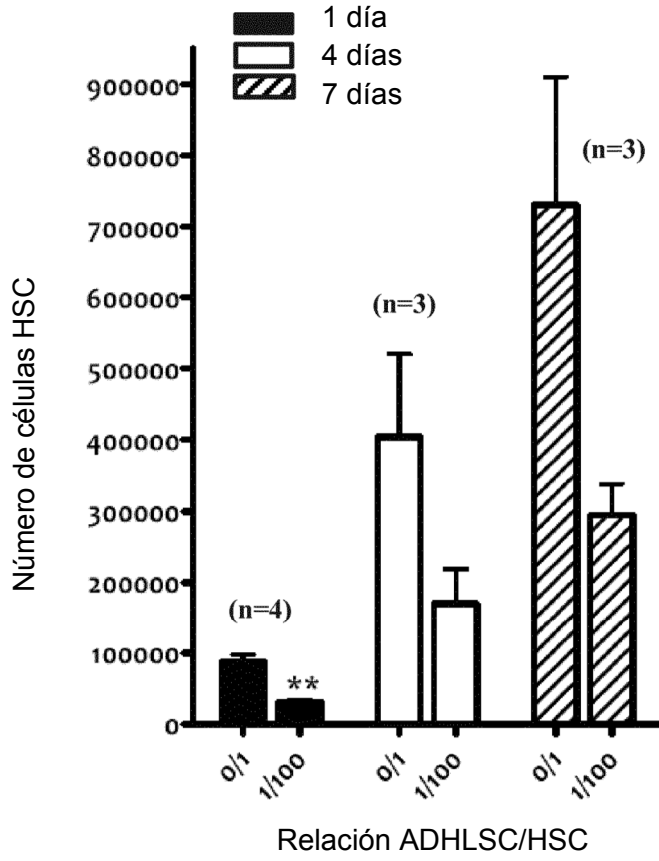


Fig. 2

A)



B)

