

PREPARACION FARMACEUTICA ANTIVENJEJECIMIENTO

La presente solicitud se relaciona con el campo de la edad, en particular con una preparaci3n farmac3utica para uso en el tratamiento del envejecimiento y/o
5 des3rdenes relacionados con la edad o para uso como un agente antienviejecimiento.

El manejo del envejecimiento de la poblaci3n humana y los des3rdenes asociados con el envejecimiento es un reto global. Varios pa3ses industrializados tienen una poblaci3n envejecida en aumento, y tambi3n en pa3ses en desarrollo la
10 proporci3n de gente anciana se espera que aumente exponencialmente. En un nivel biol3gico, el envejecimiento puede definirse como un deterioro progresivo con el tiempo de un organismo y sus c3lulas individuales, tejidos y 3rganos. Dicho deterioro puede llevar a ciertos des3rdenes relacionados con la edad. Se ha estimado que para 2050, el n3mero de gente con 60 a3os de edad y m3s a nivel
15 mundial ser3 aproximadamente el doble en comparaci3n con la figura actual de aproximadamente 11%.

Se han propuesto varias teor3as del envejecimiento y fragilidades asociadas. Una teor3a se enfoca en una acumulaci3n progresiva de da3o. La longevidad y la salud en una edad avanzada parecen estar influenciadas, entre otros factores, por
20 un equilibrio entre el da3o causado a las biomol3culas (en particular ADN) y el mantenimiento y los sistemas de reparaci3n. Por lo tanto, se ha propuesto que el envejecimiento est3 correlacionado con da3o en el ADN, y ciertos des3rdenes asociados con la edad se pueden deber a un exceso de da3o de ADN o una reparaci3n de ADN da3ado. Por lo tanto, se han desarrollado correspondientes
25 modelos animales de envejecimiento, y los modelos generalizados incluyen ratones que tienen defectos en la Reparaci3n por Escisi3n de Nucle3tidos (NER) y muestran un fenotipo de envejecimiento prematuro en comparaci3n con ratones de tipo salvaje. Se cree que las alteraciones en dichos ratones y los desordenes que los

acompañan reflejan el envejecimiento normal en los ratones, pero también en otros organismos tales como humanos. El daño oxidativo a células y componentes celulares también se ha visto implicado en el envejecimiento y ciertos desórdenes, y por lo tanto, la falta de reparación suficiente, tal como la expresión debilitada o la actividad de enzimas antioxidantes. La senescencia celular también ha estado vinculada en el acortamiento de telómeros, los cuales pueden actuar como un reloj molecular y así pueden ser la causa de ciertos desórdenes asociados con senescencia. Cuando las células se vuelven incapaces de mantener una tasa suficiente de división celular, una falta de renovación de tejidos puede promover los desórdenes relacionados con la edad. La muerte celular excesiva tal como apoptosis también puede contribuir al envejecimiento, senescencia y desórdenes asociados. Otra teoría del envejecimiento se enfoca en inflamación excesiva (incluso sutil), la cual ejerce efectos dañinos a avanzada edad. El sistema inmune también está sujeto a senescencia, una característica que es “inmunosenescencia” asociada con una sensibilidad reducida a la vacunación.

Aunque anteriormente el envejecimiento ha sido considerado como un proceso natural inevitable, esta visión ha cambiado recientemente en la comunidad científica. De acuerdo con una noción más reciente, es justo describir el envejecimiento como una enfermedad. También a menudo se ha hecho énfasis en que el envejecimiento es el factor de riesgo más común para un número de enfermedades. En consecuencia, el tratamiento (incluyendo profilaxis) del envejecimiento o una de sus causas es terapéutica. Esto no se debe únicamente a que el envejecimiento por sí mismo puede hoy en dicha clasificarse como una enfermedad, sino también ya porque el tratamiento de un factor de riesgo para una enfermedad es un objetivo terapéutico, como tal.

Niccoli y Partridge (2012) indican que la edad es el principal factor de riesgo para las principales condiciones de debilidad y amenazas para la vida, incluyendo el cáncer, enfermedad cardiovascular y neurodegeneración (Biología Actual 22,

R471), y que “las terapias actuales se enfocan en enfermedades individuales en aislamiento; las terapias enfocadas al proceso de envejecimiento como tal buscan cubrir varias enfermedades simultáneamente”. Un artículo de 2010 por Kelland (<http://www.reuters.com/article/us-ageing-disease-idUSTRE64I6HV20100520>) cita

una opinión experta que el envejecimiento es el mayor factor de riesgo común para todas las enfermedades relacionadas con la edad y es una falla no investigar “el mecanismo común para todas ellas”, sino sólo las enfermedades específicas.

Kelland (2010) también reporta que los expertos en envejecimiento dicen que es hora de una mirada fresca al envejecimiento, la cual la reconozca como una condición que puede ser manipulada, tratada y retrasada. De hecho, por ejemplo, un artículo escrito por Bulterijs y otros (2015) se titula “Es hora de clasificar el envejecimiento biológico como una enfermedad” (Fronteras en Genérica, 6, 205).

Los autores indican que el envejecimiento es causado por la disminución en la fuerza de selección contra alelos con efectos perjudiciales más adelante en la vida,

que el envejecimiento así es la consecuencia de negligencia evolucionaria y no es intencional, y si no tiene ningún propósito, la noción de envejecimiento como un

proceso natural puede estar equivocada. Los autores concluyen que el envejecimiento se debe ver como una enfermedad, aunque como una enfermedad

que es un proceso universal y multisistémico. El Dr. Zhavoronkov, CEO (Director

General) de Insilico Medicine, cree que el envejecimiento se debe considerar como una enfermedad y dice que describir el envejecimiento como una enfermedad crea

incentivos para desarrollar tratamientos. En este contexto, es interesante indicar que en 2014 el “Premio de Longevidad de Palo Alto” ha sido establecido, cuyo objetivo declarado es “hackear el código de la vida y curar el envejecimiento”. De acuerdo

con uno de los asesores en la junta directiva del premio, Prof. Kim, el envejecimiento es simplemente un problema médico para el cual se puede encontrar una solución.

Un proponente notable de la noción que el envejecimiento es curable es el gerontólogo y autor Dr. De Grey, CSO de la Fundación de Investigación SENS,

quien toma la visión que los científicos hoy en día están muy enfocados en las enfermedades del envejecimiento y no en el envejecimiento como tal. Un artículo por Musa en la publicación del 1 de noviembre de 2016 de la revista El Científico contiene la declaración que el envejecimiento es “solo otra enfermedad”, ya no más considerada como inevitable y debe ser tratada como una condición crónica.

La radiación ultravioleta (UV) está, entre otros, presente en la luz solar. Esta tiene una longitud de onda por debajo de la luz visible. Biológicamente, la banda UV-A (definida por ISO-21348 como 315 a 400 nm), la parte de onda más larga del espectro UV, y la banda vecina UVB (280 a 315 nm) son las más importantes, mientras que la radiación UV que tiene una longitud de onda más corta (UV-C) es prácticamente absorbida por la capa de ozono y la atmósfera de la tierra. La radiación UV es capaz de activar reacciones químicas. Aunque tiene ciertas acciones beneficiosas sobre el cuerpo humano, también es peligrosa debido a que causa daño, en particular a la piel y los ojos. La radiación UV (todas las bandas) es conocida por dañar el colágeno y las fibras de elastina, lo cual da lugar al envejecimiento de la piel (foto envejecimiento), cuyos signos pueden incluir piel suelta, resequedad y/o arrugas.

En el ADN, la radiación UV-B causa la formación de dímeros de pirimidina (en particular, dímeros de timina), un proceso que también es conocido como daño de ADN directo. Las lesiones formadas alteran la estructura del ADN y pueden ser reparadas por un mecanismo conocido como Reparación por Escisión de Nucleótidos. Si no son reparadas, las lesiones son mutagénicas. La radiación UV también causa la producción de especies de oxígeno reactivo/radicales libres, lo cual lleva a daño oxidativo, un proceso conocido como daño de ADN indirecto. Tanto el daño de ADN directo como indirecto contribuyen a la formación de cáncer. Por lo tanto, es comprensible que la radiación UV de espectro amplio es reconocida como un carcinógeno por la Organización Mundial de la Salud.

Una de las características del sistema inmune es una interacción entre las células T y macrófagos. En este sentido, se distinguen comúnmente dos tipos principales de procesos inmunes, el Tipo 1 y el Tipo 2. En los procesos de Tipo 1, las células ayudadoras T Tipo 1 (células T_h1) y los macrófagos Tipo 1 (M1) están involucradas, y estos procesos juegan un papel importante en la respuesta inmune celular y en la patofisiología de procesos inflamatorios. Los procesos Tipo 2 involucran células ayudadoras T Tipo 2 (células T_h2) y macrófagos Tipo 2 (M2) y juegan un papel en los procesos antiinflamatorios y/o regenerativos tales como sanado de heridas y reparación de tejido, aparte de su rol en la respuesta inmune humoral. Las citoquinas típicas asociadas con los procesos Tipo 1 son IFN- γ y IL-2. La respuesta inmune Tipo 1 maximiza la capacidad de muerte celular. Cuando hay una preponderancia (crónica) de procesos inmunes Tipo 1, puede ocurrir daño al organismo, por ejemplo, cuando se dirige a autoantígenos de diabetes tipo 1, y más generalmente el envejecimiento se puede acelerar debido a la inflamación excesiva y/o crónica. La preponderancia de los procesos inmunes Tipo 1 puede ser, por ejemplo, una preponderancia de procesos inmunes de Tipo 1 sobre Tipo 2. Dicho desequilibrio en procesos inmune puede ser contrarrestado al promover otros procesos inmunes (por ejemplo, Tipo 2) o inhibiendo procesos inmunes Tipo 1, facilitando la resolución de la inflamación.

En neurodegeneración, tal como en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple, se ha descrito un papel de los macrófagos (tal como microglía).

Cambiar el equilibrio de las respuestas inmunes Tipo 1 a respuestas inmunes Tipo 2 puede ser particularmente interesante en desórdenes del sistema nervioso o de la piel.

