

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 321**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2011** E 11006409 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** EP 2554176

54 Título: **Medios para la regeneración del hígado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2017

73 Titular/es:

**ETHIANUM BETRIEBSGESELLSCHAFT MBH &
CO. KG (50.0%)
Vossstrasse 6
69115 Heidelberg, DE y
HOPP STIFTUNG GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GERMANN, GÜNTER y
KÖLLENSPERGER, EVA**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 600 321 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

Medios para la regeneración del hígado

- 5 La presente invención se refiere a medios para el tratamiento de la enfermedad hepática aguda y crónica. En particular, se refiere a una composición que comprende células madre adiposas humanas para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica. Además, la divulgación abarca un kit que comprende dicha composición y, opcionalmente, medios para aislar células madre adiposas y/o medios para la administración de células madre adiposas.
- 10 La enfermedad hepática crónica se caracteriza por la destrucción progresiva del tejido hepático a lo largo del tiempo. En esta categoría se incluyen varias enfermedades del hígado, como cirrosis y fibrosis, siendo esta última a menudo precursora de la cirrosis.
- 15 La cirrosis es el resultado de la enfermedad hepática aguda y crónica y se caracteriza por la sustitución de tejido hepático por el tejido cicatricial fibrótico y nódulos regenerativos que conducen a una pérdida progresiva de la función hepática. La fibrosis y la regeneración nodular tiene como resultado la pérdida de la arquitectura lobular microscópica normal del hígado. La fibrosis representa el crecimiento de tejido cicatricial que resulta de, por ejemplo, infección, inflamación, lesión e incluso la curación. Con el tiempo, el tejido cicatricial fibrótico reemplaza lentamente
- 20 al tejido hepático funcional normal que tiene como resultado una cantidad decreciente del flujo sanguíneo al hígado dejando al hígado incapaz del procesamiento completo de nutrientes, hormonas, fármacos y sustancias tóxicas que se encuentran en el torrente sanguíneo. Las causas más comunes de la cirrosis incluyen el alcoholismo, las infecciones virales por hepatitis C, la ingestión de toxinas y el hígado graso, pero también existen otras muchas causas posibles.
- 25 La infección crónica por el virus de la hepatitis C y la esteatohepatitis no alcohólica son las dos principales causas de enfermedad hepática crónica en los Estados Unidos y se estima que afecta a entre tres y cinco millones de personas. Una preocupación creciente es el continuo aumento del número de ciudadanos de Estados Unidos, que actualmente asciende a más de 30 millones, con obesidad y síndrome metabólico que tienen enfermedad del hígado
- 30 graso no alcohólica, de los que aproximadamente el 10 por ciento desarrollará con el tiempo esteatohepatitis no alcohólica. Otras complicaciones corporales son una consecuencia de una pérdida de la función hepática. La complicación más común de la cirrosis es una afección conocida como ascitis, una acumulación de líquido en la cavidad peritoneal, que puede conducir a un mayor riesgo de peritonitis bacteriana espontánea, posiblemente provocando la muerte prematura del paciente. Otras complicaciones potencialmente mortales de la cirrosis incluyen la encefalopatía hepática, una anomalía neuropsicótica que se produce cuando las sustancias tóxicas de la sangre que normalmente son eliminadas por el hígado impiden el correcto funcionamiento de las células cerebrales. Sin embargo, otra complicación potencialmente mortal de la cirrosis incluye virus esofágicos o venas submucosas muy dilatadas en el esófago que son susceptibles de hemorragias.
- 40 Una vez que se ha producido en el hígado cirrosis o fibrosis, esta se considera generalmente irreversible. Por el contrario, el tratamiento convencional se centra en la prevención de cualquier otra progresión de la cirrosis en el hígado y la mitigación de las complicaciones que pueden surgir de la cirrosis. En etapas más avanzadas de la cirrosis, el único tratamiento conocido convencionalmente es un trasplante de hígado. La American Liver Foundation estima que más de 300.000 personas en los Estados Unidos son hospitalizadas cada año como consecuencia de la
- 45 cirrosis del hígado. Asimismo, se estima que 18.000 personas necesitan un trasplante de hígado. En Alemania, el número de trasplantes hepáticos fue de 5.083 en 2010, aunque aproximadamente unos 2.000 pacientes necesitan un trasplante de hígado.
- 50 El trasplante de células de hígado es un procedimiento emergente, que implica la infusión de una suspensión de células hepáticas en el sistema portal del destinatario. Su objetivo es una recuperación de la función hepática del receptor como consecuencia de injerto y la repoblación del parénquima enfermo. Sin embargo, debido a que el suministro de hepatocitos humanos maduros para el trasplante es todavía limitado, de hecho, más o menos tan limitado como la disponibilidad de todo el hígado, la investigación también tiene como objetivo la obtención de células trasplantables de otras fuentes, tales como células progenitoras y células madre, por ejemplo, de origen
- 55 embrionario o adulto, que podrían ser expandibles, por ejemplo, *in vitro*, y capaces de diferenciarse en hepatocitos maduros funcionales, especialmente *in vivo* después del trasplante. En consecuencia, existe una gran necesidad de desarrollar medios que sean útiles en el tratamiento de varias enfermedades o afecciones asociadas con enfermedades asociadas al hígado, particularmente dados los tratamientos inadecuados actualmente disponibles para la mayoría de estos trastornos.
- 60 Por lo tanto, el problema técnico subyacente de la presente invención podría ser considerado como la provisión de medios y métodos que cumplan las necesidades anteriormente mencionadas. Este problema técnico se ha resuelto mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en la presente memoria expuesta a continuación.
- 65 El objetivo de los inventores de este estudio era evaluar la posibilidad de trasplante de células madre con el fin de regenerar el hígado, en particular en el campo de las enfermedades crónicas del hígado, ampliar las opciones

