

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 729**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010 E 10812011 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2471542**

54 Título: **Agente terapéutico para enfermedades relacionadas con el hígado**

30 Prioridad:

28.08.2009 JP 2009198166

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

29.07.2016

73 Titular/es:

**OSAKA AIR MACHINE SERVICE, LTD. (100.0%)
2-8-16, Ajiro-kita
Higashiosaka, Osaka 577-0058, JP**

72 Inventor/es:

MATSUYAMA, AKIFUMI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 578 729 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

Agente terapéutico para enfermedades relacionadas con el hígado

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el hígado, que incluye células progenitoras multilíneaje derivadas de tejido adiposo (en lo sucesivo en el presente documento "ADMPC").

10 **Técnica anterior**

Los trastornos hereditarios, como la hemofilia y la hipercolesterolemia familiar, son representativos de enfermedades refractarias, muchas terapias de las cuales solo controlan el empeoramiento de las afecciones de los pacientes usando tratamientos sintomáticos. Por ejemplo, la hemofilia es un trastorno hereditario que es el resultado de mutaciones en genes que codifican factores de la coagulación sanguínea expresados en el hígado, tales como el factor VIII o el factor IX, y se trata con tratamientos que se administran desde el exterior del organismo para compensar la deficiencia de estos factores. Sin embargo, las propias respuestas inmunitarias del paciente pueden provocar factores anti-coagulación circulantes, lo que da lugar a la interrupción de estos tratamientos.

Por otro lado, la hipercolesterolemia familiar (HF) es un trastorno hereditario debido a la deficiencia del receptor de LDL (lipoproteínas de baja densidad) expresado en el hígado. En pacientes homocigóticos, los medicamentos reductores del colesterol, tales como las estatinas, no tienen ningún efecto contra el trastorno. Es necesario en pacientes con HF reducir el valor de colesterol en sangre mediante diálisis periódica, pero la diálisis causa una gran cantidad de cargas físicas y económicas, y no puede inhibir la progresión de la arteriosclerosis.

Como terapias para estos trastornos causados por la disminución o pérdida de funciones de las células hepáticas se han usado trasplante de hígado o implantación de células hepáticas aisladas de individuos sanos, pero su uso todavía no se ha generalizado debido al problema de la escasez de donantes y las grandes cargas físicas que supone para los pacientes. Por otra parte, los desarrollos notables en terapias regenerativas utilizando medicina regenerativa, ingeniería de células/tejidos, ingeniería genética, y similares, proporcionan el camino a la conquista de las enfermedades refractarias. Como fuentes de materiales celulares empleados en estas terapias regenerativas, se ha atraído la atención sobre las células madre adultas derivadas de tejidos mesenquimatosos, en particular, células madre somáticas derivadas del tejido adiposo que se pueden recoger con seguridad y facilidad, y propagar en cultivo. Sin embargo, a fin de lograr la inducción de la diferenciación de estas células madre en tejidos o células concretas, y su cultivo fuera del cuerpo, se requieren grandes cantidades de costes y de mano de obra, y, por lo tanto, todavía quedan problemas por resolver.

El grupo de Seo et al. han notificado que la implantación en el hígado de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo daba lugar a su diferenciación en hepatocitos (documento no de patente 1). Informes similares presumen que a partir del hecho de que las células madre no humanas derivadas de tejido adiposo pueden injertarse en el hígado y son positivas para la albúmina en la caracterización inmunohistoquímica, en estas células madre se ha inducido diferenciación en hepatocitos en sitios regionales. Sin embargo, no está claro si o no los hepatocitos que se ha notificado que se han diferenciado y que han prendido son activos y se plantea el problema de que el número de células injertadas es significativamente pequeño.

Documentos de la técnica anterior

Documentos no patente

Documento no patente 1: M. J. Seo et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 328, (2005), 258–264.

Documento de patente: El documento US 2007/0249045 reivindica un método para derivar células madre hepáticas a partir de células madre adiposas y su uso en la regeneración del hígado.

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

En vista de las situaciones descritas anteriormente, los inventores se han dedicado a la investigación con el fin de desarrollar un método para el prendimiento en el hígado con una eficacia más alta de las células madre mesenquimatosas introducidas desde fuera del cuerpo. Los inventores encontraron que cuando las células progenitoras multilíneaje derivadas de tejido adiposo, desarrolladas por los inventores de la presente solicitud (véase, la publicación internacional panfleto nº WO 2008/153179), se administraron a través de la vena porta, se consiguieron tasas elevadas de su prendimiento en el hígado y una diferenciación eficiente en hepatocitos, lo que conduce a la realización de la presente invención.

Medios para resolver los problemas

Por tanto, la presente invención se refiere a:

- 5 (1) un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el hígado, incluyendo células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo; donde el agente se va a administrar a través de la vena porta, a través de la vena, a través de la arteria, o a través de conducto biliar;
- (2) el agente terapéutico de acuerdo con (1), donde las células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo son una población de células obtenidas por:
 - 10 (a) extracción de eritrocitos de una población de células derivadas de tejido adiposo, para formar de este modo una población de células progenitoras multilinaje derivadas de tejido preadiposo;
 - (b) cultivo de la población resultante de las células progenitoras multilinaje derivadas de tejido preadiposo;
 - 15 (c) extracción de células distintas de las células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo a partir de la población cultivada de células progenitoras multilinaje derivadas de tejido preadiposo;
- (3) el agente terapéutico de acuerdo con (1) o (2), donde el agente se va a administrar a través de la vena porta;
- (4) el agente terapéutico de acuerdo con una cualquiera de (1) a (3), donde la enfermedad relacionada con el hígado no es inflamatoria;
- 20 (5) el agente terapéutico de acuerdo con una cualquiera de (1) a (3), donde la enfermedad relacionada con el hígado se selecciona de trastornos de la coagulación de la sangre, enfermedades metabólicas y enfermedades hepáticas;
- (6) el agente terapéutico de acuerdo con (4) o (5), donde la enfermedad relacionada con el hígado es hemofilia o hipercolesterolemia familiar;
- 25 (7) un método para tratar una enfermedad relacionada con el hígado, que incluye la administración de células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo a un sujeto; y
- (8) una célula progenitora multilinaje derivada de tejido adiposo para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado, administrada a través de la vena porta, a través de una vena, a través de una arteria, o a través de un conducto biliar.

30

Efectos de la invención

La presente invención puede proporcionar, por ejemplo, un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el hígado, que incluye células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo que muestran un prendimiento aumentado y diferenciación en el hígado cuando se introduce en el cuerpo. Según la presente invención, se puede conseguir un efecto excelente de que, en comparación con los métodos anteriores o existentes, los hepatocitos de un paciente pueden reemplazarse a tasas elevadas con hepatocitos derivados de células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo, y, también, los hepatocitos reemplazados trabajan de manera integrada con el parénquima hepático del receptor a través del contacto celular.

40

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra cambios en el colesterol total en suero en un grupo en el que se implantaron hADMPC (hADMPC), un grupo en el que se implantaron hADSC (de acuerdo con un método de Zuk et al.), y un grupo sin implantación (control de solución salina). En el gráfico, el eje de abscisas representa los días transcurridos y el eje de ordenadas representa los valores de colesterol en suero total.