La senescencia celular es un fenómeno que lleva a la incapacidad de las células aisladas de dividirse perpetuamente y las hace detenerse después de un cierto número de divisiones. Para la detección de senescencia celular, comúnmente

se utiliza un ensayo de tinción celular que detecta la actividad β -galactosidasa asociada con senescencia (ver, por ejemplo, Dimitri y otros (1995) PNAS 92, 9363 a 9367). Las células que exhiben un fenotipo de senescencia pueden interferir con las funciones vitales de un organismo completo y así llevar a ciertos desórdenes. La senescencia de un organismo completo está acompañada por un riesgo aumentado de ciertos desórdenes (tal como enfermedades, complicaciones y condiciones). Se encontró que la incidencia de ciertos desórdenes aumenta con la edad en una forma mayor a lineal, por ejemplo, exponencialmente. Como se mencionó anteriormente, el envejecimiento es el principal factor de riesgo para un número de enfermedades importantes.

Los desórdenes específicos comunes correlacionados con la edad son aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, cáncer, déficit de audición, déficit de visión, cataratas, degeneración retinal, por ejemplo, degeneración macular, osteoporosis, diabetes tipo 2, hipertensión, insuficiencia hepática, caquexia, cifosis, trastornos de la marcha, temores, ataxia, distonía, fuerza de agarre reducida, pérdida muscular y cabello canoso. La edad también promueve la neurodegeneración y desórdenes similares, tales como defecto cognitivo leve, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

Es un deseo generalizado extender la esperanza de vida y/o el lapso de salud, es decir, el periodo de vida durante el cual uno es generalmente saludable y libre de enfermedades serias. Aunque unos pocos compuestos o composiciones se han sugerido para este propósito o para el tratamiento de los desórdenes anteriormente mencionados en el arte previo, su eficacia y/o tolerabilidad no siempre es clara. Así, hay una necesidad por tratamientos alternos.

El problema de la presente invención es suministrar un medio antienvjecimiento novedoso o medios para tratar, prevenir, inhibir o mitigar el envejecimiento o uno o más de los desórdenes anteriormente mencionados, o para

interferir con una o más de las causas biológicas del envejecimiento o de dichos desórdenes. Preferiblemente, dicho antienvjecimiento está dirigido a la piel, dicho envejecimiento es envejecimiento de la piel o dicho desorden es un desorden de la piel, tal como un desorden que puede ser evaluado mediante una medición de elasticidad por succión (por ejemplo, mediante el uso de un Cutometer®).
Ventajosamente, dichos medios son rápidos y fáciles de producir y son rentables. También ventajosamente, dichos medios deben tener buena compatibilidad con el cuerpo.

Las anteriores declaraciones, y cualquier descripción de modalidades ejemplificadas acá, no constituyen ninguna renuncia de ciertas modalidades o características.

Este problema es resuelto por medio de una preparación farmacéutica para uso por inyección en la piel, en donde la preparación farmacéutica se prepara mediante un método de producción que comprende los pasos de suministrar un líquido recolectado de un organismo, dicho líquido comprende constituyentes celulares de sangre, suministrar un recipiente o medio de contención, dicho recipiente o medio de contención tiene una superficie interna, y poner en contacto dicho líquido con dicho recipiente o medio de contención, en donde

- (a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicho líquido en dicho recipiente o medio de contención por un tiempo de incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha incubación,
- (b) dicho líquido comprende exosomas, y dicho método de producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha concentración, o el paso de aislar dichos exosomas, o
- (c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la incubación de dicho líquido, y el paso de remover los constituyentes celulares

de dicho líquido puesto en contacto con dicho recipiente o medio de contención.

Dicho método de producción tiene tres alternativas (a), (b), y (c) y en adelante es referido como el “método de producción ajustado de la presente descripción”.

- 5 La presente invención también se puede describir como un método para tratar un paciente en necesidad de dicho tratamiento mediante inyección de una preparación farmacéutica en la piel, en donde la preparación farmacéutica se prepara mediante un método de producción que comprende los pasos de suministrar un líquido recolectado de un organismo, dicho líquido comprende
- 10 constituyentes celulares de sangre, suministrar un recipiente o medio de contención, dicho recipiente o medio de contención tiene una superficie interna, y poner en contacto dicho líquido con dicho recipiente o medio de contención, en donde
- (a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicho líquido en dicho recipiente o medio de contención por un tiempo de
- 15 incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha incubación,
- (b) dicho líquido comprende exosomas, y dicho método de producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha
- 20 concentración, o el paso de aislar dichos exosomas, o
- (c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la incubación de dicho líquido, y el paso de remover los constituyentes celulares de dicho líquido puesto en contacto con dicho recipiente o medio de contención.

- 25 Adicionalmente, la presente invención también se puede describir como un método para preparar una preparación farmacéutica para uso por inyección en la piel, donde el método comprende los pasos de suministrar un líquido recolectado de un organismo, dicho líquido comprende constituyentes celulares de sangre,

suministrar un recipiente o medio de contención, dicho recipiente o medio de contención tiene una superficie interna, y poner en contacto dicho líquido con dicho recipiente o medio de contención, en donde

(a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicho líquido en dicho recipiente o medio de contención por un tiempo de incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha incubación,

(b) dicho líquido comprende exosomas, y dicho método de producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha concentración, o el paso de aislar dichos exosomas, o

(c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la incubación de dicho líquido, y el paso de remover los constituyentes celulares de dicho líquido puesto en contacto con dicho recipiente o medio de contención.

Las siguientes declaraciones aplican independiente de si la presente invención se describe como una preparación farmacéutica para uso por inyección en la piel, como un método para tratar un paciente, o como un método para preparar una preparación farmacéutica para uso por inyección en la piel.

En adelante, “el método de producción de la presente descripción” se refiere a un método de producción que comprende los siguientes pasos: suministrar una muestra de sangre recolectada de un organismo y un recipiente o contenedor, poner en contacto dicha muestra de sangre con dicho recipiente o contenedor, e incubar dicha muestra de sangre en dicho recipiente o contenedor, en donde dicha muestra de sangre es (1) una muestra de sangre completa, o (2) una muestra de sangre completa a partir de la cual los eritrocitos se han agotado.

“Envejecimiento” preferiblemente se refiere a la acumulación de cambios en un organismo con el tiempo, cambios físicos y envejecimiento biológico siendo particularmente preferidos.

El término “antienvejecimiento” preferiblemente se refiere al retraso, retardo, reducción, detención y/o reversión de los efectos del envejecimiento (especialmente en la piel). Este término puede también referirse al retraso, retardo, reducción, detención y/o reversión del envejecimiento biológico (especialmente de la piel).

“Inyección” incluye cualquier administración que use uno o más objetos filosos (tal como agujas) para permitir que la preparación farmacéutica cruce la superficie de la piel. Preferiblemente, la superficie de la piel es penetrada por una aguja hueca a través de la cual se administra la preparación farmacéutica.

Un “constituyente celular de sangre” significa cualquier constituyente celular de sangre completa, bien sea presente en cantidades grandes o pequeñas.

Preferiblemente, el “líquido” es una muestra de sangre. En una modalidad aún más preferida, el líquido es una muestra de sangre la cual es (1) una muestra de sangre completa o (2) una muestra de sangre completa a partir de la cual células han sido agotadas. En este contexto, las células que han sido agotadas se seleccionan preferiblemente de eritrocitos, leucocitos (en particular, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, células B, células T, células NK y/o monocitos) y plaquetas. Más preferiblemente, las células que han sido agotadas son eritrocitos.

“Medio de contención” se refiere a uno o más medios de contención. El recipiente o medio de contención puede ser el mismo o diferente de aquellos en los cuales dicho líquido ha sido recolectado. Un significado preferido de “un recipiente o medio de contención” es “un contendor”.

La “superficie interna” del recipiente o medio de contención se refiere a la superficie interna del recipiente o medio de contención como tal. En particular, la superficie de cualquier partícula macroscópica, partícula microscopica o

nanopartículas que pueden estar contenidas en el recipiente o medio de contención no se considera.

“Incubación” o “que incuba” preferiblemente se refiere a (i) una incubación con una duración de por lo menos 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 7 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 3.5 h, 4 h, 4.5 h, 5 h, 5.5 h o 6 h y/o (ii) una incubación después de la cual un cambio medible en un cierto parámetro ha ocurrido con respecto al valor antes de la incubación y/o el valor normal de ese parámetro (tal como la concentración de una citoquina, la concentración de un antagonista de citoquina, en particular IL-1Ra, la concentración de exosomas y/o la concentración de un factor de crecimiento).

Cuando las modalidades de la presente invención se describen como “que contienen” o “que comprenden” cierta materia objeto, por ejemplo, pasos de métodos, constituyentes u otras características, se entiende que las modalidades preferidas consisten de dicha materia objeto, excepto cuando el contexto especifique lo contrario.

Se entiende que “tratamiento” también incluye profilaxis.

De acuerdo con una modalidad preferida, la presente invención, por lo tanto, suministra una preparación farmacéutica para uso por inyección en la piel, en donde la preparación farmacéutica se prepara mediante un método de producción que comprende los pasos de suministrar una muestra de sangre recolectada de un organismo, dicha muestra de sangre es (1) una muestra de sangre completa o (2) una muestra de sangre completa a partir de la cual los eritrocitos han sido agotados, suministrar un recipiente o contenedor, dicho recipiente o contenedor tiene una superficie interna, y poner en contacto dicha muestra de sangre con dicho recipiente o contenedor, en donde

(a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicha muestra de sangre en dicho recipiente o contenedor por un tiempo de

incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre después de dicha incubación,

(b) dicha muestra de sangre comprende exosomas, y dicho método de producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre después de dicha concentración, o el paso de aislar dichos exosomas, o

(c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la incubación de dicha muestra de sangre, y el paso de remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre puesta en contacto con dicho recipiente o contenedor.

Esta modalidad también se puede describir como un método para tratar un paciente en necesidad de dicho tratamiento por medio de inyección de una preparación farmacéutica en la piel, en donde la preparación farmacéutica se prepara mediante un método de producción que comprende los siguientes pasos: suministrar una muestra de sangre recolectada de un organismo, dicha muestra de sangre es (1) una muestra de sangre completa o (2) una muestra de sangre completa a partir de la cual los eritrocitos han sido agotados, suministrar un recipiente o contenedor, dicho recipiente o contenedor tiene una superficie interna, y poner en contacto dicha muestra de sangre con dicho recipiente o contenedor, en donde

(a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicha muestra de sangre en dicho recipiente o contenedor por un tiempo de incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre después de dicha incubación,

(b) dicha muestra de sangre comprende exosomas, y dicho método de producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de

sangre después de dicha concentración, o el paso de aislar dichos exosomas,
o

- (c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la incubación de dicha muestra de sangre, y el paso de remover los
5 constituyentes celulares de dicha muestra de sangre puesta en contacto con dicho recipiente o contenedor.