terapéuticas actualmente limitadas y por lo tanto mejorar la calidad de vida y supervivencia global de los pacientes afectados. Por lo tanto, se analizó la integración de las células madre adiposas en el tejido hepático enfermo y su capacidad para retomar las funciones específicas del hígado. De acuerdo con ello, se estableció en ratas un daño hepático crónico con ubicación predominantemente periportal, un patrón comparable al observado en la hepatitis viral, que es la causa más frecuente de insuficiencia hepática crónica [Jung et al. 2000, Scand J Gastroenterol 35, 969].

Para este fin se usó alcohol alílico que induce un daño predominantemente periportal con un pico que ocurre 48 horas después de la inyección. En este experimento pudo observarse una alta variación en el grado de necrosis de rata a rata, lóbulo a lóbulo y de corte a corte lo que es concordante con los resultados de otros estudios que utilizan el sistema de modelo de rata. Sin embargo, los inventores pudieron mostrar con sus experimentos que la inyección de células madre adiposas en el hígado dañado después de una hepatectomía de 2/3 conduce a una restauración significativamente mayor y más temprana de la función del hígado en comparación con el grupo control no tratado con células. Esto podría demostrarse por unos niveles mayores de albúmina y de proteína total. Es importante destacar que los inventores no observaron ningún efecto secundario negativo de la terapia celular, sobre todo la ausencia de formación de tumores.

Sorprendentemente, las células madre inyectadas se pudieron encontrar desde la semana 1 hasta más de 8 semanas después de la cirugía en cortes histológicos migrando desde el centro del lóbulo hasta la periferia. No se observaron reacciones de compensación de las células madre destruidas por los macrófagos, no observándose partículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO) en los macrófagos.

También, en este experimento, los niveles de hierro más bajos en los animales tratados con células 3 semanas después de la cirugía puede ser interpretado como una regeneración más rápida debido a las células madre inyectadas. Además, es poco probable que exista un gran recambio de las células madre marcadas con SPIO, ya que esto cabría esperar que condujese a un aumento de los niveles de hierro.

Por último, los inventores han observado que la forma de administración de las MSC en el hígado tiene un impacto en su distribución y función en el parénquima hepático. En este estudio, las células madre adiposas inyectadas directamente en el lóbulo hepático lateral restante migran desde una ubicación inicialmente central en el lóbulo hasta su periferia y se podían encontrar hasta 8 semanas después de la inyección. Esta observación es de hecho sorprendente, ya que en otros estudios las células madre fueron inyectados a través de la vena de la cola de los ratones (Banas et al. 2009, Hepatology 24, 70) o en el bazo (Aurich et al. 2009, Gut 58, 570), sin embargo, estos estudios no informan de resultados tan exitosos como los obtenidos por los presentes inventores. Aún más, se suspendió incluso un estudio clínico en el cual se administraron células del estroma derivadas de tejido adiposo por vía arterial intrahepática (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01062750>; Clinical Trials.gov Identificador: NCT01062750). Por lo tanto, es evidente que la forma de administración es importante para una implantación exitosa de las células madre, en particular, las células madre adiposas.

El documento WO200727689 divulga el trasplante de células madre adiposas a través de inyección intrahepática tras la encapsulación.

Debe tenerse en cuenta que, como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “un anticuerpo” incluye uno o más de tales anticuerpos diferentes y la referencia a “el método” incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos normales en la técnica que podrían ser modificados o sustituidos por los métodos descritos en la presente memoria.

A menos que se indique lo contrario, la expresión “al menos” que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a todos los elementos de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un número entero indicado o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de número entero o etapa. Cuando se utiliza en la presente memoria, la expresión “que comprende” puede ser sustituida por la expresión “que contiene” o a veces, cuando se utiliza en la presente memoria por la expresión “que tiene”.

Cuando se usa en la presente memoria “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa, o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se utiliza en la presente memoria, “que consiste esencialmente en” no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la reclamación. En cada caso en la presente memoria cualquiera de las expresiones “que comprende”, “que consiste esencialmente en” y “que consiste en” pueden ser sustituidos por cualquiera de las otras dos expresiones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término conjunción “y/o” entre varios elementos citados se entiende que incluye tanto las opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por “y/o”, una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad de los elementos primero y segundo juntos. Cualquiera de estas opciones se entiende que entran dentro del significado y, por tanto, satisfacen el requisito de la expresión “y/o”, como se usa en la presente memoria. La aplicabilidad simultánea de más de una de las opciones también se entiende que entra dentro del significado y, por tanto, satisface el requisito de la expresión “y/o” como se usa en la presente memoria.

En el texto de esta memoria descriptiva se citan varios documentos. Cada uno de los documentos citados en la presente memoria (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, las especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), *supra* o *infra*, se incorporan por referencia en su totalidad. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

Dados los hallazgos de los presentes inventores, la presente invención se refiere a que comprende células madre adiposas humanas para la regeneración del hígado (incluyendo tejido de hígado y/o regeneración de las células del hígado). En la presente memoria, cuando se administran células madre adiposas “para”, por ejemplo, la regeneración del hígado, se quiere decir que las células madre adiposas son “para su uso en un método para”, por ejemplo, la regeneración del hígado. De acuerdo con ello, la presente invención se refiere también a un método de regeneración del hígado en un sujeto en necesidad del mismo que comprende la administración de células madre adiposas a dicho sujeto, preferiblemente en una cantidad que es suficiente para regenerar el hígado.