45

La figura 2 muestra los resultados del análisis de HPLC de colesterol en suero antes y a las 4 semanas de la implantación de hADMPC. La figura 2 (B) es una representación ampliada del pico en la figura 2 (A). En el gráfico, el eje de ordenadas representa los valores relativos de colesterol sérico.

50 La figura 3 muestra los niveles de expresión de ARNm de diversos marcadores en hADMPC, un grupo en el que se implantaron hADMPC y hepatocitos humanos. El eje de ordenadas representa los valores relativos del nivel de expresión de ARNm.

La figura 4 muestra la expresión de albúmina humana en el hígado en un grupo en el que se implantaron hADMPC. En la figura, la barra representa 100 μ m.

55 La figura 5 muestra la expresión del receptor de LDL en el hígado en un grupo en el que se implantaron hADMPC. En la figura, cada una de las barras representa 100 μ m.

La figura 6 muestra la captación de LDL en el hígado en un grupo en el que se implantaron hADMPC. En la figura, la barra representa 100 μ m.

La figura 7 muestra los cambios en los valores de colesterol en sangre en un grupo en el que se implantaron hADSC, un grupo al que se ha implantado hADMPC, un grupo de control de solución salina y conejos normales. En el gráfico, el eje de abscisas representa los días transcurridos y el eje de ordenadas representa los valores de colesterol en sangre.

60

Realizaciones para llevar a cabo la invención

La presente invención, en un aspecto, se refiere a un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el hígado, incluyendo células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo. Como se usa en el presente documento, las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo se refieren a células que son capaces de diferenciarse en diferentes linajes de células del endodermo, mesodermo y ectodermo, y expresan los marcadores de indiferenciación, Islet-1 y/o GATA-4. Las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento, se pueden obtener mediante diferenciación de células madre embrionarias y similares, además de los tejidos adiposos. Las especies de animales de las que derivan las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento no está particularmente limitadas, pero incluyen, preferentemente, por ejemplo, mamíferos, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, bovinos, caballos, monos, y otros, más preferentemente seres humanos. Es preferible que las especies de animales de los que derivan las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento son la misma especie que la de un sujeto que se va a tratar de acuerdo con la presente invención, o es un sujeto que se va a tratar de acuerdo con la presente invención.

Las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo que se utilizan en la presente invención se refieren a una población de células que tiene un contenido bajo de contaminaciones indeseadas, por ejemplo, células que no son células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo, tales como eritrocitos y células endoteliales vasculares, y, por lo tanto, tienen las ventajas de cultivar con facilidad, mayor eficiencia de la diferenciación y otras cosas. Los procedimientos para retirar estos contaminantes incluyen, por ejemplo, procedimientos o métodos que utilizan diferencias en la densidad relativa de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, métodos basados en la densidad relativa; procedimientos o métodos que utilizan diferencias en la propiedad de adhesión de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, métodos que usan agentes quelantes tales como EDTA o enzimas tales como tripsina; métodos antígeno-anticuerpo, tal como clasificación, MACA; métodos basados en la selección morfológica; clonación de células individuales; y métodos basados en la hemólisis. La reducción de los contaminantes en la población de células se pueden determinar visualmente con microscopios o, como alternativa, mediante citometría de flujo, tinción inmunohistoquímica, u otros, por ejemplo, mediante la determinación cuantitativa de los fabricantes de los contaminantes utilizando RT-PCR, ELISA, y otros métodos.

Una población de células que se utiliza en la presente invención incluye al menos 20 % o más, preferentemente 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo. Dado que las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo se incluyen en los porcentajes mencionados anteriormente, una población de células que se utiliza en la presente invención tiene las ventajas de fácil mantenimiento de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo y de proporcionar una mayor eficiencia en la diferenciación, por ejemplo. Una población de células que se utiliza en la presente invención puede incluir, además de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo, células, como células alimentadoras, que son eficaces para el mantenimiento o la diferenciación de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo, células endoteliales vasculares, células fibroblastos y las otras. La inclusión de estas células permitirá potenciar las ventajas mencionadas anteriormente.

Las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo que se utilizan en la presente invención pueden ser, por ejemplo, una población de células obtenidas mediante: (a) extracción de los eritrocitos de una población de células derivadas de tejido adiposo, para obtener de esta manera una población de células progenitoras multilínea derivadas de tejido preadiposo; después (b) el cultivo de la población resultante de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido preadiposo; (c) extracción de otras células distintas de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo de la población cultivada de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido preadiposo. En la presente invención, estas etapas pueden llevarse a cabo secuencialmente o en paralelo. Los tejidos adiposos que se utilizan en este aspecto de la presente invención pueden ser cualquiera de los tejidos adiposos subcutáneos y tejidos adiposos viscerales dentro de un cuerpo vivo. Además, las especies de animales de las que derivan los tejidos adiposos no están particularmente limitadas, pero incluyen, preferentemente, por ejemplo, mamíferos, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, bovinos, caballos, monos, y otros, más preferentemente seres humanos. Como alternativa, es preferible que las especies de animales de los que derivan los tejidos adiposos sean la misma especie que la de un sujeto que se va a tratar de acuerdo con la presente invención, o es un sujeto que se va a tratar de acuerdo con la presente invención.

Una población de células derivadas de tejido adiposo que se utiliza en la presente invención se refiere a una población de células que incluye al menos células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo. La población de células derivadas de tejido adiposo puede incluir eritrocitos, células endoteliales vasculares, células fibroblastos y otras, además de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo. La población de células derivadas de tejido adiposo se puede obtener, por ejemplo, mediante tratamiento de un tejido adiposo con una enzima tal como colagenasa, o un procedimiento o método físico y/o la eliminación de lípidos y otros, por ejemplo, con centrifugación, procesamiento de filtros, o similar.

Los eritrocitos tienen la propiedad de adsorber las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo, cuya propiedad puede causar disminución de sus rendimientos. Por lo tanto, es necesario retirar los eritrocitos de una población de células derivadas de tejido adiposo. La extracción de los eritrocitos de una población de células derivadas de tejido adiposo se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento o método, por ejemplo, mediante procedimientos o métodos distintos de aquellos que dependen de la diferencia en la propiedad de adhesión entre los eritrocitos y las otras células. Preferentemente, dicha extracción se puede efectuar por métodos basados en la densidad relativa, métodos basados en la hemólisis, métodos que utilizan filtros, más preferentemente de métodos basados en la densidad relativa. Los métodos basados en la densidad relativa se pueden llevar a cabo utilizando soluciones específicas de densidad de densidades relativas adecuadas, por ejemplo, soluciones específicas de densidad disponibles comercialmente, tales como Lymphoprep (fabricada por Nycomed). La densidad relativa de las soluciones específicas de densidad utilizados pueden ser de entre las de los eritrocitos y las otras células, preferentemente de 1,063 a 1,119, más preferentemente de 1,070 a 1,110, más preferentemente 1,077.