Adicionalmente, esta modalidad también puede ser descrita como un método para preparar una preparación farmacéutica para uso mediante inyección en la piel, en donde el método comprende los siguientes pasos: suministrar una muestra de
10 sangre recolectada de un organismo, dicha muestra de sangre es (1) una muestra de sangre completa o (2) una muestra de sangre completa a partir de la cual los eritrocitos han sido agotados, suministrar un recipiente o contenedor, dicho recipiente o contenedor tiene una superficie interna, y poner en contacto dicha muestra de sangre con dicho recipiente o contenedor, en donde

- 15 (a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicha muestra de sangre en dicho recipiente o contenedor por un tiempo de incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre después de dicha incubación,
- (b) dicha muestra de sangre comprende exosomas, y dicho método de
20 producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre después de dicha concentración, o el paso de aislar dichos exosomas,
o
- (c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la
25 incubación de dicha muestra de sangre, y el paso de remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre puesta en contacto con dicho recipiente o contenedor.

La presente invención también suministra una preparación farmacéutica para uso como se describió anteriormente (1) en el tratamiento de envejecimiento o (2) como un agente antienvjecimiento.

También suministra una preparación farmacéutica para uso como se describió anteriormente en el tratamiento de

- (a) un desorden causado por daño oxidativo, daño de ADN, reparación de ADN dañado, división celular deteriorada, inflamación excesiva, una polarización patogénica de procesos inmunes, o muerte celular excesiva, o
 - (b) un desorden que es imitado por un desorden de un ratón alterado genéticamente que tiene por lo menos una mutación en un gen que codifica una proteína de la trayectoria de Reparación por Escisión de Nucleótido, dicha mutación causa un fenotipo de envejecimiento prematuro en comparación con un ratón que carece de dicha mutación o
 - (c) un desorden relacionado con la edad o un desorden cuya incidencia aumenta con la edad en una forma mayor a lineal, o
 - (d) un desorden que tiene un efecto sobre parámetros mecánicos de la piel o un desorden causado por daño de colágeno y/o daño de elastina, senescencia, acortamiento de telómero, expresión deteriorada de enzimas antioxidantes o actividad deteriorada de enzimas antioxidantes
- (la cual es preferiblemente un uso en el tratamiento del envejecimiento o como un agente antienvjecimiento).

La presente invención además suministra una preparación farmacéutica para uso como se describió anteriormente en el tratamiento de un desorden seleccionado del grupo que consiste de liquen escleroso y atrófico (LSA), Síndrome de Ehlers-Danklos, Elastosis actínica, Elastoidosis cutánea nodular y cística y Elastosis perforante serpiginosa. En estos desórdenes, la elasticidad de la piel y/o el tejido conectivo está deteriorada.

“Desórdenes” como se usa acá se refiere a disturbios en la función o apariencia normal e incluye enfermedades, complicaciones y condiciones.

El uso por inyección en la piel o el uso en el tratamiento anterior en adelante algunas veces se refiere como “el uso de acuerdo con la presente invención”. En consecuencia, la preparación farmacéutica para uso por inyección en la piel o para uso en el tratamiento anterior es algunas referido como “la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención”.

Con relación al punto anterior (a), preferiblemente dicho daño oxidativo es daño por especies de oxígeno reactivo. Dicho desorden causado por daño en ADN es preferiblemente un desorden causado por daño de ADN dependiente de UV. Preferiblemente, dicho desorden causado por daño de ADN dependiente de UV se selecciona de un desorden causado por dímeros de pirimidina, carcinoma celular basal, carcinoma celular escamoso y melanoma. Se prefiere que dicho desorden causado por reparación de ADN dañado es un desorden causado por Reparación por Escisión de Nucleótido deficiente. Preferiblemente, dicho desorden causado por división celular deteriorada es un desorden asociado con (más preferiblemente causado y/o imitado por) división deteriorada de células pulposas de núcleo. En otra modalidad preferida, dicho desorden causado por inflamación excesiva es un desorden no ortopédico, un desorden que no involucra el sistema nervioso y/o un desorden que no involucra el ojo. Se prefiere que dicho desorden causado por inflamación excesiva es diferente de uno, más de uno, o todos los siguientes desórdenes: reumatismo, artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, artritis de Bechterew, osteoartritis, síntomas de espalda, desórdenes neuroortopédicos, desórdenes de articulaciones, desórdenes de disco intervertebral, desórdenes de columna, desórdenes de raíz de nervio, desórdenes de tendón, pérdida de cartílago, neurodermitis y alopecia. Preferiblemente, dicha polarización patogénica de procesos inmunes es una preponderancia de procesos inmunes Tipo 1. Preferiblemente, dichos procesos inmunes Tipo 1 son T_h1 y/o

procesos M1, y más preferiblemente ellos son procesos T_h1 y M1. “Preponderancia de procesos inmunes Tipo 1” incluye el significado “preponderancia de procesos inmunes Tipo 1 sobre Tipo 2”, en donde dichos procesos inmunes Tipo 2 son preferiblemente procesos T_h2 y/o M2, y más preferiblemente procesos T_h2 y M2.

- 5 “Preponderancia de procesos inmunes Tipo 1” también incluye los significados “procesos inmunes Tipo 1 excesivos” y “otros procesos inmunes deteriorados”, por ejemplo, “procesos inmunes Tipo 2 deteriorados” (con modalidades preferidas como se indicó anteriormente”. Dicha muerte celular es preferiblemente apoptosis.

- 10 Con relación al punto anterior (b), dicha mutación en dicho ratón alterado genéticamente es preferiblemente en el gen Ercc1. Más preferiblemente, es Ercc1^{-/-} o Ercc1^{-Δ}.

Con relación al punto anterior (c), preferiblemente dicha incidencia aumenta exponencialmente con la edad.

- 15 Con relación al punto anterior (d), preferiblemente dicho desorden causado por daño de colágeno y/o daño de elastina se selecciona de piel suelta, resequedad y arrugas. Un desorden causado por daño de colágeno y/o daño de elastina puede también describirse generalmente como envejecimiento de la piel.

- 20 Ahora se ha encontrado que una preparación preparada de acuerdo con el método de producción ajustado de la presente descripción es capaz de mejorar sorprendentemente los parámetros de la piel que pueden ser evaluados por una medición de elasticidad por succión usando un Cutometer®, cuando se inyecta en la piel, en elasticidad particular.

Los parámetros medidos por un Cutometer® (tal como el Cutometer® Dual MPA580) son los siguientes:

- 25 Parámetros R

R10: Representa el comportamiento pasivo de la piel a la fuerza (firmeza), mira a la amplitud máxima.

R1: Capacidad de la piel de volver a su estado original.

R2: Elasticidad bruta, entre mayor sea el valor, más elástica es la curva.

R3: Amplitud máxima de la última curva de succión después de succión repetida. Los “efectos de fatiga” (fatiga) de la piel son visibles, a medida que la amplitud aumenta con cada nueva succión.

5 R4: Última amplitud mínima en comparación con la primera curva, los “efectos de fatiga” son visibles, a medida que la capacidad de redeformación aumenta con cada nueva succión.

R5: Elasticidad neta, ente mayor sea el valor, más elástica es la piel.

10 R6: Porción de la viscoelasticidad en la parte elástica de la curva. Entre menor sea el valor, mayor es la distensibilidad de las fibras de elastina.

R7: Porción de la elasticidad en comparación con la curva completa, entre mayor sea el valor, más elástica es la piel.

R8: Recuperación de la piel, entre más cercano sea el valor a R0, mejor es la capacidad de la piel de volver a su estado original.

15 R9: Representa los efectos de fatiga de la piel después de succión y liberación repetida de la piel. Entre menor sea R9, menor son los efectos de fatiga.

Parámetros F

20 F0, F1: Estas áreas se deducen del área total. Un material completamente elástico no mostrará ningún área, entre más cercano sea el valor a 0, más elástico es el material.

F2: Área por arriba de la curva de encierro superior que muestra los efectos de fatiga después de succión repetida.

F3: Área dentro de las curvas de encierro, presenta la fatiga de la piel.

25 F4: Área bajo la curva de encierro superior. Entre menor sea F4, más resiste la piel a la succión (firmeza de la piel).

Parámetros Q

Q0: Área de recuperación máxima, disminuirá con firmeza aumentada de la piel.

Q1: Recuperación elástica, aumentará con más elasticidad de la piel.

Q2: Recuperación viscosa

5 Q3: Recuperación viscoelástica (elasticidad total), aumentará con más elasticidad de la piel.

10 Acá, R0 es considerado el parámetro más importante (entre menor sea el valor, mayor es la elasticidad). R5 es considerado el segundo parámetro más importante.

Además, se ha encontrado de forma sorprendente que una preparación preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción tiene, adiciona a la mejora en parámetros de la piel, número de otros efectos que son relevantes para varios aspectos del proceso de envejecimiento (biológico). Dado
15 que todos estos efectos son relevantes para retrasar, retardar, reducir, detener y/o reversar los cambios que se acumulan en los organismos con el tiempo, se puede concluir que dicha preparación afecta el envejecimiento como tal y, por lo tanto, es efectiva en el tratamiento del envejecimiento o como un agente antienvjecimiento. Más específicamente, dicha preparación contrarresta los efectos perjudiciales de la
20 radiación UV en las células, tiene un efecto antiinflamatorio más fuerte en pacientes mayores que en pacientes jóvenes, contiene una proporción aún más favorable de componentes antiinflamatorios a inflamatorios en pacientes mayores que en pacientes jóvenes, induce un cambio en la función del sistema inmune de inflamatorio a regenerativo y antiinflamatorio, estimula una trayectoria
25 antiapoptótica y aumenta la división celular, lo cual sirve como la base de la presente invención. La preparación preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción o el método de producción ajustado de la presente descripción es así una preparación farmacéutica, y puede ser usada como

un medio novedoso para tratar, prevenir, inhibir o mitigar el envejecimiento o para interferir con sus causas biológicas.