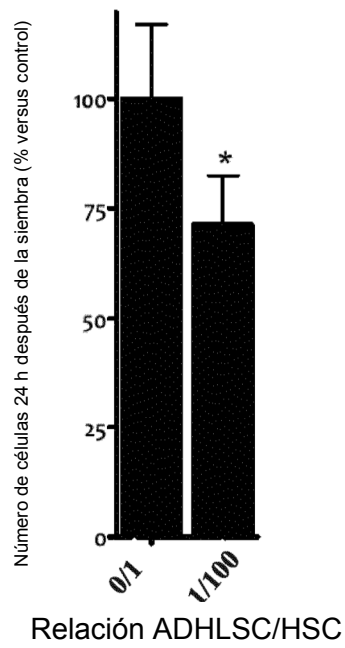


Fig. 3

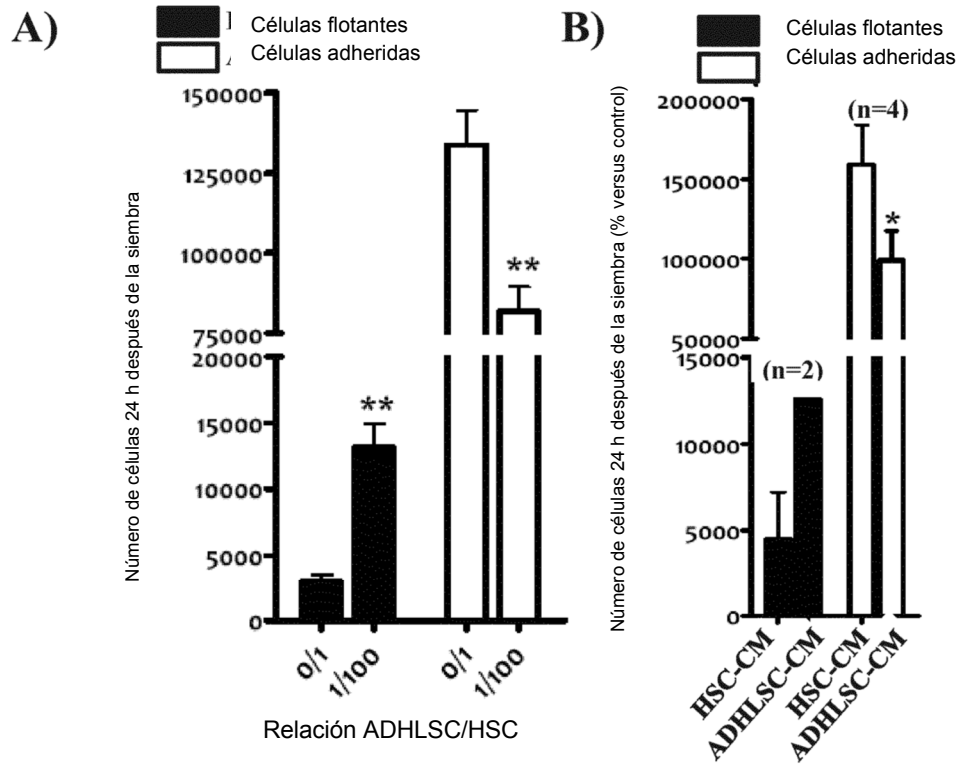


Fig. 4

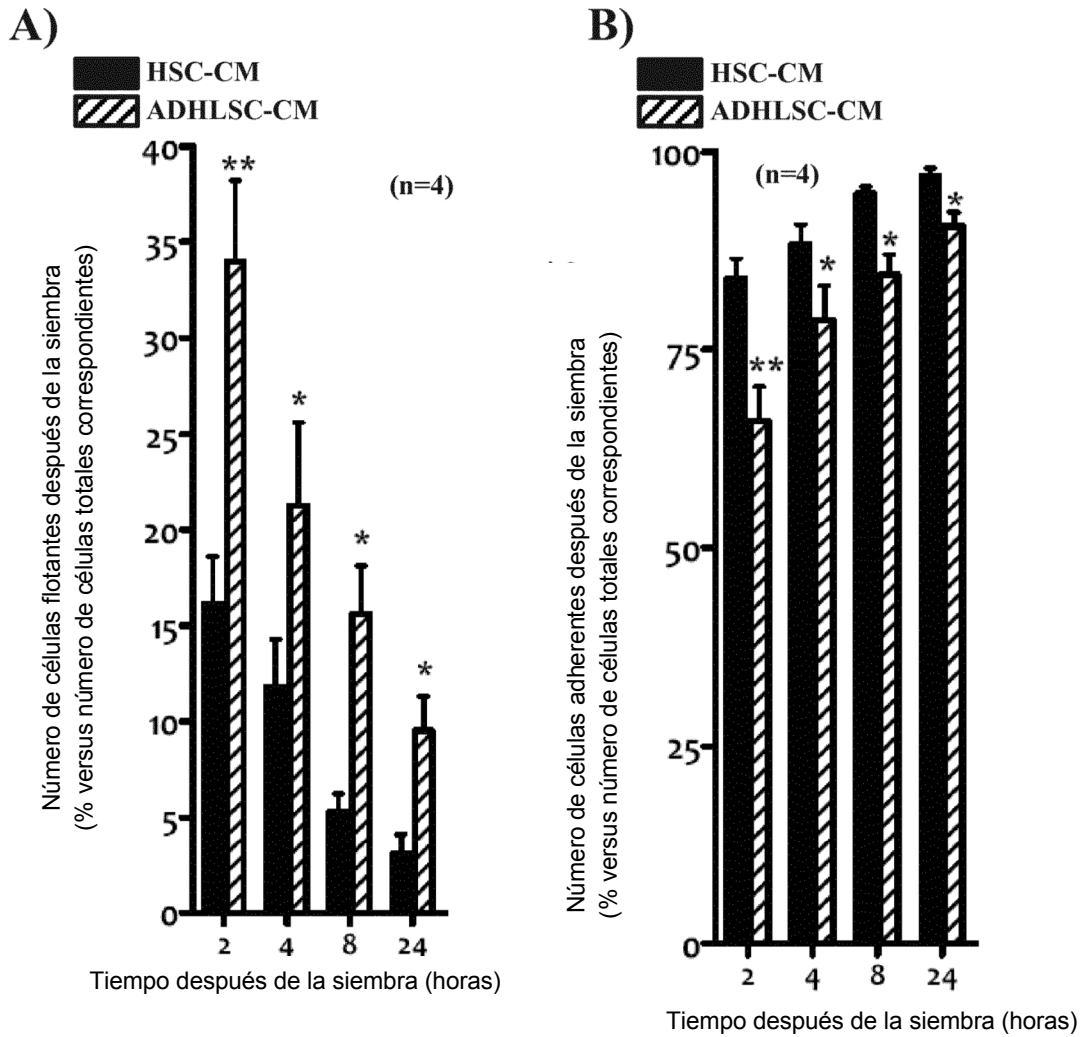
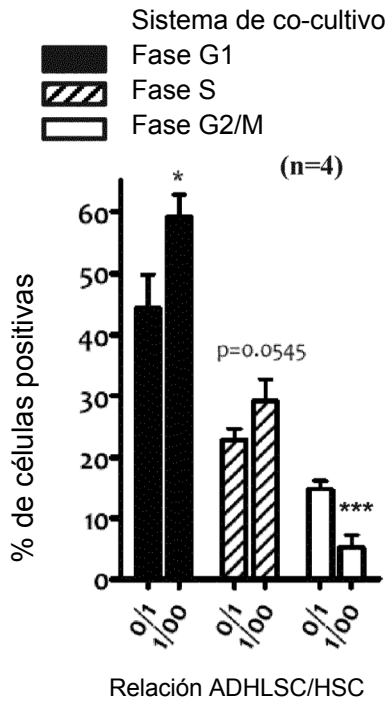
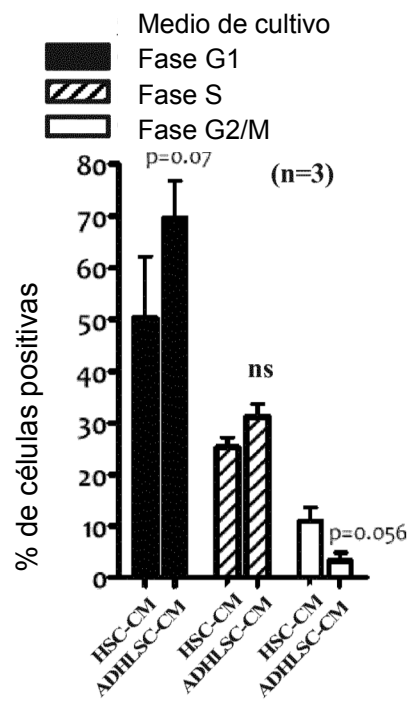