Tal como se utiliza en la memoria una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo se refiere a una población de células que incluye al menos células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo. La población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo puede incluir eritrocitos, células endoteliales vasculares, células fibroblastos y otras, además de las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo. Como se ha descrito anteriormente, la población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo está sustancialmente libre de eritrocitos. La extracción de los eritrocitos, para formar de este modo una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo, hará que sea posible llevar a cabo con gran facilidad y una eficiencia elevada la posterior extracción de células distintas de las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo.

En la presente invención, es preferible que una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo se cultive en un cultivo de adhesión, desde los puntos de vista de mantenimiento de estas células en su estado indiferenciado y de llevar a cabo la extracción eficiente, como se describe a continuación, de células distintas a las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo. El cultivo de adhesión puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, usando placas, matraces, frascos rotarios o matraces de agitación. Además, es preferible, desde el punto de vista de llevar a cabo la extracción eficaz de células distintas de las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo, que una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo se cultive durante un periodo de tiempo suficiente para que las células, tales como células sanguíneas endoteliales, células fibroblastos, y otras, que están contenidas en la población celular, puedan adherirse bien a las superficies de contacto de los vasos de cultivo. Por ejemplo, una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo puede cultivarse durante un período de 12 a 48 horas, preferentemente de 12 a 36 horas.

En la memoria descriptiva, las células distintas de las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo se refieren a, por ejemplo, las células adhesivas, tales como células sanguíneas endoteliales, células fibroblastos, y otras. La extracción de células distintas de las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo de una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento o método, preferentemente utilizando sustancias distintas de tripsina, más preferentemente agentes quelantes tales como EDTA y EGTA, lo más preferentemente EDTA. Preferentemente, dicha extracción se basa en la diferencia en la propiedad de adhesión entre las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo y las otras células. Además de lo anterior, es posible extraer células distintas a las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, mediante filtración a través de filtros. La extracción de estas otras células aumentará la pureza y el rendimiento de las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo que se obtienen.

En la presente invención, las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo, como se describen en el presente documento, pueden usarse, por ejemplo, para agentes terapéuticos como se describe a continuación, usando directamente una población de células que se obtiene mediante la extracción de células que no sean las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo de una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo, o, como alternativa, después de la expansión cultivando la población obtenida de las células. Tal cultivo de expansión se puede realizar no solo después de extraer células distintas de las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo de una población de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido preadiposo, sino durante el transcurso de la preparación de células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo de un tejido adiposo. El cultivo de expansión se lleva a cabo, preferentemente, en un cultivo de adhesión. Además, la población celular resultante se puede utilizar para agentes terapéuticos, por ejemplo, después de congelar y descongelar en presencia de un crioprotector adecuado o similar.

En la presente invención, las formas de dosificación de los agentes terapéuticos mencionados anteriormente no están particularmente limitadas, pero, preferentemente, están en forma de suspensiones celulares. Las células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo como se describe en el presente documento pueden suspenderse en soluciones adecuadas, tales como solución de Ringer, para preparar agentes terapéuticos. Como alternativa, las suspensiones celulares que se han congelado en presencia de un crioprotector adecuado o similares pueden descongelarse y usarse como agentes terapéuticos. En estos agentes terapéuticos, las concentraciones

celulares son, preferentemente, 1×10^5 células/ml o más. Un agente terapéutico de la presente invención puede incluir, adicionalmente, además de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo, sustancias que estimularán el prendimiento de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo en el hígado, tales como heparina o ácido hialurónico, agentes de mejora de la función hepática, tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (tal como Mevalotin), fibratos (tal como Bezatol), adsorbentes de ácidos biliares (tal como colestiramina) o inhibidores de la absorción de ácidos biliares (tal como Zetia), y aditivos y excipientes adecuados, y otras.

Un agente terapéutico de la presente invención se aplica por vía parenteral y se puede administrar, a través de la vena porta, a través de una vena, a través de una arteria, o a través de un conducto biliar. Desde el punto de vista de lograr una diferenciación de alta eficiencia y el prendimiento en el hígado, es preferible administrar un agente terapéutico de la presente invención a través de la vena porta. La administración de un agente terapéutico de la presente invención a través de la vena porta puede conseguir un efecto excelente de que, en comparación con los métodos anteriores o existentes, los hepatocitos de un paciente pueden reemplazarse a tasas elevadas con hepatocitos derivados de células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo, y, también, los hepatocitos reemplazados trabajan de manera integrada con el parénquima hepático del receptor a través del contacto celular. La cantidad de dosificación, la frecuencia de administración y el número de administraciones, etc. de un agente terapéutico de la presente invención se seleccionan según sea apropiado, dependiendo de varios factores, tales como la enfermedad de un sujeto que se va a tratar y la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, la cantidad de dosificación de un agente terapéutico de la presente invención puede ser de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por kg de peso corporal o más, preferentemente de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células por kg de peso corporal o más, y más preferentemente de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células por kg de peso corporal o más. El sujeto puede ser cualquier sujeto, por ejemplo, sujetos humanos o, como alternativa, sujetos no humanos tales como sujetos mamíferos, tales como ratones y monos.

Una enfermedad relacionada con el hígado como pretende la presente invención se refiere a una enfermedad que es el resultado de la disminución de la función hepática. Entre las enfermedades resultantes de la disminución de la función hepática se incluyen enfermedades que son el resultado de no solo de la disminución de la función, sino de la alteración de la función, del hígado o de los hepatocitos, por ejemplo, enfermedades hepáticas tales como hepatitis, cirrosis hepática, cáncer de hígado, e insuficiencia hepática; lesiones hepáticas inducidas por fármacos; lesiones hepáticas alcohólicas; trastornos hepáticos colestáticos; trastornos de la coagulación de la sangre; enfermedades metabólicas, y otras. En la presente invención, la enfermedad relacionada con el hígado puede ser inflamatoria o no inflamatoria. Las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo que están contenidas en un agente terapéutico de la presente invención se caracterizan porque su administración a través de la vena porta da lugar a su diferenciación y prendimiento con una alta eficiencia también en un hígado no inflamado y, por lo tanto, tiene la ventaja de ser particularmente eficaz para enfermedades no inflamatorias relacionadas con el hígado. Las enfermedades no inflamatorias relacionadas con el hígado incluyen trastornos de la coagulación de la sangre, tal como la hemofilia, trastornos del metabolismo de los lípidos, tal como la hipercolesterolemia familiar, y trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono, tal como mucosacaridosis.

Con el fin de mejorar aún más los efectos terapéuticos contra las enfermedades relacionadas con el hígado de acuerdo con la presente invención, un agente terapéutico de la presente invención se puede usar en combinación con otros fármacos. Por ejemplo, en los casos del tratamiento de la hipercolesterolemia familiar, un agente terapéutico de la presente invención se puede usar en combinación con uno o más fármacos hipocolesterolemiantes seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la HMG-CoA reductasa (las denominadas estatinas) tales como pravastatina, pitavastatina, y simvastatina; fibratos tales como clofibrato, clinofibrato, bezafibrato y fenofibrato; formulaciones de nicotinato tales como nicotinato de tocoferol, y nicomol; adsorbentes de ácidos biliares tales como colestiramina y colestimida; antioxidantes tales como probucol; inhibidores de la absorción del colesterol tales como ezetimiba, y otros, y, preferentemente, se pueden usar especialmente en combinación con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, tales como pravastatina, pitavastatina, y simvastatina. En los casos de tratamiento de la hemofilia, la administración de un agente terapéutico de la presente invención se puede combinar con la administración de factor VIII o de factor IX.