La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención se prepara mediante un método de producción que comprende: suministrar un
5 líquido recolectado de un organismo, dicho líquido comprende constituyentes celulares de sangre, suministrar un recipiente o medios de contención, dicho recipiente o medios de contención tiene una superficie interna, y poner en contacto dicho líquido con dicho recipiente o medio de contención, en donde (a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicho líquido en dicho
10 recipiente o medio de contención por un tiempo de incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha incubación, (b) dicho líquido comprende exosomas, y dicho método de producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicho líquido después de dicha concentración, o el paso
15 de aislar dichos exosomas, o (c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la incubación de dicho líquido, y el paso de remover los constituyentes celulares de dicho líquido puesto en contacto con dicho recipiente o medio de contención. Preferiblemente, dicho método de producción comprende: suministrar una muestra de sangre recolectada de un organismo, suministrar un
20 recipiente o contenedor, dicho recipiente o contenedor tiene una superficie interna, y poner en contacto dicha muestra de sangre con dicho recipiente o contenedor, donde (a) dicho método de producción además comprende el paso de incubar dicha muestra de sangre en dicho recipiente o contenedor por un tiempo de incubación, y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre
25 después de dicha incubación, (b) dicha muestra de sangre comprende exosomas, y dicho método de producción además comprende los pasos de concentrar dichos exosomas y opcionalmente remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre después de dicha concentración, o el paso de aislar dichos exosomas, o

(c) dicho método de producción además comprende el paso de evitar la incubación de dicha muestra de sangre, y el paso de remover los constituyentes celulares de dicha muestra de sangre puesta en contacto con dicho recipiente o contenedor. Después de llevar a cabo estos pasos de método, una preparación farmacéutica está presente, y su eficacia resulta de llevar a cabo estos pasos de método. De acuerdo con su alternativa (a) el método resulta en una muestra de sangre condicionada. La eficacia es en particular ventajosa cuando la relación entre dicho tiempo de incubación y dicha superficie interna está de acuerdo con la siguiente ecuación: $t = f * A$, en donde t designa el tiempo de incubación, A designa la superficie interna y f es menor o igual a 0.5 h/cm². Sin embargo, la eficacia no depende de la incubación, como se explica más adelante. Por lo tanto, de acuerdo con la alternativa (b) la incubación puede ser llevada a cabo o se evita, y de acuerdo con la alternativa (c) la incubación se evita.

Por ejemplo, durante el paso de incubación, los componentes eficaces son inducidos en el líquido (preferiblemente muestra de sangre), en particular debido a la actividad de las células allí. Por lo tanto, preferiblemente dicho líquido es una muestra de sangre, la cual es una muestra de sangre completa. Sin embargo, la muestra de sangre puede también ser una fracción de sangre completa. Por ejemplo, los eritrocitos, que son células que carecen de un núcleo y así de la capacidad de expresión de gen, pueden estar ausentes de la muestra de sangre. Por lo tanto, dicha muestra de sangre es alternativamente una muestra de sangre completa a partir de la cual los eritrocitos han sido agotados (preferiblemente completamente o sustancialmente de forma completa, pero se contempla alternativamente que sólo parte de los eritrocitos han sido agotados), por ejemplo, una capa leucocitaria o PRP (plasma rico en plaquetas). Es innecesario, y preferido no, adicionar ningún estimulador o activador externo. Antes del paso de suministrar, el método de producción de la presente descripción o el método de producción ajustado de la presente descripción preferiblemente y adicionalmente incluye el

paso de recolectar dicho líquido (preferiblemente muestra de sangre, más preferiblemente muestra de sangre completa) de dicho organismo.

Dicho organismo puede o no sufrir de alguno de los desórdenes anteriormente mencionados y las células en ese organismo pueden o no exhibir el
5 fenotipo anteriormente mencionado.

Se ha encontrado que la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción contrarresta los efectos dañinos de la radiación UV en las células. El conteo celular en células irradiadas con una combinación de radiación UV-A y UV-B se ha encontrado que es mayor en la
10 presencia de la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción que en su ausencia. La magnitud de su efecto dependió del paso de incubación. Por lo tanto, la incubación del líquido (preferiblemente muestra de sangre, más preferiblemente muestra de sangre completa) lleva a la formación de componentes eficaces en promover la
15 supervivencia y/o la proliferación de células irradiadas con UV, lo cual es relevante para un aspecto del envejecimiento.

En este respecto, el efecto de la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción, específicamente para rescatar ADN dañado causado por UV, es el mismo que el de un sistema de
20 Reparación por Escisión de Nucleótido funcional. Por lo tanto, sin atarse a la teoría, se puede concluir que la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención estimula la Reparación por Escisión de Nucleótido. Más generalmente, se puede concluir que la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención tiene un efecto sobre un desorden causado por
25 reparación de ADN dañado o acumulación de daño en el ADN, lo cual es relevante para otro aspecto del envejecimiento.

En consecuencia, se puede asumir que la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención es útil en el tratamiento de un desorden

causado por Reparación por Escisión de Nucleótido insuficiente. Existen varios modelos que son deficientes en Reparación por Escisión de Nucleótido, por ejemplo, los ratones *Ercc^{-/-}*. Este modelo muestra un fenotipo de envejecimiento prematuro y se considera que refleja el envejecimiento normal, tanto en ratones
5 como en otros organismos, tal como humanos. Este muestra patologías relacionadas con la edad en condición de capa, cifosis, paso, temblores, ataxia, distonía y fuerza de agarre. La cifosis tiene implicaciones adicionales en osteoporosis, ataxia, distonía y temblores son desórdenes neurodegenerativos y tienen un impacto en la neurodegeneración y desórdenes asociados como
10 enfermedad de Alzheimer, defecto cognitivo leve, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica. El paso y la fuerza de agarre tienen un impacto sobre el desgaste muscular. Además, la neurodegeneración y los desórdenes asociados están usualmente vinculados con neuroinflamación. Se puede concluir que la acción antiinflamatoria de la preparación
15 farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención también es útil en el tratamiento de neuroinflamación, neurodegeneración y desórdenes asociados, un efecto relevante para otro aspecto del envejecimiento.

Además, la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción estimula la trayectoria NF- κ B, el cual es
20 conocido por tener efectos antiapoptóticos, en particular a través de la inducción de la expresión de un número de genes cuyos productos pueden inhibir la apoptosis (ver, por ejemplo, Karin y Lin (2002) *Nat Immunol* 3, 221). Por lo tanto, la conclusión se puede dirigir a que puede ser usado en el tratamiento de un desorden causado por muerte celular excesiva, lo cual es relevante para un aspecto adicional del
25 envejecimiento).

La preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción también se ha encontrado que aumenta la división celular. En consecuencia, se puede concluir que tiene un efecto en un

desorden causado por la división celular deteriorada. Dado que la senescencia y el envejecimiento pueden ser causados por división celular deteriorada, este descubrimiento puede contribuir a explicar el efecto general de la preparación farmacéutica en el envejecimiento o desórdenes relacionados con la edad o tiene un agente antienvjecimiento. Por ejemplo, en la degeneración relacionada con la edad de discos intervertebrales en general, la degeneración de células del disco intervertebral es relevante. Una división aumentada de células del disco intervertebral (núcleo pulpos) puede rejuvenecer los discos intervertebrales y puede ayudar a prevenir desórdenes de los discos intervertebrales, tales como hernias discales, en las cuales una falta de división celular suficiente y la renovación pueden jugar un papel.

La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención puede permitir, por ejemplo, una producción simple, eficiente en costos y/o rápida. Al llevar a cabo una serie de pasos fáciles en la producción y sin la necesidad de equipos y materiales especiales o complicados, en un mínimo de pasos y unas pocas horas, se puede obtener una preparación farmacéutica lista para ser usada sin tener que adicionar ninguna sustancia extraña al cuerpo durante la producción o dicha otra sustancia tendrán que ser separadas de nuevo posteriormente en la producción. Al usar exclusivamente una sustancia propia del cuerpo, de esta forma, se produce un agente especialmente compatible para el cuerpo.

Con relación a la alternativa (a) del método de producción ajustado de la presente descripción, se prefiere que la relación entre dicho tiempo de incubación y dicha superficie interna esté de acuerdo con la siguiente ecuación: $t = f * A$, en donde t designa el tiempo de incubación, A designa la superficie interna y f es menor o igual a 0.4 h/cm^2 , menor o igual a 0.35 h/cm^2 , menor o igual a 0.3 h/cm^2 , menor o igual a 0.25 h/cm^2 , menor o igual a 0.24 h/cm^2 , menor o igual a 0.23 h/cm^2 , y en particular menor o igual a 0.22 h/cm^2 . Esto es útil para asegurar que la preparación farmacéutica no tiene potencial inflamatorio indeseado. Particularmente preferidos

son valores para f en el rango de 0.04 a 0.25 h/cm², 0.05 a 0.24 h/cm², 0.06 a 0.23 h/cm² y en particular 0.07 a 0.22 h/cm², mientras que en algunos casos también se pueden usar rangos de 0.1 a 0.22 h/cm², 0.12 a 0.22 h/cm² o 0.14 a 0.22 h/cm².

Es conocido que la sangre completa, y la sangre completa condicionada,
5 contiene exosomas. Los exosomas son vesículas pequeñas secretadas de células en su ambiente. Los exosomas están, por ejemplo, contenidos en líquidos biológicos tales como suero, orina, saliva, líquidos peritoneal, cerebroespinal y sinovial. La mayoría de los tipos de células buscadas son capaces de secretar exosomas. La secreción ocurre a través de la liberación a través o desde la membrana de plasma
10 celular. Dependiendo del tipo de célula en el cual se generan, los exosomas contienen entre otros una combinación variable de proteínas. En adelante, el término “exosomas” preferiblemente y adicionalmente comprende otras vesículas extracelulares (EV).

El acondicionamiento, como se describió anteriormente, lleva a la formación
15 adicional de exosomas y otras sustancias de aplicaciones. Sin embargo, no siempre es necesario condicionar un líquido (preferiblemente muestra de sangre). Dado que se ha encontrado sorprendentemente por los presentes inventores que los exosomas exhiben un número de efectos relevantes (tal como la proliferación de células en cultivo, caída en niveles CRP sistémicos), los exosomas se pueden
20 concentrar o aislar después del acondicionamiento, pero alternativamente los exosomas que existen en la sangre se pueden concentrar o aislar sin el acondicionamiento con el fin de lograr efectos beneficiosos.

En consecuencia, con relación a la alternativa (b) del método de producción ajustado de la presente descripción, se prefiere que el método de producción, antes
25 del paso de concentrar o aislar dichos exosomas, además comprenda el paso de incubar dicho líquido (preferiblemente muestra de sangre) en dicho recipiente o medio de contención por un tiempo de incubación, o el paso de evitar la incubación

de dicho líquido (muestra de sangre). La concentración o aislamiento es útil para aumentar más la eficacia.