Debido a las afecciones médicas que dañan el hígado, en particular las descritas en la presente memoria en el contexto de la enfermedad hepática crónica o aguda, surge la necesidad de regeneración del hígado. El daño del hígado puede ser causado por cualquiera de las afecciones médicas descritas en la presente memoria en el contexto de la enfermedad hepática aguda o crónica. La regeneración del hígado es, sin embargo, también es importante después de la cirugía del hígado (incluyendo resección del hígado, en particular resección parcial del hígado), por ejemplo, cuando se elimina un tumor del hígado. No solo por el éxito de la implantación de células madre en el hígado dañado, sino también por la resección de 2/3 del hígado, los presentes inventores demostraron que la composición de la presente invención es útil para la regeneración del hígado.

El término “hígado” cuando se usa en la presente memoria incluye todo el órgano del hígado o partes del mismo, el tejido hepático y/o células del hígado.

Cuando se usa en la presente memoria “regeneración del hígado” incluye generación *de novo* de células del hígado, el tejido del hígado y todo el órgano del hígado a partir de células madre adiposas. “Regeneración del hígado” también incluye la activación/estimulación de las células del hígado que son capaces de reparar la estructura del hígado y/o repoblar el parénquima hepático. La regeneración de hígado se puede determinar/observar por la función del hígado, en particular mediante la medición de los distintos parámetros hepáticos descritos en la presente memoria tales como los descritos en el Ejemplo 6.4 y/o mediante el análisis de la expresión de los ARN específicos de hepatocitos, tales como AFP (alfa fetoproteína), CK19 (citoqueratina), CK7, CX43 (conexina) (típico de hepatocitos precoces diferenciados) y/o CYP3A4 (citocromo), PCK1 (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), CPS (carbamil fosfato sintetasa), CK18, CX32, CD26, ALB, TFN (transferrina) (típico de hepatocitos diferenciados tardíos); véase la Figura 3 en Aurich et al. 2009, Gut 58, 570). Como alternativa, o además, la regeneración del hígado puede ser evaluada por la histología de una muestra de hígado que se pueden obtener, por ejemplo, por biopsia. También, como alternativa o además, la regeneración del hígado se puede evaluar por inmunofluorescencia de glucógeno o CK19.

En un aspecto preferido, la presente invención se refiere a una composición que comprende células madre adiposas humanas para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica. Dicha composición es por lo tanto para su uso en la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica. Además, dicha composición es para su uso en un método para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica que comprende la administración de dicha composición a un sujeto en necesidad del mismo.

El término “composición”, como se usa en la presente memoria significa una composición que comprende células madre adiposas humanas que se pueden utilizar para la prevención, mejora, o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la composición de la invención está destinada a aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para la ingeniería de tejidos y la terapia celular. Una persona experta apreciará que la composición detallada en la presente memoria puede implicar el uso de progenitores de las células madre adiposas humanas, células madre adiposas humanas en su forma no diferenciada o diferenciada, células madre adiposas humanas modificadas genéticamente, líneas celulares de las mismas, poblaciones celulares que comprenden tales, así como la progenie de las mismas, incluyendo la progenie diferenciada o no diferenciada o derivados modificados genéticamente de los mismos. Como se señaló anteriormente, estas células se pueden utilizar, por ejemplo, para terapias de reemplazo celular, en las que se injerta el hígado enfermo y se repuebla por las células madre adiposas para recuperar la función hepática del receptor. Las