Además, para el fin mencionado anteriormente, la presente invención se puede aplicar a sujetos en combinación con tratamientos terapéuticos conocidos que normalmente se administran para enfermedades relacionadas con el hígado. Por ejemplo, en los casos del tratamiento de la hipercolesterolemia familiar, la presente invención se puede aplicar al sujeto, por ejemplo, en combinación con aféresis de LDL. Del mismo modo, en los casos de tratamiento de la hemofilia, la presente invención se puede aplicar al sujeto en combinación con terapia de reemplazo con factores de coagulación sanguínea, tal como el factor VIII o el factor IX.

Los efectos del tratamiento de enfermedades relacionadas con el hígado de acuerdo con la presente invención se pueden determinar, por ejemplo, mediante la medición, por medio de PCR cuantitativa, de la expresión de genes, tales como α -fetoproteína, albúmina, CYP1B1, glutamina sintetasa, queratina-18 y queratina-19, en las muestras obtenidas mediante procedimientos apropiados, tales como biopsia, o, como alternativa, mediante la medición, por medio de PCR cuantitativa, ELISA, o similar, de sustancias marcadoras, tal como transtiretina, α -antitripsina, tirosina aminotransferasa y glucosa-6-fosfatasa, cuya expresión se sabe que disminuye o aumenta en asociación con la diferenciación y la generación de hepatocitos. Además, cuando se administra un agente terapéutico de la presente

invención a pacientes de hemofilia o de HF, los efectos pueden verificarse, por ejemplo, según la presencia o ausencia de la trombina producida o los cambios en los valores de colesterol en sangre después de la administración.

5 La presente invención, en un aspecto adicional, se refiere al uso de una célula progenitora multilinaje derivada de tejido adiposo tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el hígado. En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una célula progenitora multilinaje derivada de tejido adiposo tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado.

10 A continuación se proporcionan ejemplos para describir la presente invención más específicamente y con mayor detalle, que se describen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar la presente invención. En los ejemplos siguientes, las diferencias en el promedio entre los grupos a los que se ha implantado hADMPC y los controles se evalúan mediante la prueba t de Student con un Estática SPSS 17.0 (SPSS).

15 **Ejemplo 1**

Preparación de células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo humano (hADMPC)

20 1-1. Recogida de tejidos adiposos

Se recogieron tejidos adiposos de cinco sujetos (cuatro varones y una mujer de 20 a 60 años de edad) de los que se había obtenido el consentimiento informado de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO2008/153179.

25 1-2. Preparación de hADMPC

30 Los tejidos adiposos recogidos se trituraron y digirieron en solución tampón de Hank (HBSS; GIBCO Invitrogen) que contiene 075 % de colagenasa (Sigma Aldrich) a 37 °C durante una hora. El producto de digestión se filtró a través de un filtro Cell Strainer (BD Bioscience), seguido de centrifugación a 800 x g durante 10 minutos. Después se usó Lymphoprep (d = 1,077; Nycomed) para extraer los eritrocitos mediante un método específico de densidad.

35 Las células resultantes se sembraron en medio DMEM (GIBCO Invitrogen) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FBS; Hyclone). Después de cultivar las células a 37 °C durante una hora y lavar células adheridas con PBS, las células adheridas se trataron con una solución de 0,2 g/l de EDTA (NACLAI TESQUE, INC.) y se obtuvo una población de células desprendidas como células progenitoras multilinaje derivadas de tejido adiposo (hADMPC).

1-3. Propagación y caracterización de hADMPC (1) Propagación de hADMPC

40 En placas recubiertas con fibronectina humana (BD BioCoat), las hADMPC obtenidas en 1-2 se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² y se cultivaron en un medio que consiste en 60 % de DMEM con niveles bajos de glucosa, 40 % de MCDB-201 (Sigma Aldrich), 1 x ITS (GIBCO Invitrogen), dexametasona 1 nM (Sigma Aldrich), ácido 2-fosfato-ascórbico 100 µM, 10 ng/ml de EGF (PreproTec), y 5 % de FBS. Después de 2 a 3 pasadas, las hADMPC exhibieron una estructura de capa única de células aplanadas que tienen diámetros de aproximadamente 25 a 30 µm. En la presente invención, las hADMPC pasadas de cinco a seis veces se utilizaron para la implantación. Con las hADMPC utilizadas en los experimentos de implantación, se caracterizó la expresión como se describe a continuación.

50 (2) Caracterización de la expresión de antígenos de superficie celular

Las hADMPC después de cinco a seis pasadas se examinaron para determinar la expresión de ABCG-2, SSEA-4, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD105, CD117, CD133, y CD166, utilizando análisis FACS. Se encontró que las hADMPC en la presente invención expresan CD29 y CD44 (receptor del ácido hialurónico), los marcadores de superficie que se expresan en células madre mesenquimatosas o neurales, pero no en células ME, así como CD73, CD105 (endoglina), y CD166, y, además, SSEA-4. Por otro lado, las células madre derivadas de tejido adiposo (hADSC), que se notificaron en Mol. Biol. Cell, 13, 4.279-4295 (2002), fueron negativas para CD45, que es un marcador del linaje hematopoyético, y para ABCG-2, CD34, y CD133, que son marcadores de células madre hematopoyéticas. A partir de estos resultados, se comprobó que las hADMPC en la presente invención era una población de células diferentes de las hADSC.

60 (3) Caracterización de la expresión de ARNm

65 Las hADMPC después de cinco a seis pasadas se examinaron para determinar la expresión de ARNm de islet-1, Nkt2, 5 y GATA-4, utilizando el análisis de RT-PCR. Se encontró que las hADMPC de la presente invención expresaban islet-1, que es un marcador de indiferenciación, y GATA-4, que es un marcador de las células progenitoras hepáticas, y, además, Nkx2.5. Por otro lado, se encontró que las hADSC no expresan ninguno de islet-

1, Nkt2, 5 y GATA-4.

(4) Capacidad de diferenciación de las hADMPC en diversos tipos de células

5 Con las hADMPC obtenidas mediante los procedimientos descritos anteriormente, se encontró que de acuerdo con el método descrito en el documento WO2008/153180, se indujo la diferenciación de las hADMPC en células pancreáticas (células secretoras de insulina), hepatocitos, mioblastos cardíacos, adipocitos, o tejido óseo, y, por lo tanto, tenían la capacidad de diferenciarse en células de tejidos de diversos linaje (datos no mostrados).