Dado que también en la ausencia de incubación la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción ajustado de la presente descripción se ha encontrado sorprendentemente por los inventores que exhibe un número de efectos relevantes (tal como, promover la supervivencia celular después de la irradiación UV), la incubación se puede evitar en ciertas modalidades, de acuerdo con la alternativa (c) del método de producción ajustado de la presente descripción. En esta alternativa, el paso de remover los constituyentes celulares del líquido (preferiblemente muestra de sangre) siempre es llevado a cabo. Dicho paso de remover los constituyentes celulares a menudo es beneficioso en todas las alternativas del método de producción ajustado de la presente descripción.

Con relación a todas las alternativas del método de producción de la presente descripción, el paso de remover los constituyentes celulares es preferiblemente un paso de remover los eritrocitos (en particular, en el caso cuando dicho líquido que comprende constituyentes celulares de sangre es sangre completa), las plaquetas (en particular, en el caso cuando dicho líquido que comprende constituyentes celulares de sangre es sangre completa o sangre completa a partir de la cual los eritrocitos han sido agotados) o la totalidad de constituyentes celulares (en particular en el caso cuando dicho líquido que comprende constituyentes celulares de sangre es sangre completa o sangre completa a partir de la cual los eritrocitos han sido agotados. Es más preferido que el paso de remover constituyentes celulares sea un paso de remover la totalidad de constituyentes celulares en el caso cuando dicho líquido que comprende constituyentes celulares de sangre es sangre completa). Dicha separación puede lograrse por centrifugación, tal como una centrifugación corta a una fuerza centrífuga relativamente baja (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos a 1000 g) o por filtración.

En las alternativas (a) y (b) del método de producción ajustado de la presente descripción, el paso de remover constituyentes celulares de dicho líquido es opcional, y alternativamente también se contempla incluir un paso de abstenerse de remover constituyentes celulares de dicho líquido (o abstenerse de remover esos
5 constituyentes celulares con funciones deseadas específicas). En particular, se contempla abstenerse de remover los eritrocitos, las plaquetas o la totalidad de constituyentes celulares.

Preferiblemente, el método de producción ajustado de la presente descripción además comprende el paso de reducir el volumen de dicho líquido y/o
10 la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción ajustado de la presente descripción está en forma seca (en particular, forma de polvo).

Los rangos preferidos para la superficie interna son 10 a 300 cm², 15 a 200 cm², 25 a 140 cm², 30 a 130 cm², 35 a 120 cm² y en particular 40 a 110 cm².

Es preferido que dicha muestra de sangre sea una muestra de sangre completa, de acuerdo con la modalidad (1) del método de producción ajustado de
15 la presente descripción.

Preferiblemente, la inyección es llevada a cabo a una profundidad de menos de 3 mm, 2.5 mm o menos, 2 mm o menos, 1.5 mm o menos o 1 mm o menos. Los
20 rangos de profundidad preferidos son 0.1 mm a menos de 3 mm, 0.5 mm a menos de 3 mm, 1 mm a menos de 3 mm, 1 a 2.5 mm, 1 a 2 mm o 1 a 1.5 mm.

Se prefiere que la inyección en la piel sea una inyección en la dermis (es decir, una inyección intradérmica) o subcutis (es decir, una inyección subcutánea).

Preferiblemente, el uso o tratamiento anterior involucra una o más
25 inyecciones posteriores, en donde un intervalo de tiempo entre inyecciones consecutivas es 1 día a 52 semanas, 2 días a 42 semanas, 3 días a 30 semanas, 4 días a 24 semanas, 5 días a 18 semanas, 6 días a 12 semanas, 1 a 8 semanas, en particular 1 a 6 semanas, 1 a 4 semanas, 1 a 3 semanas, 1 a 2 semanas, 2 a 3

semanas o 2. En particular, un total de al menos 3 inyecciones es preferido, más preferiblemente a intervalos de tiempo de 2 semanas entre la primera y la segunda inyección y entre la segunda y la tercera inyección, o preferiblemente entre cualquier dos inyecciones consecutivas.

5 Con el fin de lograr el máximo efecto, se prefiere evitar el almacenamiento antes de usar la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción o el método de producción ajustado de la presente descripción.

10 Preferiblemente, el organismo relacionado anteriormente en el contexto de la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención es un ser humano. Preferiblemente, dicho ser humano tiene por lo menos 30, 35, 40, 45, 48, 50, 55, 60 o 65 años de edad, o 30 a 65, 35 a 60 o 40 a 55 años de edad.

 En una preparación farmacéutica preferida para uso de acuerdo con la presente invención (a) el nivel de IL-6 es 2000 pg/ml o menos (preferiblemente 1500
15 pg/ml o menos, 1000 pg/ml o menos, 800 pg/ml o menos, 700 pg/ml o menos, 600 pg/ml o menos y en particular 500 pg/ml o menos) (b) la proporción de los niveles de IL-1Ra y IL-6, cada uno medido en pg/ml, es 3 o más, 5 o más, 7 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 25 o más, 30 o más, 40 o más y en particular 50 o más, (c) el nivel de IL-1Ra es 200 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500
20 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 800 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 1200 pg/ml o más, 1400 pg/ml o más, 1600 pg/ml o más, 1800 pg/ml o más y en particular 2000 pg/ml o más, (d) la relación de los niveles de IL-1Ra y IL-1, cada uno medido en pg/ml, es 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, 60 o más, 70 o más, 80 o más, 90 o más, 100 o más, 150 o más, 200 o más, 300 o más, 500 o más, 700
25 o más y en particular 1000 o más, o (e) la preparación farmacéutica es libre de ácido hialurónico adicionado. IL-6 es un factor importante para la piel, y también para el hígado.

Preferiblemente, la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención comprende exosomas.

Preferiblemente, los exosomas contenidos en la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención han sido generados durante la incubación anteriormente mencionada, si la hay, del líquido (preferiblemente muestra de sangre, más preferiblemente, muestra de sangre completa) recolectada del organismo en un recipiente o medio de contención.

El diámetro promedio de los exosomas en una preparación farmacéutica que contiene exosomas para uso de acuerdo con la presente invención, como se establece por medio de un microscopio de electrón de transmisión, es preferiblemente entre 30 y 200 nm, en particular entre 50 a 190 nm, entre 70 y 180 nm, entre 90 y 160 nm o entre 100 y 150 nm. Los exosomas de este tamaño son la base para una eficacia especialmente alta, tamaños de vesícula mayores pueden indicar conglomerados que contienen exosomas dañados y agregados. Sin embargo, los exosomas más grandes también pueden ser funcionales, en particular con relación al cambio del equilibrio de respuestas inmunes Tipo 1 a respuestas inmunes Tipo 2. Esto aplica a exosomas con un rango de diámetro de 200 a 5000 nm o 100 a 800 nm. Estos exosomas más grandes pueden ser obtenidos por centrifugación diferencial.

El método de producción de la presente descripción o el método de producción ajustado de la presente descripción preferiblemente además comprende el paso de concentrar o aislar los exosomas después de la incubación, si la hay, con el fin de aumentar más su eficacia.

Dicho paso de concentración o aislamiento puede llevar a dos o más preparaciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con el método de producción de la presente descripción o el método de producción ajustado de la presente descripción. Estas dos o más preparaciones corresponden a las fracciones obtenidas después de realizar dicho paso de concentración o aislamiento.

Concentrar o aislar los exosomas puede, por ejemplo, llevarse a cabo a través de centrifugación a 2000 a 1000000 g, 10000 a 800000 g, 20000 a 600000 g, 50000 a 400000 g, 80000 a 200000 g y en particular 100000 g, ya que dichas aceleraciones son especialmente adecuadas para concentrar o aislar exosomas, dependiendo de su tamaño. Dicha centrifugación es preferiblemente realizada por al menos 10 min, por al menos 30 min, especialmente por al menos 60 min. La bolita formada por la centrifugación contiene entonces los exosomas. Preferiblemente, los exosomas concentrados o aislados luego están ocupados en un fluido (preferiblemente una solución amortiguada tal como PBS, o alternativamente, por ejemplo, plasma o suero). Opcionalmente, ellos luego son filtrados, por ejemplo, a través de un filtro de 0.2 μ m.

La presente invención también contempla una preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención que no contiene exosomas. Sin embargo, una preparación farmacéutica preferida para uso de acuerdo con la presente invención sí comprende exosomas, y en particular, puede consistir de exosomas.

En el caso que suero o plasma está contenido en la preparación farmacéutica contenedora para uso de acuerdo con la presente invención (la cual es preferida en ciertos casos), dicho suero o plasma preferiblemente contiene citoquinas y/o factores de crecimiento.

Preferiblemente, la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención no comprende un corticosteroide, dado que éste puede perjudicar la eficacia de la preparación farmacéutica, en particular debido a la inhibición de su efecto rescatador de senescencia y/o efecto antiapoptótico.

La incubación del líquido (preferiblemente muestra de sangre, más preferiblemente muestra de sangre completa) es preferiblemente llevada a cabo por un tiempo de incubación de 5 min a 22 horas, 10 min a 20 horas, 15 min a 18 horas, 30 min a 16 horas, 45 min a 15 horas, 1 a 14 horas, 2 a 13 horas, 3 a 12 horas, 4 a 11 horas, 5 a 10 horas o 6 a 9 horas.

La invención es preferiblemente llevada a cabo a una temperatura de 0°C a 45°C, en particular a temperaturas de 10°C a 43°C, 20°C a 41°C, 30°C a 40°C, 35°C a 39°C, 36°C a 38°C o 37°C. Estas temperaturas aseguran la mejor eficacia.

Preferiblemente, la incubación es llevada a cabo en la ausencia de heparina
5 adicionada. Más preferiblemente, es llevada a cabo en la ausencia de cualquier anticoagulante adicionado.