- células se pueden administrar a un tejido de interés, preferiblemente tejido del hígado, en un sujeto para complementar las células que funcionan o reemplazar células, que han perdido la función. Preferiblemente, dicho sujeto es un ser humano. Como alternativa, también se contemplan las células madre adiposas humanas diferenciadas, en el que se aíslan las células madre adiposas humanas, diferenciadas en presencia de factores de diferenciación y/o crecimiento *in vitro* y se administran a un sujeto, como se detalla en la presente memoria. Los estados patológicos o las deficiencias tipificadas por la pérdida de masa y/o función hepática, y que podrían beneficiarse de las células madre adiposas humanas como se describe en la presente memoria incluyen enfermedades del hígado (hepáticas) agudas o crónicas.
- 5
- 10 La expresión “célula madre” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula progenitora capaz de auto-renovación, es decir, que puede proliferar sin diferenciación, por lo que la progenie de una célula madre o al menos parte de la misma retiene de manera sustancial el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, el potencial de diferenciación y la competencia de proliferación de la célula madre. La expresión abarca células madre capaces de auto-renovación sustancialmente ilimitada, es decir, en las que la capacidad de la progenie o parte de la misma de seguir proliferando sustancialmente no se reduce en comparación a la célula madre, así como las células madre que muestran auto-renovación limitada, es decir, en las que la capacidad de la progenie o parte de la misma de seguir proliferando se reduce manifiestamente en comparación con la célula madre.
- 15
- 20 Un experto en la materia sabe que las propiedades anteriores se refieren en general al comportamiento *in vivo* de las células progenitoras y madre, y puede ser en condiciones apropiadas por completo o al menos en parte replicadas *in vitro* y/o *ex vivo*.
- Basándose en la capacidad de dar lugar a diversos tipos de células, una célula progenitora o célula madre puede ser generalmente descrita como totipotente, pluripotente, multipotente o unipotente. Una única célula “totipotente” se define como capaz de crecer, es decir, de desarrollarse, y dar lugar a un organismo completo. Una célula madre “pluripotente” no es capaz de crecer para dar lugar a un organismo completo, sino que es capaz de dar lugar a tipos de células procedentes de las tres capas germinales, es decir, mesodermo, endodermo y ectodermo, y puede ser capaz de dar lugar a todos los tipos de células de un organismo. Una célula “multipotentes” es capaz de dar lugar a al menos un tipo de célula de cada uno de dos o más órganos o tejidos de un organismo, en el que dichos tipos de células pueden proceder de la misma o de diferentes capas germinales, pero no es capaz de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo. Una célula “unipotente” es capaz de diferenciarse en células de un solo linaje de células.
- 25
- 30
- 35 En consecuencia, la expresión “célula madre adiposa” tal como se utiliza en la presente memoria denota un tipo de célula multipotente derivada originalmente de tejido adiposo. El experto en la técnica apreciará que la composición detallada en la presente memoria puede implicar el uso del progenitor de las células madre adiposas humanas, las células madre adiposas humanas en su forma no diferenciada o en una forma diferenciada, las células madre adiposas humanas modificadas genéticamente, las líneas celulares de las mismas, las poblaciones de células que comprenden tales, así como la progenie de las mismas, incluyendo la progenie diferenciada o no diferenciada o derivados modificados genéticamente de las mismas. Por ejemplo, las células madre adiposas incluyen, sin limitarse a, las células del estroma vascular derivadas de tejido adiposo, que son células precursoras/progenitoras. Las células madre adiposas también incluyen preadipocitos o células intersticiales derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre de grasa, células progenitoras endoteliales, células madre hematopoyéticas o células madre mesenquimales.
- 40
- 45 La expresión “tejido adiposo”, como se usa en la presente memoria significa el tejido adiposo o grasa corporal o depósito de grasa, que es el tejido conectivo laxo compuesto por, entre otras cosas, adipocitos y células madre adiposas.
- 50 Sin estar ligado por la teoría, se supone que las células madre adiposas se convierten en preadipocitos, los cuales se convierten a continuación en adipocitos. En consecuencia, el tejido adiposo comprende células madre, preadipocitos y/o adipocitos. También puede comprender lipoblastos. En los seres humanos, el tejido adiposo se encuentra, por ejemplo, debajo de la piel, alrededor de los órganos internos, en la médula ósea y en el tejido mamario.
- 55 El tejido adiposo se encuentra en lugares específicos, que se denominan “depósitos adiposos”. El tejido adiposo contiene varios tipos de células, siendo el mayor porcentaje de células adipocitos que contienen gotitas de grasa. Otros tipos de células incluyen fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y células madre adiposas. Las células madre adiposas pueden prepararse y cultivarse de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, las células madre adiposas se pueden aislar mediante el troceado/trituración mecánica de, por ejemplo, lóbulos de grasa y/o tejido graso, seguido por la digestión enzimática, tal como con colagenasa. El tejido graso o los lóbulos de grasa puede, por ejemplo, aislarse y/o separarse de los tejidos adiposos mediante liposucción, precipitación, tratamiento con una enzima, tal como la colagenasa y eliminación del sobrenadante, tal de eritrocitos mediante centrifugación, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2005/042730. El aislamiento de los tejidos adiposos, el cultivo y la diferenciación de las células madre adiposas también se muestran en los siguientes ejemplos. Se prefiere además, que la célula madre adiposa como se define en la presente memoria sea una célula madre adiposa humana, es decir derivada de un ser humano. Las células madre adiposas en la composición o kit de la invención se
- 60
- 65

pueden usar solas o en combinación con otras células madre mesenquimales, tales como, por ejemplo, células precursoras endoteliales.

5 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “célula aislada” se refiere generalmente a una célula que no está asociada con una o más células o uno o más componentes celulares con los que está asociada la célula *in vivo*. Por ejemplo, una célula aislada puede haber sido eliminada de su entorno nativo, o puede resultar de la propagación, por ejemplo, de la propagación *ex vivo*, de una célula que ha sido eliminada de su entorno nativo. Preferiblemente, la célula madre adiposa tal como se usa en la presente memoria es una célula madre adiposa aislada. Por ejemplo, las células madre adiposas se pueden aislar a partir de tejido adiposo, por ejemplo, de tejido adiposo subcutáneo o peritoneal, u otros tejidos adecuados que comprenden células madre adiposas. Preferiblemente, las células madre adiposas se aíslan de un ser humano.

15 La expresión “*in vitro*” como se usa en la presente memoria indica, fuera, o externo al cuerpo de un animal o preferiblemente el cuerpo de un ser humano. La expresión “*in vitro*” como se usa en la presente memoria debería entenderse como que incluye “*ex vivo*”. La expresión “*ex vivo*” se refiere generalmente a tejidos o células que se extraen del cuerpo de un animal o de un ser humano y que se mantienen o propagan fuera del cuerpo, por ej., en un recipiente de cultivo.