10 Ejemplo 2

Efectos de la implantación de hADMPC en un modelo de conejo de hipercolesterolemia familiar

2-1. Implantación de hADMPC

15 Se anestesió a conejos con hipercolesterolemia hereditaria de Watanabe, un modelo animal de hipercolesterolemia familiar (conejos WHHL; disponibles en KITAYAM LABES Co., Ltd.) con una dosis de 50 mg/kg de pentobarbital y se les realizó una incisión hasta el borde del pecho. Después, 5×10^7 hADMPC, obtenidas en el Ejemplo 1-3 (1), se suspendieron en 3 ml de HBSS y se administraron a través de la vena porta utilizando una jeringa de calibre 24 (grupo en el que se implantaron hADMPC). Además, los conejos del modelo en los que se administró HBSS en lugar de la suspensión que contiene hADMPC en el protocolo anterior se utilizaron como grupo control para análisis como se describe a continuación.

2-2. Tratamientos inmunosupresores y antivirales

25 En la presente invención, los conejos se sometieron a tratamientos de inmunosupresión y antivirales de acuerdo con procedimientos descritos a continuación, con el fin de implantar células humanas en los conejos. Durante un período desde el día anterior (día -1) del día en que se realizó la implantación de hADMPC (día 0) hasta el día del sacrificio, cada conejo recibió administraciones intramusculares de ciclosporina (6 mg/kg/día) y rapamicina (0,05 mg/kg/día).
30 Cada conejo recibió administraciones escalonadas de metilprednisolona a dosis de 3 mg/kg/día (días 1 a 7), 2 mg/kg/día (días 8 a 14), 1 mg/kg/día (días 15 a 21), y 0,5 mg/kg/día (día 22 al día del sacrificio). Se administró ciclofosfamida (20 mg/kg/día) los días 0, 2, 5 y 7. Se administró ganciclovir (2,5 mg/kg/día i.m.) se con el fin de prevenir la infección viral de los conejos, que se hicieron susceptibles a la infección debido a la inmunosupresión. El grupo de control también se sometió a tratamientos de inmunosupresión de una manera similar a la descrita anteriormente.

2-3. Análisis

(1) Perfil lipídico

40 Se analizaron los cambios cuantitativos y cualitativos en el colesterol sérico en el grupo en el que se implantaron hADMPC. Con el grupo en el que se implantaron hADMPC (n = 7), un grupo en el que se implantaron hADSC (de acuerdo con el método de Zuk et. Al.) (n = 3), y el grupo control (n = 5), se obtuvieron los sueros de conejos sin ayunar antes y después de la implantación. Se usó un kit de ensayo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para medir el colesterol total en suero hasta 12 semanas después de la implantación.

50 Como se muestra en la Figura 1, el grupo en el que se implantaron hADMPC presenta una gran disminución del colesterol total en suero en un plazo de tres semanas desde la implantación y mantuvo una tendencia de disminución del colesterol total en suero durante todo el periodo de medición. El nivel de colesterol total en suero en un grupo de conejos WHHL antes de la implantación de hADMPC fue de 500 a 800 mg/dl, y a las tres semanas de la implantación, el grupo después de la implantación de hADMPC tenía un colesterol total en suero de aproximadamente 400 mg/dl y se encontró que tenía una disminución significativa del colesterol total en suero, en comparación con el grupo de control, que tenía un colesterol total en suero de aproximadamente de 639 mg/dl.

55 Con el fin de investigar los efectos de la implantación de hADMPC sobre la relación relativa de HDL y LDL, su fraccionamiento se realizó mediante cromatografía de líquidos de presión media/alta (FPLC). Los resultados se muestran en la figura 2. En la figura, el panel del lado derecho [sic] se muestra como una representación ampliada de los cromatogramas del panel del lado izquierdo [sic].

60 Como se muestra en la figura 2, a las cuatro semanas de la implantación de hADMPC, el pico de colesterol LDL se redujo aparentemente y se detectó una fracción de colesterol HDL. El incremento del colesterol HDL es un fenómeno que se observa después de que las LDL se han reducido mediante los tratamientos terapéuticos existentes o cuando se ha introducido un ADNc para un receptor de LDL con un vector de adenovirus, y se sabe que reduce el riesgo de enfermedades coronarias cardíacas.

65

(2) Comprobación de que las hADMPC implantadas se diferencian en hepatocitos y están activas *in vivo* - 1

Con el fin de comprobar que las hADMPC implantadas se diferencian en hepatocitos *in vivo*, los niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hepatocitos maduros se examinaron en los hígados del grupo en el que se implantaron hADMPC. Se implantó a los conejos WHHL hADMPC y se les sacrificó 12 semanas más tarde, y se extrajo el hígado de cada conejo. Se aisló el ARN total de cada hígado y se sometió a RT-PCT cuantitativa utilizando un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900 (Applied Biosystems), para el análisis de la expresión de la alfa-1 antitripsina (hAAT1), albúmina humana (hAlb), factor humano IX (hFactor9), GATA-4 humana (hGATA4), factor nuclear 3β de hepatocitos humanos (HNF-3beta), receptor de LDL humano (hLDL-R) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) como marcadores de hepatocitos maduros. En la RT-PCT cuantitativa, las hADMPC antes de la implantación se usaron como control, y los niveles de ARNm se normalizaron mediante la expresión de GAPDH. Las sondas TaqMan utilizadas para estos marcadores se dan en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Nombre del gen	ID del ensayo
hAAT1	Hs01097800_m1
hAlb	Hs00609411_m1
hFactor9	Hs00609168_m1
hGATA4	Hs00171403_m1
HNF-3beta	Hs00232764_m1
hLDL-R	Hs00181192_m1
hGAPDH	Hs99999905_m1

Los resultados se muestran en la figura 3. Se comprobó que en los hepatocitos del grupo en el que se implantaron hADMPC, los ARNm marcadores se expresaron a niveles más altos que en el grupo de hADMPC.

(3) Comprobación de que las hADMPC implantadas se diferencian en hepatocitos y están activas *in vivo* - 2

Con el fin de comprobar si las hADMPC implantadas se diferencian en hepatocitos y funcionan *in vivo*, la presencia de la proteína albúmina humana en el suero del grupo en el que se implantaron hADMPC se analizó de acuerdo con procedimientos convencionales usando inmunotransferencia y ELISA.

La inmunotransferencia de los sueros antes de la implantación hADMPC verificó que el anticuerpo específico anti-albúmina humana usado en este experimento (policlonal de cabra, bovino, de ratón y cerdo, purificado por afinidad absorbido en ALB; Bethyl Laboratories) no detectó seroalbúmina de conejo.

Los resultados de ELISA mostraron que se detectaba seroalbúmina humana a las tres semanas de la implantación y se expresaba durante el posterior periodo de análisis. El hecho de que se observó que se producía albúmina humana en el grupo en el que se implantaron hADMPC implica que hay presentes hepatocitos derivados de ADMPC que sobreviven y que funcionan.

(4) Comprobación de que las hADMPC migran al parénquima hepático, se diferencian en hepatocitos, y la funcionan

Con el fin de comprobar que las hADMPC se diferencian en hepatocitos en lugares adecuados, secciones de los hígados del grupo al que se han implantado hADMPC se sometieron a análisis histoquímico.