Los recipientes o medios de contención adecuados (preferiblemente
contendores) para llevar a cabo el método de producción de la presente descripción
o el método de producción ajustado de la presente descripción son, por ejemplo,
10 agujas hipodérmicas, jeringas, tubos tales como tubos de vacío o tubos de ensayo,
placas de microtitulación, jeringas y bolsas de transfusión. El recipiente o medio de
contención puede, por ejemplo, tener un diámetro de 0.4 a 5 cm, 0.9 a 4 cm o 1.4 a
3.5 cm, y/o una longitud de 3 a 30 cm, 5 a 20 cm, 7 a 15 cm u 8 a 12 cm.
Preferiblemente, el recipiente o medio de contención es cilíndrico. Un recipiente o
15 medio de contención preferido tiene un volumen de 1 ml a 1000 ml, 3 ml a 750 ml,
5 ml a 500 ml, 7 ml a 300 ml, 8 ml a 200 ml, 9 ml a 150 ml, 10 ml a 100 ml, 11 ml a
80 ml y en particular 12 ml a 70 ml, sin embargo, también puede tener un volumen
de 15 ml a 65 ml, 20 ml a 60 ml, 25 ml a 50 ml o 30 a 40 ml. Preferiblemente, la
relación de superficie interna y volumen es 0.01 a 10 cm²/ml. Los volúmenes
20 preferidos del líquido (preferiblemente muestra de sangre) son 0.5 ml a 900 ml, 1 ml
a 700 ml, 2 ml a 400 ml, 3 ml a 300 ml, 6 ml a 200 ml, 7 ml a 150 ml, 8 ml a 100 ml,
9 ml a 80 ml y en particular 10 ml a 60 ml, sin embargo, también puede tener un
volumen de 11 ml a 55 ml, 12 ml a 50 ml, 15 ml a 40 ml o 20 ml a 30 ml.

El recipiente o medio de contención preferiblemente incluye una superficie
25 para contactar el líquido (preferiblemente muestra de sangre, más preferiblemente
muestra de sangre completa) que comprende vidrio, plástico, corundo o cuarzo o
una combinación de los mismos. Un plástico preferido es seleccionado del grupo
que consiste de poliestireno, policarbonato, polietileno y polipropileno.

Preferiblemente, la superficie para contactar el líquido de un recipiente o medio de contención crea un espacio completamente encerrado. Los recipientes o medios de contención preferidos tienen una o más de las siguientes características: simétrico alrededor de un plano, simétrico alrededor de un eje y cilíndrico.

5 De acuerdo con una modalidad preferida, el recipiente o medio de contención contiene partículas macroscópicas, partículas microscópicas o nanopartículas y durante la incubación el líquido (preferiblemente muestra de sangre) está en contacto con dichas partículas. Para los propósitos de la presente solicitud, las partículas macroscópicas se definen como partículas que son visibles cuando se
10 ven con el ojo, micropartículas se definen como partículas que son demasiado pequeñas para ser visibles cuando se ven con el ojo pero que son visibles cuando se ven con un microscopio, y las nanopartículas se definen como partículas que son demasiado pequeñas para ser visibles con un microscopio (y que son preferiblemente mayores a 1 nm). Dichas partículas sirven para el propósito de
15 ampliar la superficie para contactar el líquido (muestra de sangre) (por ejemplo, por otro 0.3 a 90 cm², 2 a 80 cm², 5 a 70 cm², 10 a 60 cm², 20 a 50 cm², o 30 a 40 cm²) y puede tener la forma de esferas, granulados, polvo, geles o lana. Los materiales preferidos son esferas de vidrio. La superficie de las partículas puede opcionalmente ser modificada, por ejemplo, por incubación con un agente cáustico tal como 50%
20 v/v de ácido cromosulfúrico con lavado repetido posterior. Como se indicó anteriormente, la superficie de dichas partículas no es considerada cuando se calcula la “superficie interna” del recipiente o medio de contención.

Preferiblemente, la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención es para uso por inyección al mismo organismo del cual se ha
25 recolectado dicho líquido (preferiblemente muestra de sangre, más preferiblemente muestra de sangre completa). En este caso, éste es preferiblemente un organismo que sufre de uno o más de los desórdenes anteriormente mencionados. Así, la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención es

preferiblemente una preparación farmacéutica autóloga y no una alérgica, especialmente por razones de seguridad. Cuando se describe la presente invención como el método anteriormente mencionado para tratar un paciente, esto significa que el organismo y el paciente son idénticos.

5 En una modalidad preferida, la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención es para uso en una terapia de combinación con uno o más otros agentes efectivos. Los otros agentes efectivos preferidos son agentes efectivos en el tratamiento del envejecimiento o como un agente antienvjecimiento (especialmente en el tratamiento de uno o más de los
10 desórdenes mencionados anteriormente), ácido hialurónico o toxina botulínica, o una combinación de los mismos. Particularmente preferida es una combinación de la preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la invención, ácido hialurónico y toxina botulínica.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Proliferación de células de origen de núcleo pulposo

La proliferación de células de núcleo pulposo fue probada en la presencia de varios suplementos: suero acondicionado humano ("ACS"), el cual es una preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la
20 presente descripción, con y sin exosomas; suero bovino fetal ("FBS") con y sin exosomas; y exosomas aislados de ACS y de FBS (ver Figura 1).

Las células de núcleo de origen pulposo se ubicaron en placas en una placa de 96 agujeros (8000 células por agujero) con medio DMEM/F12 y PenStrep 1%. El medio de cultivo celular se complementó con ACS completo con exosomas
25 ("ACS+Ex"), ACS sin exosomas ("ACS-Ex"), exosomas de ACS ("ExA"), FBS completo con exosomas ("FBS+Ex"), FBS sin exosomas ("FBS-Ex") y exosomas de FBS ("ExF"). La división celular fue evaluada fotométricamente después de 24 h con un ensayo XTT en un lector ELISA. Los exosomas fueron separados de ACS y FBS

por 2 h de centrifugación de 30 ml de ACS y 30 ml de FBS, respectivamente, a 100000 g y resuspensión de bolita en 3 ml de PBS cada uno.

Se encontró que tanto ACS como FBS promovieron la división celular. Las células se dividieron mejor con concentraciones menores de ACS (1% a 2%). A concentraciones mayores de ACS (5%, 10%), tanto en la presencia como en la ausencia de exosomas, se observó una disminución evidente en número de células, pero esto puede reflejar la separación de las células o conglomerados celulares cuando el medio de cultivo celular se lavó y luego se reemplazó por medio de manchado XTT. Esto puede resultar en falsas lecturas debido a que únicamente las células unidas pueden contribuir a la señal observada en este ensayo XTT. La mayor proliferación fue vista en la presencia de ACS con exosomas. El FBS no mostró disminución evidente comparable en número de células a mayores concentraciones tales como 5% y 10%, pero fue menos eficiente en general en la promoción de la división celular. En los experimentos realizados con FBS, los exosomas no tuvieron un efecto considerable en la proliferación celular. Los exosomas aislados de origen FBS y de origen ACS promovieron la división celular de forma dependiente de la dosis.

En consecuencia, la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción aumenta la división celular.

Ejemplo 2: Estimulación de una trayectoria antiapoptótica

La estimulación de la trayectoria NF- κ B, la cual es un efecto antiapoptótico, fue probada mediante el uso de un sistema de reporte de GFP/Luciferasa usando las siguientes muestras: una preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción, la cual no comprendía aislar o concentrar exosomas generados durante la incubación, y en donde la preparación farmacéutica fue un suero y el tiempo de incubación fue 6 h ("ACS") y un control usando suero de control para el cual el método de producción de la presente

descripción no fue llevado a cabo (“Control”). La trayectoria NF-κB fue estimulada con varias concentraciones de IL-1β. En este experimento, las células de origen condrocítico fueron alteradas genéticamente con una construcción de ADN que consiste de un promotor CMV básico que activa un gen de luciferasa y que precede un motivo de unión de 4 dobleces (TRE) para proteínas NF-κB. Cualquier inducción de la trayectoria NF-κB en estas células es, por lo tanto, visible como una actividad de luciferasa mejorada (unidades de luz relativas (RLU)) las cuales pueden ser cuantificadas.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla y en la Figura 2.

En la Figura 2, la barra de la izquierda en cada grupo representa el Control y la barra de la derecha representa ACS.

IL-1β (ng/ml)	0.001	0.01	0.1	1	10
Aumento en Control	1.7	2.0	2.7	3.7	4.2
Aumento en ACS	3.0	3.3	4.8	5.3	6.5

Es evidente que la trayectoria NF-κB fue estimulada por IL-1β en una forma dependiente de la dosis. La preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción (“ACS”) mejoró esta estimulación, sobre todo el rango de concentraciones de IL-1β probadas.

Así, se puede concluir que una preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción estimula una trayectoria antiapoptótica.

Ejemplo 3: Radiación UV de células

En la primera serie de experimentos, las células de núcleo pulposo se ubicaron en placas de 24 agujeros en la ausencia de suero y en la presencia de una preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción, la cual estaba en la forma de un suero (“EOT”). Las

concentraciones de EOT fueron 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% y 1%. Una parte de las muestras EOT no fueron incubadas, pero se procesaron inmediatamente (“EOT0”). La otra parte de las muestras EOT fueron incubadas por seis horas (“EOT6”).

Seis horas después de ubicar las células en placas, las células fueron irradiadas con luz UV (transiluminador Herolab FT-28/312, 6 tubos nr. 29 84 100, 15 W, 312 nm). La máxima emisión fue 312 nm. La duración de la irradiación fue 80 s. Las células se cultivaron por otros 2 días a 37°C, 5% de CO₂.

Las células fueron separadas con 500 µl de 1% de tripsina y se contaron en un contador Casy. Los números de células por ml fueron los siguientes:

Aditivo	UV	Sin UV
Sin suero	1.20E+03	5.92E+05
EOT0 0.05%	2.00E+03	6.34E+05
EOT0 0.1%	1.50E+03	5.23E+05
EOT0 0.2%	2.00E+03	9.74E+05
EOT0 0.5%	2.50E+03	1.48E+06
EOT0 1%	3.50E+03	1.00E+06
EOT6 0.05%	1.50E+03	7.44E+05
EOT6 0.1%	1.20E+04	1.24E+06
EOT6 0.2%	8.00E+03	1.70+E06
EOT6 0.5%	1.00E+04	1.70+E06
EOT6 1%	1.35E+04	6.30E+05

Un gráfico de los datos se muestra en la Figura 3A.

Se encontró que la irradiación UV disminuyó considerablemente el conteo celular en la ausencia de suero. La presencia de eot0 no tuvo un gran efecto. En contraste, la presencia de EOT6 aumentó los conteos celulares por un factor de aproximadamente 10, excepto para la concentración más baja de 0.05%.

Se puede concluir que la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción contrarresta los efectos dañinos de la radiación UV. Este efecto dependió de la incubación, es decir, de la formación de componentes eficaces durante el periodo de incubación.