20 La expresión “población celular” como se usa en la presente memoria generalmente se refiere a una agrupación de células. A menos que se indique lo contrario, la expresión se refiere a una agrupación de células que consiste en o que comprende células madre adiposas aisladas como se define en la presente memoria. Una población de células puede consistir en células que tienen un fenotipo común o puede comprender al menos una fracción de células que tienen un fenotipo común. Las células se dice que tienen un fenotipo común cuando son sustancialmente similares o idénticas en una o más características demostrables, incluyendo pero sin limitarse a la apariencia morfológica, la presencia, ausencia o nivel de expresión de determinados componentes o productos celulares, por ejemplo, ARN, proteínas, marcadores específicos de células u otras sustancias, actividad de ciertas vías bioquímicas, capacidad de proliferación y/o cinética, potencial de diferenciación y/o respuesta a las señales de diferenciación o comportamiento durante el cultivo *in vitro*, por ejemplo, la adherencia, la no adherencia, el crecimiento en monocapa, la cinética de proliferación o similares. Por tanto, tales características demostrables pueden definir una población de células o una fracción de la misma.

35 Cuando en la presente memoria se dice que una población es “heterogénea”, esto indica generalmente una población de células que comprende dos o más células o fracciones de células que no tienen un fenotipo común, por ejemplo, una población de células que comprende células de dos o más tipos diferentes de células. A modo de ejemplo y no de limitación, una población heterogénea de células puede ser aislada a partir de tejido adiposo o grasa corporal o depósito de grasa y puede comprender diversos tipos de células incluyendo pero sin limitarse a células madre adiposas, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales.

40 Cuando una población de células se dice en la presente memoria que es homogénea, esta consiste en células que tienen un fenotipo común. Una población de células de la que se dice en la presente memoria que es “sustancialmente homogénea” comprende una mayoría sustancial de células que tienen un fenotipo común. Una población de células “sustancialmente homogénea” puede comprender al menos 70 %, al menos 80 %, preferiblemente al menos 90 %, al menos 95 % o incluso al menos 99 % de células que tienen un fenotipo común, tal como el fenotipo que se refiere específicamente a, por ejemplo, el fenotipo de las células madre adiposas humanas como se ha definido en la presente memoria o progenitores de células madre adiposas humanas como se define en la presente memoria. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “sustancialmente homogéneo” engloba también una población homogénea.

50 La expresión “población de células que comprende células madre adiposas humanas o progenitoras de las mismas” se refiere a una población de células como se define en la presente memoria que comprende al menos un progenitor o células madre adiposas humanas y generalmente una fracción de células progenitoras o células madre adiposas humanas, como se define en la presente memoria. Por lo general, el progenitor o las células madre adiposas humanas de dicha fracción pueden tener un fenotipo común.

55 La expresión “célula progenitora” se refiere generalmente a una célula no especializada o relativamente menos especializada y competente para la proliferación, la cual o la progeénie de la cual puede dar lugar a al menos un tipo de células relativamente más especializadas. A modo de ejemplo y no de limitación, una célula progenitora puede dar lugar a descendientes que pueden diferenciarse a lo largo de uno o más linajes para producir células relativamente cada vez más especializadas, en el que dichos descendientes y o células cada vez relativamente más especializadas se convirtieron ellas mismas en células progenitoras, o incluso para producir células terminalmente diferenciadas, es decir, células completamente especializadas, que pueden ser post-mitóticas. La expresión también abarca células madre tal como se define en la presente memoria.

65 Se dice que una célula progenitora “da lugar” a otra célula relativamente más especializada cuando, por medio de ejemplo y no de limitación, la célula progenitora se diferencia para convertirse en la otra células sin sufrir primero división celular, o la otra célula se produce después de una o más rondas de división celular y/o diferenciación de la

célula progenitora o de la progenie de la misma.

El término “tratar” o “tratamiento” tal como se utiliza en la presente memoria denota la mejora o incluso la eliminación de uno o más síntomas asociados con una enfermedad hepática aguda o crónica tal como se define en la presente memoria, mediante la administración de una composición de la invención que comprende células madre adiposas humanas a un sujeto en necesidad del mismo, o usando el kit de la invención.

El término “mejora” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier mejora del estado patológico de un paciente que tiene una enfermedad hepática aguda o crónica especificada en la presente memoria, mediante la administración de una composición de la invención que comprende células madre adiposas humanas a un sujeto en necesidad del mismo, o utilizando el kit de la invención. Esta mejora también puede ser considerada como una ralentización o parada de la progresión de la enfermedad de un paciente que tiene una enfermedad aguda o crónica del hígado establecida en la presente memoria.

El término “prevención”, como se usa en la presente memoria significa la prevención de la aparición o reaparición de una enfermedad hepática tal como se especifica en la presente memoria, mediante la administración de una composición de la invención que comprende células madre adiposas humanas a un sujeto en necesidad del mismo o utilizando el kit de la invención.

Mediante el uso de la composición o kit de la invención que comprende las células madre adiposas descritas en la presente memoria, se puede lograr ventajosamente la regeneración del hígado, la curación acelerada después de la resección parcial del hígado, la recuperación acelerada o aumentada de la función hepática en la insuficiencia hepática, o un menor riesgo de aparición de disfunciones hepáticas o insuficiencia hepática o un efecto reducido de enfermedades metabólicas. Al mismo tiempo, los efectos adversos se reducen al mínimo, en comparación con las terapias convencionales, tales como el trasplante de hígado.