Como indicador se usó DiO (perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarboclanina; Sigma Aldrich). Las hADMPC pretratadas con DIO (DiO-hADMPC) se implantaron en conejos WHHL a través de la vena porta. Una semana después de la implantación, se sacrificó a los conejos y se observaron las secciones de tejido preparadas con un microscopio de fluorescencia. Las DiO-hADMPC se localizaron en sitios alrededor de la vena porta y en una semana después de la implantación, migraron, con cambios morfológicos, al parénquima hepático en la dirección del centro de los lóbulos hepáticos.

A los conejos WHHL se les implantó hADMPC a través de la vena porta y se les sacrificó 12 semanas después. Se extrajo el hígado de cada conejo y se fijó en formalina al 10 % y se realizó inmunotinción de las secciones congeladas preparadas con anticuerpos anti-albúmina humana y anti-receptor de LDL.

Los resultados usando estos anticuerpos se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente. Cuando se observan con microscopio de fluorescencia, se encontró células que eran positivas para albúmina humana y para el receptor de LDL presentes en la dispersión, en contacto con e integrándose con las células huésped alrededor de las venas del parénquima hepático. La presencia de células positivas para albúmina humana verificó que las hADMPC implantadas se diferenciaban en hepatocitos, y el hecho de que estos hepatocitos eran positivos para el receptor de LDL verificó que las células diferenciadas eran activas.

Se cree que los hepatocitos nativos migran desde la vena porta hacia el centro de los lóbulos hepáticos. La migración de las hADMPC y la presencia de hepatocitos derivados de hADMPC en los hígados de los conejos WHHL son conforme a este modelo. También se ha demostrado que las señales en la interacción entre los hepatocitos o entre hepatocitos y matrices se mantienen entre los hepatocitos derivados de hADMPC y los hepatocitos afectados (conejos WHHL).

(5) Captación *in vitro* de LDL por los hepatocitos derivados de hADMPC

Con el fin de comprobar la captación *in vitro* de LDL por los hepatocitos derivados de hADMPC, las secciones de los hígados del grupo en el que se implantaron hADMPC se sometieron a análisis histoquímico.

Se aislaron LDL humanos (densidad de 1,019 a 1,063 g/ml) de la sangre de un donante con niveles normales de lípidos en sangre, mediante procedimientos secuenciales de ultrafiltración, diálisis en solución salina-EDTA y esterilización mediante filtración por un filtro de 0,2 μm y después se marcaron con DiO para preparar DiO-LDL. A los conejos WHHL se les implantaron hADMPC a través de la vena porta y se les sacrificó 12 semanas después. Se prepararon secciones de tejido de los hígados extraídos y luego se incubaron en medio DMEM libre de suero que contiene 10 $\mu\text{g/ml}$ de DiO-LDL a 37 °C durante 24 horas. Después del lavado, las secciones se fijaron en formalina al 10 %, se cortaron a un espesor de 5 μm , se montaron en un PermaFlour (JAPAN TANNER CORPORATION), y se analizaron usando un microscopio de barrido láser BioZero (KEYENCE CORPORATION) para determinar la captación *in vitro* de DiO-LDL por las células implantadas.

Los resultados se muestran en la figura 6, que indica que algunas, pero no todas, las hADMPC implantadas habían incorporado DiO-LDL. Se encontró que las células que incorporan DiO-LDL estaban presentes en la dispersión, en contacto con e integrándose con las células del parénquima hepático que no incorporan DiO-LDL. De esto, se sugiere que las hADMPC se diferencian en hepatocitos *in vivo* y reducen el colesterol en suero a través de la captación de LDL, con lo que se puede tratar a los pacientes con hipercolesterolemia familiar.

(6) Tasa de aclaramiento de LDL en el grupo al que se han implantado hADMPC

Con el fin de comprobar el metabolismo de las LDL en un grupo al que se han implantado hADMPC, se analizaron los sueros recogidos de los conejos en el grupo en el que se implantaron hADMPC.

Se anestesió a los conejos WHHL (de ocho semanas de edad, disponibles en KITAYAM LABES Co., Ltd.) con pentobarbital (50 mg/kg), se sometieron a incisión del peritoneo y se administró a través de la vena porta hADMPC suspendidas en HBSS (20 °C) (3×10^7 células/conejo, subgrupo de dosis alta, $n = 2$; 5×10^6 células/conejo para un subgrupo de dosis baja, $n = 2$) o solución salina (3 ml), utilizando jeringas de calibre 18 (grupo al que se implantaron hADMPC ($n = 5$) y grupo control ($n = 2$), respectivamente). Cada conejo se sometió a inmunosupresión como en el Ejemplo 2-2 y a ensayo del metabolismo de LDL a 8 semanas. [1-125]-human LDL (Biomedical Technologies Inc.) se suspendió en solución salina que contiene 2 mg/ml de seroalbúmina bovina y administró a través de una vena de la oreja en el grupo al que se implantaron hADMPC y el grupo control. A tiempos especificados transcurridos desde la administración (5 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 28 horas, para cada grupo), se extrajo sangre del oído del lado opuesto. Se usó ácido tricloroacético al veinte por ciento (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (320 μl de suero, 80 μl de 100 % p/v de TCA) para precipitar las LDL, incluyendo la apolipoproteína B marcada con ^{125}I y el precipitado resultante se sometió a medición por centelleo.

Los resultados se muestran en la figura 7. La tasa de aclaramiento de las LDL en el grupo al que se implantaron hADMPC fue de 2,4 veces (para el subgrupo de dosis alta) y de 1,4 veces (para el subgrupo de dosis baja), en comparación con la del grupo control en el que no se implantaron hADMPC (solución salina control), y se observó un aumento significativo en la tasa de aclaramiento de las LDL en el grupo en el que se implantaron hADMPC. En particular, el subgrupo en el que se implantaron hADMPC a dosis altas tenía la misma tasa de aclaramiento que la de los conejos normales. El grupo en el que se implantaron hADMPC también tuvo un aumento significativo en la tasa de aclaramiento de LDL, en comparación con el grupo en el que se implantaron hADSC.

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar, por ejemplo, un agente terapéutico para tratar una enfermedad relacionada con el hígado, que incluye células progenitoras multilineaje derivadas de tejido adiposo que muestran un prendimiento aumentado y diferenciación en el hígado cuando se introduce en el cuerpo. Además, la presente invención hace posible el tratamiento de enfermedades refractarias, tales como la hemofilia y la hipercolesterolemia familiar, con reducción de la carga física y económica sobre los pacientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente terapéutico que comprende células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado, donde el agente es para administrar a través de la vena porta, a través de una vena, a través de una arteria, o a través de un conducto biliar.
- 10 2. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado de acuerdo con la reivindicación 1, donde las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo son una población de células obtenidas mediante:
- 15 (a) extracción de eritrocitos de una población de células derivadas de tejido adiposo, para formar de este modo una población de células progenitoras multilínea derivadas de tejido preadiposo;
- (b) cultivo de la población resultante de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido preadiposo;
- (c) extracción de células distintas de las células progenitoras multilínea derivadas de tejido adiposo a partir de la población cultivada de células progenitoras multilínea derivadas de tejido preadiposo.
- 20 3. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el agente es para administrar a través de la vena porta.
- 25 4. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la enfermedad relacionada con el hígado no es inflamatoria.
5. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la enfermedad relacionada con el hígado se selecciona de trastornos de coagulación sanguínea, enfermedades metabólicas y enfermedades hepáticas.
6. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde la enfermedad relacionada con el hígado es hemofilia o hipercolesterolemia familiar.
- 30 7. Una célula progenitora multilínea derivada de tejido adiposo para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el hígado, donde la célula es para administrar a través de la vena porta, a través de una vena, a través de una arteria, o a través de un conducto biliar.