5 Una segunda serie de experimentos confirmaron estos resultados. En la serie, los controles no irradiados fueron omitidos. Los resultados (células/ml) se muestran en la siguiente tabla y en la Figura 3B.

Aditivo	UV
Sin suero	8.22E+04
EOT0 0.2%	8.07E+04
EOT0 0.5%	6.09E+04
EOT0 1%	7.44E+04
EOT6 0.2%	2.23E+05
EOT6 0.5%	1.48E+05
EOT6 1%	1.48E+05

De nuevo, se observó que la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción contrarresta los efectos dañinos de la radiación UV, y que este efecto dependió del paso de incubación.

Ejemplo 4: Caída en niveles CRP sistémicos

Sujetos humanos de grupos de diferentes edades (20 a 45 años, 48 a 58 años, 60 a 83 años) recibieron inyecciones intramusculares o intraarticulares de la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción, las cuales comprendían exosomas aislados. Los exosomas fueron separados de la muestra de sangre condicionada por 2 h de centrifugación a 100000 g y la bolita se resuspendió en PBS. El volumen de PBS fue un décimo del volumen del suero. Los sujetos fueron administrados de forma intramuscular 1

ml en cada caso. El número total de sujetos fue 22. Los sujetos recibieron cada uno una inyección simple, y los niveles de CRP fueron medidos antes y aproximadamente dos semanas después de la inyección.

En cada caso el nivel de proteína reactiva C (CRP) fue determinado por ELISA CRP de alta sensibilidad ("hsCRP") y comparado con el nivel antes del tratamiento. Con el fin de permitir comparar los resultados, se calculó la caída relativa en nivel CRP en cada caso. Se encontró que la caída relativa media fue menos pronunciada en el grupo de 20 a 45 años de edad, más pronunciada en el grupo de 48 a 58 años de edad y más pronunciada en el grupo de 60 a 83 años de edad.

Los resultados se muestran en la Figura 4.

Se puede concluir que la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción disminuye la inflamación, como se muestra por los niveles de CRP, y así, contrarresta una posible causa de envejecimiento. Lo hace aún más en pacientes más adultos que en pacientes más jóvenes.

Ejemplo 5: Dependencia de edad de la relación de componentes antiinflamatorios a inflamatorios

Se examinó si la edad de un ser humano tiene una influencia en la composición de la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción.

Para este fin, en una serie de experimentos in vitro se recolectaron muestras de sangre de sujetos humanos y se sometieron al método de producción de la presente descripción. Las concentraciones de IL-1 β y IL-1Ra fueron determinadas después del paso de incubación.

Se encontró que la concentración de IL-1β (componente inflamatorio) después de la incubación no fue estadísticamente significativo dependiente de la edad. Los resultados se muestran en la Figura 5A (número total de sujetos: 165).

En contraste, la concentración de IL-1Ra (componente antiinflamatorio) después de la incubación fue mayor en pacientes mayores que en pacientes más jóvenes. Los resultados se muestran en la Figura 5B (número total de sujetos: 368).

La conclusión es que la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción como un efecto antiinflamatorio y por lo tanto, contrarresta una posible causa del envejecimiento. Este efecto es aún más fuerte en pacientes más mayores que en pacientes más jóvenes, como se muestra por el hecho que la concentración de IL-1Ra después de la incubación aumenta con la edad, pero la concentración de IL-1β no.

Ejemplo 6: Cambio en función de sistema inmune

Cuatro voluntarios humanos recibieron cada uno cuatro inyecciones intramusculares de 4 ml de la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción, la cual estaba en la forma de un Suero Condicionado Autólogo (1x por semana).

Se retiró sangre completa de los sujetos en la semana 0, la semana 2, y la semana 4 y se sometió a pruebas in vitro: La producción de IL-2 y IFN-γ en la sangre completa fue probada in vitro bajo estimulación de 24 h con 5.7 µg/ml de PHA. Los niveles de CRP en la sangre fueron adicionalmente determinados mediante ELISA de proteína reactiva C de alta sensibilidad (“hsCRP”).

Se encontró que las inyecciones llevaron a una marcada disminución de la capacidad de la sangre completa de producir IL-2 y IFN-γ, como se muestra en la siguiente tabla. El hsCRP disminuyó.

Valores medios	IL-2 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	hsCRP (pg/ml)
Semana 0	88.9	375.5	2.2

Semana 2	70.5	80.2	1.9
Semana 4	35.7	82.8	1.7
Valores SD	IL-2 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	hsCRP (pg/ml)
Semana 0	91.9	233.6	2.4
Semana 2	68.4	49.8	0.4
Semana 4	39.5	69.9	1.2

La disminución en citoquinas Tipo 1 (IL-2 y IFN-γ) significa que las inyecciones han inducido un cambio del sistema inmune de inflamatorio a regenerativo/antiinflamatorio. Por lo tanto, un desequilibrio en los procesos inmunes debido a una preponderancia de los procesos inmunes Tipo 1 puede ser tratado.

A partir de esto, se puede concluir que la preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción de la presente descripción o el método de producción ajustado de la presente descripción contrarresta una posible causa del envejecimiento.

Ejemplo 7: Mediciones de elasticidad después de la inyección en la piel facial

Mediante inyección en la piel facial, se trataron 21 pacientes con una pérdida de piel facial y elasticidad (35 a 55 años de edad). Los pacientes fueron inyectados con una preparación farmacéutica preparada de acuerdo con el método de producción ajustado de la presente descripción, en donde los constituyentes celulares de la muestra de sangre han sido removidos después de la incubación, en la forma de un suero (“ACS”). El tiempo de incubación t fue 6 h y la superficie interna A fue 41 cm². Estando definido como t/A, f así fue 0.146.

La duración total del estudio fue 24 semanas. Las visitas fueron las siguientes: visita de selección (semana -2, es decir 2 semanas antes de la inscripción), visita de inscripción (semana 0), semana 2, semana 4, semana 8,

semana 12 y semana 24. La siguiente tabla muestra una visión general de las visitas. Las actividades realizadas se marcan con una “x”.

	Semana						
	-2	0	2	4	8	12	24
	Selección	Inscripción					
Consentimiento informado escrito	X						
Datos demográficos	X						
Verificación de criterio de inclusión/exclusión	X						
Historia médica	X						
Examen físico	X						
Microinyecciones intradérmicas ACS		X	X	X		(X)	
Evaluaciones	X	X	X	X	X	X	X
Examen de laboratorio y signos vitales	X						
Registro de eventos adversos	X	X	X	X	X	X	X

Los criterios de exclusión fueron enfermedades de piel crónicas severas, por ejemplo, psoriasis, eczema atópico (neurodermatitis) u otra enfermedad de piel autoinmune, cáncer de piel en la anamnesis, enfermedades sistémicas con implicación de la piel (SLE), pretratamiento con láser, toxina botulínica o ácido hialurónico, embarazo, dieta severa en los últimos 3 meses o suplemento nutricional durante la duración del estudio de 24 semanas, infección aguda, acné.

Los pacientes se sometieron a una serie de tres inyecciones de ACS en la semana 0, semana 2 y semana 4. Una cuarta inyección fue suministrada en la semana 12 para la mayoría de los pacientes.

Aproximadamente 2 ml de ACS fueron inyectados intradérmicamente (a una profundidad de 1 a menos de 3 mm) en total en cada sesión. Las inyecciones se hicieron manualmente en ambas regiones malaras (≤ 1 ml por región) en una cuadrícula de 1 cm de distancia entre los sitios de inyección colindantes. En cada mejilla se trató un área de aproximadamente 4 cm por 5 cm por 20 inyecciones.

Para la evaluación primaria de la eficacia, se usó el principio de succión en la piel. Con un Cutometer® MPA 580 (Courage & Khazaka, Cologne, Alemania) se evaluaron 12 parámetros que describen las propiedades viscoelásticas de la piel por 24 semanas 7 veces (semana -2, semana 0 y semanas 2, 4, 8, 12 y 24). En el caso de no medición de eficacia en la semana 12, se realizó una administración adicional de ACS.

La variable de eficacia primaria fue ganancia en elasticidad de la piel medida con el Cutometer®. Variables adicionales fueron corneometría (medición de hidratación), Escala de Mejora Estética Global (GAIS) escala (medida de mejora/no cambio/empeoramiento) autoevaluación de atraktividad y un cuestionario.

Los resultados fueron los siguientes:

	Línea base		Semana 12		Diferencia		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Valor p
Edad del paciente	46.71	5.87					
Corneometría – cachete derecho	44.11	12.61	53.46	10.90	9.35	16.69	0.02
Corneometría – cachete izquierdo	41.09	12.51	55.93	11.58	14.84	12.74	<0.01
CORneometría – ambos cachetes	42.61	12.13	54.70	10.43	12.09	13.83	<0.01
Cutometer R0 – ambos cachetes	0.34	0.03	0.24	0.05	-0.10	0.05	<0.01

Cutometer R1 – ambos cachetes	0.10	0.03	0.06	0.02	-0.04	0.02	<0.01
Cutometer R2 – ambos cachetes	0.69	0.07	0.74	0.06	0.04	0.06	0.01
Cutometer R3 – ambos cachetes	0.39	0.04	0.29	0.06	-0.10	0.05	<0.01
Cutometer R4 – ambos cachetes	0.18	0.04	0.11	0.04	-0.06	0.03	<0.01
Cutometer R5 – ambos cachetes	0.36	0.06	0.45	0.10	0.09	0.08	<0.01
Cutometer R6 – ambos cachetes	0.39	0.05	0.48	0.07	0.09	0.09	<0.01
Cutometer R7 – ambos cachetes	0.26	0.04	0.30	0.05	0.04	0.04	<0.01
Cutometer R8 – ambos cachetes	0.23	0.03	0.18	0.04	-0.06	0.04	<0.01
Cutometer R9 – ambos cachetes	0.05	0.01	0.05	0.01	0.00	0.01	0.05
Cutometer F0 – ambos cachetes	0.05	0.01	0.05	0.01	-0.01	0.01	<0.01
Cutometer F1 – ambos cachetes	0.05	0.01	0.04	0.01	-0.01	0.01	<0.01
Cutometer Q0 – ambos cachetes	67.65	6.97	48.10	10.01	-19.55	9.89	<0.01
Cutometer Q1 – ambos cachetes	0.61	0.07	0.65	0.06	0.04	0.06	0.01
Cutometer Q2 – ambos cachetes	0.45	0.06	0.51	0.07	0.06	0.05	<0.01

Cutometer Q3 – ambos cachetes	0.16	0.02	0.15	0.03	-0.02	0.03	0.02
Relación de cutometer R1/R4 – ambos cachetes	0.58	0.05	0.55	0.05	-0.02	0.06	0.12
Relación de cutometer R3/R9 – ambos cachetes	7.50	1.07	5.93	0.92	-1.57	1.12	<0.01

SD: desviación estándar

Diferencia: visita 5 menos línea base

Valor p: Prueba t emparejada

5 No se notó que incluso pequeñas diferencias puedan llevar a un resultado estadísticamente significativo, en caso que la desviación estándar sea pequeña.