La expresión “enfermedad hepática”, como se usa en la presente memoria se refiere a un trastorno hepático. En general, una enfermedad hepática puede ser causada por cualquier afección que tenga como resultado la alteración de la integridad morfológica y/o funcional del hígado de un cuerpo. La etiología y el tratamiento de las enfermedades del hígado se describen, por ejemplo, en Oxford Textbook of Medicine (Warrell, Oxford Textbook of Medicine) David A. Warrell, Timothy M. Cox, John D. Firth, Oxford University Press, EE.UU.; 5 edición (22 de julio de 2010) Johns Hopkins Internal Medicine Board Review 2010-2011: Certification and Recertification: Expert Consult – Internet e Impreso (Redonda Miller, Bimal Ashar MD, Stephen Sisson, Johns Hopkins Hospital Mosby; 3ª edición (2 de marzo de 2010).

La expresión “enfermedad hepática aguda” como se usa en la presente memoria significa la aparición de complicaciones graves rápidamente después de los primeros síntomas de la enfermedad hepática, como ictericia, e indica que el hígado ha sufrido daños. Las complicaciones son, por ejemplo, la encefalopatía hepática y la alteración de la síntesis de proteínas, tal como se mide, por ejemplo, por los niveles de la albúmina sérica y el tiempo de protrombina en la sangre. La clasificación de 1993 define hiperaguda dentro del plazo de 1 semana, aguda como 8-28 días y subaguda como 4-12 semanas (Williams et al. 1993, Lancet 342, 273). Refleja el hecho de que el ritmo de evolución de la enfermedad influye fuertemente en el pronóstico. La etiología subyacente es otro factor determinante significativo del resultado (Grady 2005, Postgrad Med J 81, 148). La “insuficiencia hepática aguda” se produce cuando el hígado pierde rápidamente su capacidad para funcionar. La insuficiencia hepática aguda es una enfermedad multisistémica compleja que evoluciona rápidamente después de una lesión devastadora para el hígado que conduce al desarrollo de encefalopatía. Aunque, más comúnmente, la insuficiencia hepática se desarrolla lentamente durante el transcurso de los años, en la insuficiencia hepática aguda, la insuficiencia hepática se desarrolla en cuestión de días. La etiología subyacente y el ritmo de progresión influyen fuertemente en la evolución clínica. Las causas más comunes son, por ejemplo, el paracetamol, las reacciones farmacológicas idiosincrásicas, la hepatitis B y la hepatitis seronegativa, amatoxinas o falotoxinas, ambas de las especies Amanita.

La expresión “enfermedad hepática crónica” como se usa en la presente memoria denota un proceso patológico del hígado que consiste en la destrucción progresiva y la regeneración del parénquima hepático que conduce a fibrosis y cirrosis. Las causas de las enfermedades hepáticas crónicas pueden ser cualquier afección que tiene como resultado la degradación gradual y renovación de las células de los tejidos con el hígado de un cuerpo. Este proceso da lugar generalmente a fibrosis o cirrosis y puede ser potencialmente mortal en los casos de insuficiencia hepática crónica. La clasificación de las fuentes de las enfermedades hepáticas crónicas se dividen en cinco grupos: (i) causas virales como la hepatitis B y C o el citomegalovirus o el virus de Epstein Barr, (ii) causas metabólicas tales como hemocromatosis, enfermedad de hígado graso no alcohólica o enfermedad de Wilson, (iii) causas relacionadas con una respuesta autoinmunitaria tales como hepatitis crónica autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria, (iv) causas relacionadas con toxinas tales como enfermedad hepática alcohólica o nitrofurantoina, amiodarona, o metotrexato y (v) otras causas diversas, tales como insuficiencia cardíaca derecha. Sin embargo, la principal causa de enfermedad hepática crónica es el uso excesivo de alcohol, lo que lleva a la cirrosis y la hepatitis. Por lo tanto, el grupo de mayor riesgo son las personas que son propensas al abuso de alcohol. Los síntomas asociados con la enfermedad hepática crónica dependen del nivel de degeneración en el hígado.

Las etapas iniciales son generalmente asintomáticas y solo pueden ser detectadas por pruebas médicas específicas como se define en la presente memoria. Las enfermedades hepáticas que hayan evolucionado a hepatitis pueden ser reconocidas por confusión mental, ictericia severa, problemas de coagulación de la sangre o hemorragia intestinal. Aquellos casos que han llegado al nivel de la cirrosis pueden ser detectados por lo siguiente: problemas

5 neurológicos, crecimiento de la mama en el hombre, contracciones de Dupuytren, pérdida de cabello, insuficiencia renal, enrojecimiento de las palmas, falta de apetito, encogimiento testicular, debilidad, pérdida de peso, picazón, cálculos biliares y ascitis. La cirrosis se considera como una posible etapa final de muchas enfermedades hepáticas y se produce cuando el tejido hepático sano se daña y se sustituye por tejido cicatricial. El proceso de sustitución no sucede a la vez, sino que tiene lugar durante un período gradual de tiempo. El nuevo tejido cicatrizado impide la

10 regeneración o curación de las células del hígado. A medida que el tejido cicatricial se extiende, el hígado pierde la capacidad de funcionar. Alrededor del 10 % de todos los bebedores extremos eventualmente llegan a la etapa de cirrosis. Se cree que la cirrosis se alcanza generalmente después de diez años de consumo excesivo de alcohol o más. Desafortunadamente, una vez que un paciente ha sufrido daños en el hígado, este daño no es reversible. Sin embargo, la composición y kit de la invención comprende células madre adiposas humanas que se pueden utilizar

15 ventajosamente para la mejora o tratamiento de las enfermedades hepáticas agudas o crónicas.