Fig.1

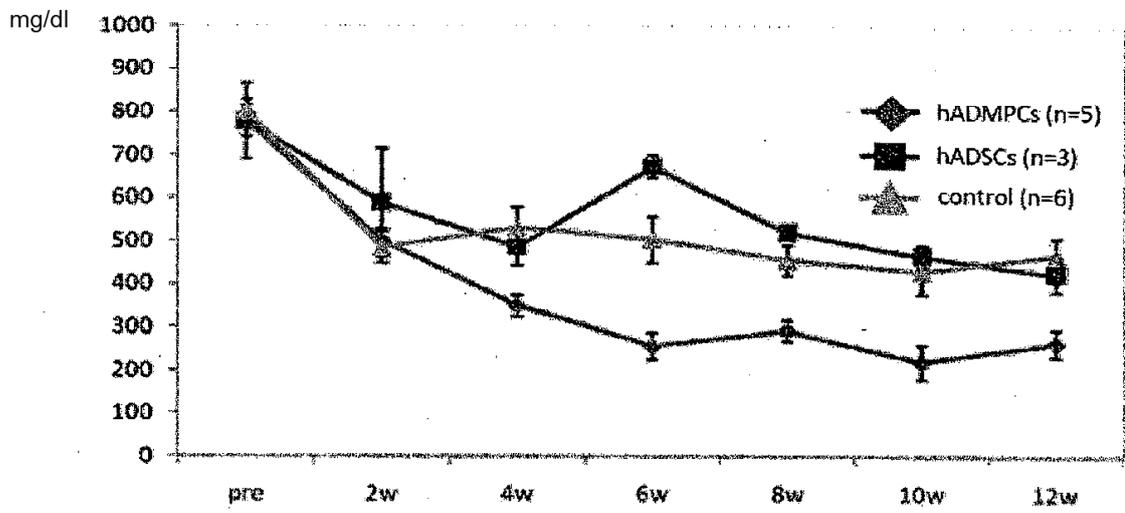


Fig.2

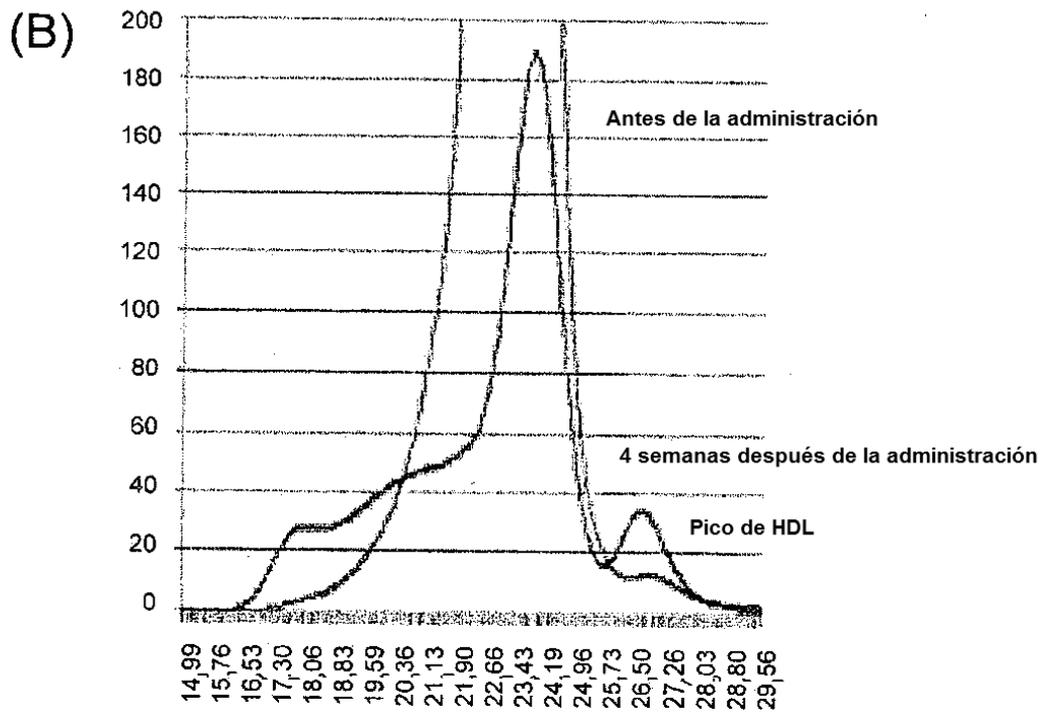
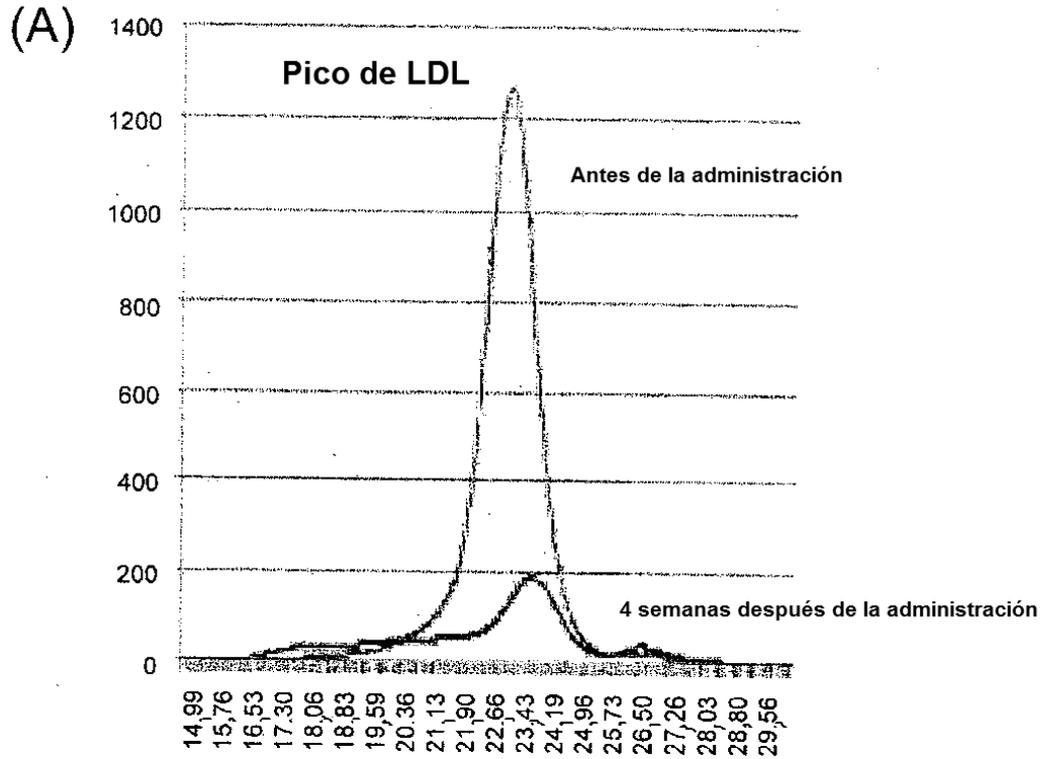