Comparando la semana 12 y la línea base, el valor R0 fue disminuido en gran medida por aproximadamente 30%, de 0.34 a 0.24 (significativo). Esto puede ser considerado como una diferencia representativa de una diferencia de edad de dos
10 décadas. El valor R5 aumentó en gran medida por aproximadamente 25% (significativo).

Sin atarse a la teoría, el aumento significativo en elasticidad puede deberse a una activación de fibroblastos.

Así, se puede concluir que los efectos duran por lo menos 12 semanas.

		Línea base	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 12
Suma total	Número	21	21	21	21	21
	Porcentaje	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Fenotipo de piel						
Tipo II	Número	11				
	%	52.38				
Tipo III	Número	7				

	%	33.33				
Tipo IV	Número	3				
	%	14.29				
Condición de la piel						
Normal	Número	8				
	%	38.10				
Seca	Número	10				
	%	47.62				
Grasosa	Número	3				
	%	14.29				
Sensibilidad						
No sensible	Número	14				
	%	66.67				
Sensible	Número	7				
	%	33.33				
GAIS cachete derecho (investigador)						
Peor	Número		0	0	0	0
	%		0.00	0.00	0.00	0.00
Sin cambio	Número		19	14	13	10
	%		90.48	66.67	61.90	47.62
Mejorado	Número		2	7	8	11
	%		9.52	33.33	38.10	52.38
Muy mejorado	Número		0	0	0	0
	%		0.00	0.00	0.00	0.00

GAIS cachete izquierdo (investigador)						
Peor	Número		0	0	0	0
	%		0.00	0.00	0.00	0.00
Sin cambio	Número		18	12	8	7
	%		85.71	57.14	38.10	33.33
Mejorado	Número		3	9	13	14
	%		14.29	42.86	61.90	66.67
Muy mejorado	Número		0	0	0	0
	%		0.00	0.00	0.00	0.00
GAIS cachete derecho (persona de prueba)						
Peor	Número		0	0	0	0
	%		0.00	0.00	0.00	0.00
Sin cambio	Número		14	10	5	8
	%		66.67	47.62	23.81	38.10
Mejorado	Número		6	10	15	12
	%		28.57	47.63	71.43	57.14
Muy mejorado	Número		1	1	1	0
	%		4.76	4.76	4.76	0.00
GAIS cachete izquierdo (persona de prueba)						
Peor	Número		0	0	0	1
	%		0.00	0.00	0.00	4.76
Sin cambio	Número		15	11	5	8
	%		71.43	52.38	23.81	38.10
Mejorado	Número		6	10	16	12

	%		28.57	47.62	76.19	57.14
Muy mejorado	Número		0	0	0	0
	%		0.00	0.00	0.00	0.00
Autoevaluación de atractividad						
Algo no atractivo	Número	1	0	0	0	0
	%	4.76	0.00	0.00	0.00	0.00
Moderadamente atractivo	Número	15	14	16	17	12
	%	71.43	66.67	76.19	80.95	57.14
Algo atractivo	Número	5	6	5	4	9
	%	23.81	28.57	23.81	19.05	42.86
Bastante atractivo	Número	0	1	0	0	0
	%	0.00	4.76	0.00	0.00	0.00

Ejemplo 8: Proliferación de células de origen de núcleo pulposo

Se preparó una preparación farmacéutica de acuerdo con el método de producción ajustado de la presente descripción en la forma de un suero (“ACS”). El tiempo de incubación t fue 6 h y la superficie interna A fue 41 cm². Estando definido como t/A, f era 0.146.

Se estableció que ACS es capaz de promover la proliferación celular in vitro. Acá, se evaluaron diferentes componentes de ACS para promover la proliferación de células de núcleo pulposo (NP) in vitro.

Las células de núcleo pulposo fueron ubicadas en placas en un cultivo celular de 96 agujeros a una densidad de ca. 4500 células/agujero. Luego las células fueron alimentadas con varios componentes de ACS: el ACS fue fraccionado por medio de

una columna de exclusión de tamaño (IZON qEV, cf. Columnas de Exclusión de Tamaño qEV para separación EV y purificación <http://www.izon.com/assets/SideColumnPDFs/qEV-Brochure-April-15.pdf>). Esta columna es capaz de separar exosomas (EV) de proteínas y otros componentes.

5 Las partículas más grandes (EV) son eluidas primero, seguido por las más pequeñas gradualmente. El número de fracción exacto puede depender de factores tales como búfer, temperatura y la identidad del fluido aplicado (por ejemplo, suero, plasma u otros fluidos). Sin embargo, habrá por lo menos 2 picos separados que tienen actividad pro-proliferativa.

10 Brevemente, las columnas qEV fueron equilibradas con medio de cultivo celular (DMEM, Gibco); 500 µl de ACS fueron aplicados a las columnas y se fraccionaron de la siguiente forma. Los primeros 1.5 ml fueron descartados, el líquido siguiente fue recolectado en fracciones de 350 µl. Las fracciones fueron usadas para alimentar células y se determinaron los números de células por medio
15 de un ensayo CCK-8 ("Kit-8 de Conteo Celular").

CCK-8 suministra un ensayo colorimétrico sensible para la determinación de viabilidad celular. Una sal de tetrazolio altamente soluble en agua, WST-8, se redujo por actividades de deshidrogenasa en células para dar un tinte de formazan de color naranja, el cual es soluble en el medio de cultivo celular. La absorción a 450 nm es
20 proporcional para activar la mitocondria en células, ver <http://www.dojindo.eu.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>. La cantidad de tinte de formazan, generado por las actividades de deshidrogenasas en células, es directamente proporcional al número de células vivas.

Los resultados documentan que los exosomas son capaces de promover la
25 proliferación celular NP. La línea base fue la proliferación celular con DMEM únicamente.

En el primer ensayo CCK-8 (Figura 6A) los exosomas se diluyen en las fracciones 8 y 9. Empezando con la fracción 10, las proteínas (incluyendo los

factores de crecimiento de ACS) comienzan a eludir y forman otro pico que lleva a la proliferación celular. Las fracciones de 16 contenían componentes que no estimularon el crecimiento celular.

En el segundo ensayo CCK-8 (Figura 6B) los exosomas se eluden en fracciones 5 a 8, y las proteínas se eluden en las fracciones 9 a 11. Las fracciones de 12 contenían componentes que no estimularon el crecimiento celular. Las fracciones 5 a 14 agrupadas combinan exosomas (EV) y proteínas.

La conclusión es que EV de ACS promueve la proliferación celular. Las proteínas de ACS también promueven la proliferación celular. ACS contiene dos grupos de componentes que independientemente promueven la proliferación celular: EV (Exosomas) y proteínas, tal como factores de crecimiento. Un tercer grupo de componentes en ACS reduce la proliferación celular y se elude con componentes pequeños. Nota: El número de fracción exacto de los componentes depende de factores tales como: tamaño de columna, búfer y temperatura. La secuencia de los componentes no cambia bajo condiciones no desnaturalizantes. La agrupación de fracciones que contienen EV y fracciones que contienen proteínas tales como factores de crecimiento, puede trabajar sinérgicamente.

Por lo tanto, se puede concluir que ACS contiene 2 grupos de componentes que independientemente promueven la proliferación celular in vitro.

Ejemplo 9: Supervivencia celular después de irradiación UV in vitro

Se preparó una preparación farmacéutica de acuerdo con el método de producción ajustado de la presente descripción en la forma de un suero ("ACS"). El tiempo de incubación t fue 6 h y la superficie interna A fue 41 cm^2 . Estando definido como t/A , f fue 0.146.

ACS es capaz de promover la proliferación celular in vitro. Este experimento evaluó el ACS y otras preparaciones de sangre para promover la supervivencia de células de núcleo pulposo in vitro después de irradiación UV.

Brevemente, las células de núcleo pulposo fueron ubicadas en una placa de cultivo celular de 96 agujeros a una densidad de ca. 3000 células/agujero y se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂. Las células fueron alimentadas con 10%, 5%, 2.5%, 1.25% y 0.63% cada una de suero bovino fetal (FBS), ACS, plasma rico en plaquetas (PRP), plasma (idéntico a ACS pero sin incubación) y lisado de plaquetas (PL).

La mitad de dichos agujeros fueron irradiados por 30 min con radiación UV de alta intensidad. Las células en cada agujero fueron contadas por medio de IMAGER.

La Figura 7 muestra los porcentajes de células vivas en comparación con controles no complementados 24 horas después de la adición de suplemento e irradiación UV. Los datos se basan en la media de tres placas de 96 agujeros.

En la ausencia de irradiación UV (cinco columnas de la izquierda), las varias concentraciones de suplementos llevaron a números celulares en el rango de aproximadamente 50% a 150% de aquellos de controles no suplementados.

Después de la irradiación UV, la mayoría de las células no suplementadas murieron. La muerte celular ocurrió en un mayor grado que en la ausencia de irradiación UV.

Los suplementos protegieron las células en varios grados de muerte celular inducida por irradiación UV, dependiendo de su concentración. Esto se muestra por medio de los porcentajes de las células vivas en comparación con los controles no suplementados (cinco columnas de la derecha), los cuales fueron claramente por encima de 100%. La protección máxima se alcanzó con 2.5% y 1.25% de FCS y 1.25% de ACS. Los efectos de PRP y plasma fueron menos pronunciados. Una comparación entre plasma y ACS mostró que, en ciertas concentraciones, la incubación tiene un efecto claro, pero que también se puede lograr un cierto efecto en la ausencia de incubación. El lisado de plaqueta no fue efectivo en este experimento.

Conclusión: la irradiación UV causa muerte celular neta in vitro. La suplementación con preparaciones derivadas de sangre claramente aumenta la supervivencia en comparación con células no suplementadas.