El término "sujeto" como se usa en la presente memoria incluye un mamífero tal como una rata, cerdo, ganado vacuno, caballo, oveja, particularmente un ser humano.

20 Usando un modelo de un daño hepático tóxico crónico en ratas, los inventores han investigado la capacidad del tejido hepático enfermo para integrar células madre adiposas trasplantadas. Mediante la administración intraperitoneal repetitiva de retrorsina y alcohol alílico, se inhibió la proliferación de hepatocitos endógenos y se generó necrosis hepática. Histológicamente, el daño hepático debido a alcohol alílico es periportal y se asemeja a la

25 insuficiencia hepática viral que es la causa más frecuente de esta insuficiencia orgánica en humanos. Para simular una reducción en el tejido hepático funcional y estimular la regeneración, se realizó una hepatectomía de dos tercios. Las células madre adiposas humanas se inyectaron directamente en el lóbulo de hígado restante. Como se mencionó en otra parte en la presente memoria, la administración directa de células madre adiposas resultó ser decisiva para una implantación exitosa y la regeneración del hígado. De hecho, la técnica anterior tal como Banas et al., Loc. cit., enseña la administración de células madre adiposas a través de la vena de la cola de los ratones. Se

30 administró ciclosporina para lograr la inmunotolerancia hacia las células madre alogénicas. Cada semana después de la cirugía, se extrajeron muestras de sangre para determinar varios valores sanguíneos hepáticos. Dos, cuatro, seis, ocho y doce semanas después de la cirugía, los animales se sacrificaron y se analizaron cortes histológicos. Los inventores encontraron que las células madre adiposas humanas habían provocado un aumento importante de los niveles de albúmina y de proteína total después de la operación. Las células trasplantadas se podían encontrar

35 hasta ocho semanas después de la cirugía en cortes histológicos migrando desde el centro del lóbulo hasta la periferia. No había eliminación de las células madre adiposas humanas por los macrófagos. Una vez más, este éxito se contraponen a la técnica anterior, tal como Banas et al., loc. cit., que no pudo observar células madre en el hígado. Por el contrario, estos autores observaron que las células madre están, por ejemplo, en el conducto biliar, lo que es una indicación de que las células madre o bien no alcanzan el hígado o fueron eliminadas del hígado. Los datos de

40 la invención demuestran que el uso terapéutico de células madre adiposas humanas ofrece una alternativa interesante al trasplante de hepatocitos o del órgano del hígado en pacientes con insuficiencia hepática severa, particularmente a la luz del hecho de que la cirrosis hepática es la causa más importante de insuficiencia hepática crónica en los seres humanos y en vista de la persistencia de la falta de donantes de órganos y los riesgos concomitantes en alotrasplantes.

45 En suma, en contraste con la técnica anterior, tal como Banas, loc. cit., los presentes inventores observaron la supervivencia a largo plazo de las células madre así como la proliferación y por lo tanto la regeneración del hígado. Por lo tanto, sin pretender imponer ninguna teoría, la vía de administración de las células madre adiposas parece jugar un papel importante. Esto también puede ser derivado de un estudio clínico que se interrumpió. En particular, un ensayo clínico (identificador NCT01062750 "Terapia de regeneración hepática por administración arterial

50 intrahepática de tejido adiposo autólogo derivado de células del estroma". En este ensayo se administraron células madre adiposas a los pacientes a través de cateterismo arterial intrahepático. Sin embargo, aparentemente no se tuvo éxito en pacientes con cirrosis hepática. Por lo tanto, de nuevo la vía de administración aplicada en este estudio es diferente de la ruta escogida por los presentes inventores y los presentes inventores tuvieron éxito.

55 Otras ventajas de los medios de la presente invención se pueden resumir brevemente como sigue: el tejido adiposo humano como una fuente potencial de células madre adiposas está disponible casi de forma ubicua. Las células madre adiposas son fáciles de aislar tal y como se describe en la presente memoria. Por otra parte, la recolección de tejido adiposo por, por ejemplo, liposucción generalmente no causa graves daños en el sujeto. Las células madre

60 adiposas no sobreviven mucho más tiempo en el cultivo y tienen una actividad de proliferación mayor en comparación con las células madre derivadas de médula ósea (BMSC). Además, las BMSC han demostrado ser un componente crucial en el desarrollo de la fibrosis hepática durante la lesión hepática, presumiblemente debido a la mediación de la interleucina-10 (Lan et al. 2008, Transpl Int 21, 58192). Por el contrario, los inventores no vieron evidencia de un aumento de la fibrosis hepática en ratas tratadas con células madre adiposas. Las células madre

65 adiposas pueden ser cultivadas o crioconservadas. Además, las células madre adiposas se pueden utilizar en forma diferenciada o no diferenciada o (pre)diferenciada o se pueden utilizar en forma modificada genéticamente, aunque

se prefiere la forma no diferenciada. Ventajosamente, las células madre adiposas tal como se describe en la presente memoria pueden ser utilizados para (i) la regeneración del hígado enfermo, (ii) la curación acelerada después de la resección parcial del hígado, (iii) la recuperación acelerada o aumento de la función del hígado en la insuficiencia hepática, (iv) la mediación de un riesgo reducido de la ocurrencia de insuficiencia hepática y/o (v) conferir un efecto reducido de los trastornos metabólicos. Al mismo tiempo, los efectos secundarios negativos se reducen al mínimo mediante el tratamiento de las enfermedades hepáticas con células madre adiposas en comparación con las terapias convencionales, tales como el trasplante de hígado. Por ejemplo, las células madre adiposas autólogas tal como se definen en la presente memoria se pueden usar para tratar la enfermedad hepática de un paciente, evitando de este modo una respuesta inmunitaria contra las células madre terapéuticas. En vista de lo anterior, las células madre adiposas representan una manera más fácil, más eficiente y más segura que el trasplante del órgano entero para curar a los pacientes que sufren enfermedad hepática. Sin limitarse a la teoría, los beneficios funcionales de las células madre adiposas pueden ser debido al apoyo funcional de las células trasplantadas o inyectadas. Tampoco se excluye la fusión con los hepatocitos del receptor. Del mismo modo, es posible el soporte y la activación de células progenitoras endógenas.