Fig.3

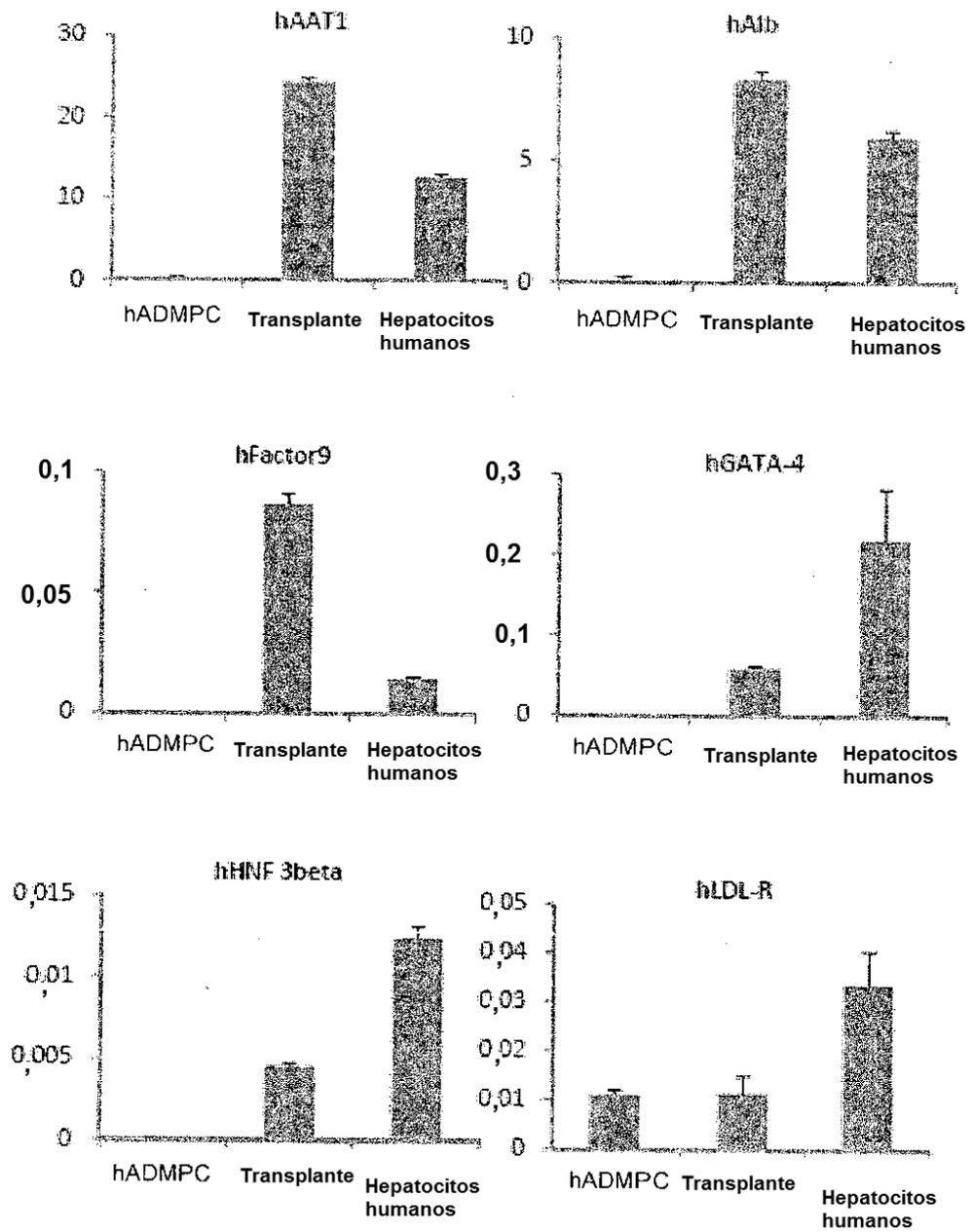


Fig.4

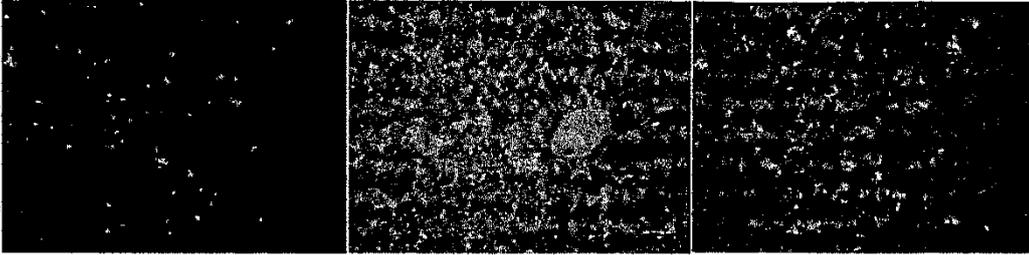


Fig.5

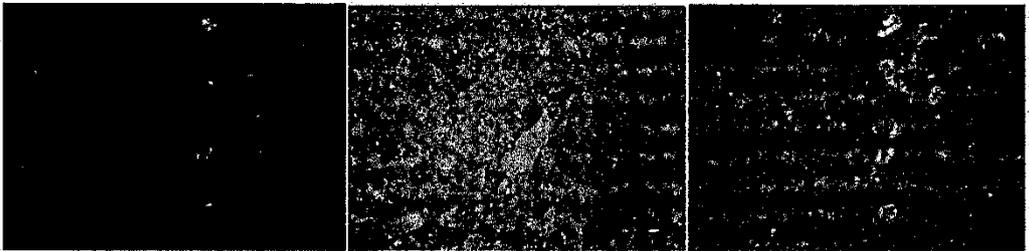


Fig.6

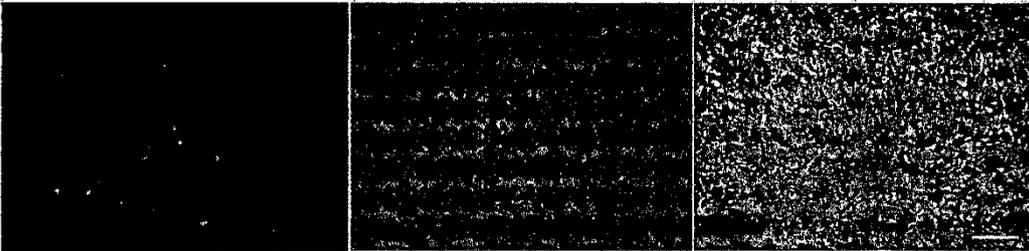


Fig.7