Fig. 5

A)



B)



C)

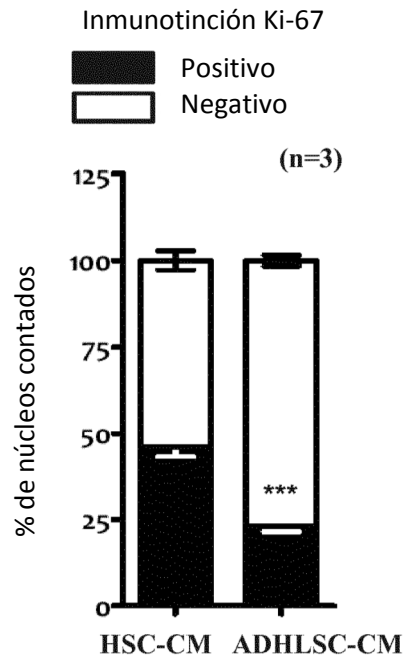
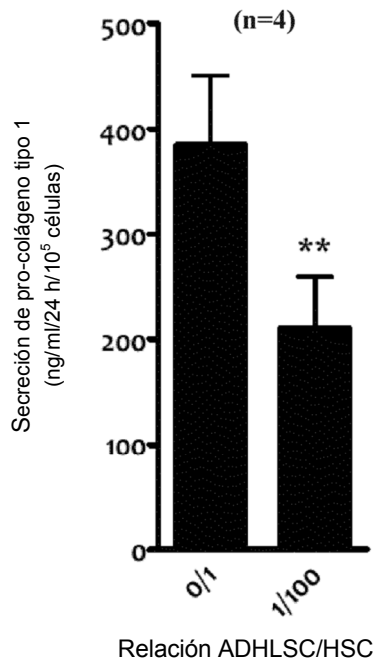


Fig. 6

A)



B)