Un problema en relación con el uso terapéutico de las células madre adiposas humanas o progenitoras de las mismas es la cantidad de células necesarias para lograr un efecto óptimo. La dosificación para la administración puede ser variable, puede incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores, y puede ser comprobada por el técnico experto haciendo uso de la presente divulgación. Generalmente, la dosis o pauta administrada proporcionará una cantidad terapéuticamente eficaz de las células, es decir, se logrará el efecto y el rendimiento local o sistémico deseado. En estudios en humanos de células de médula ósea mononucleares autólogas, se han usado dosis empíricas que varían de 1 a 4×10^7 células con resultados alentadores. Sin embargo, diferentes escenarios pueden requerir la optimización de la cantidad de células madre adiposas humanas o sus progenitoras administradas, por lo tanto la cantidad de células a administrar variará para el sujeto que está siendo tratado. En una realización preferida, se pueden administrar a un sujeto humano entre 10^2 a 10^9 o entre 10^3 a 10^9 o entre 10^4 a 10^9 , tal como entre 10^4 y 10^8 o entre 10^5 y 10^7 , por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 5×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 2×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 1×10^7 o aproximadamente 2×10^7 , aproximadamente 3×10^7 , aproximadamente 4×10^7 , aproximadamente 5×10^7 , aproximadamente 6×10^7 , aproximadamente 7×10^7 , aproximadamente 8×10^7 , aproximadamente 9×10^7 o aproximadamente 1×10^8 células. Incluso más preferido, el número de células madre adiposas que se administra al paciente es suficiente para repoblar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o 25 % o más, tal como 30, 35, 40, 45, 50 % o incluso más, tal como más del 50 % de la masa hepática del paciente. Sin embargo, la determinación precisa de una dosis terapéuticamente eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, el alcance del daño tisular y la cantidad de tiempo desde que se produjo el daño y se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica a partir de esta divulgación y del conocimiento en la técnica.

Preferiblemente, la pureza de las células madre adiposas humanas o progenitoras de las mismas o de una población celular que comprende dichas células para la administración puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 55 %, aproximadamente 55 a aproximadamente 60 %, y aproximadamente 65 a aproximadamente 70 %. Más preferiblemente, la pureza puede ser de aproximadamente 70 a aproximadamente 75 %, aproximadamente 75 a aproximadamente 80 %, aproximadamente 80 % a aproximadamente 85 % y lo más preferiblemente, la pureza puede ser de aproximadamente 85 a aproximadamente 90 %, aproximadamente 90 % a aproximadamente 95 % y aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 %. La pureza de las células madre adiposas se puede determinar, por ejemplo, según el perfil de marcador de superficie celular expuesto en la presente memoria dentro de una población celular. Para la determinación de la pureza de las células madre adiposas, por ejemplo, se puede llevar a cabo el análisis FACS. Las dosis se pueden ajustar fácilmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una menor pureza puede requerir un aumento en la dosis.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de células y los aditivos, vehículos y/o portador opcionales en las composiciones de la invención. Generalmente, cualquier aditivo (además de la célula o células progenitoras activas o célula o células madre adiposas y/o citocina o citocinas, pueden estar presentes en una cantidad de 0,001 a 50 % (p/p o p/v) en solución salina tamponada con fosfato y el principio activo pueden estar generalmente presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 5 % (p/p o p/v), preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 %, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,05 % o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 %, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 % y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 %.

Cuando se administra una composición terapéutica de la presente invención, por lo general, se puede formular en una forma de dosificación unitaria inyectable o trasplantable (por ejemplo, solución, suspensión, dispersión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones acuosas estériles y dispersiones. Como se usa en la presente memoria, las soluciones o dispersiones incluyen un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células madre adiposas permanecen viables tal como suero o medio de cultivo, por ejemplo, como se describe en la presente memoria. El vehículo puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable o dispersión que contiene el medio, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas

adecuadas de los mismos.

Además, pueden añadirse varios aditivos que potencian la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, penicilina, estreptomycin, y similares.

En muchos casos, será aconsejable incluir agentes isotónicos para asegurar la viabilidad de las células, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La isotonicidad deseada de la composición de esta invención puede lograrse usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio es particularmente preferido para tampones que contienen iones de sodio.

Para aumentar potencialmente la supervivencia celular al introducir el progenitor o las células madre o la progeñe diferenciada de interés en sujeto en necesidad de las mismas, puede incorporarse o integrar dichas células en un biomaterial, que comprende preferiblemente una matriz, que comprende, por ejemplo, un biopolímero o polímero sintético. Ejemplos de biopolímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno, proteoglicanos, quitosano, alginato y ácido hialurónico. Un ejemplo de un polímero sintético es el polietilenglicol. Este podría ser con o sin citocinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación o construcciones de expresión de ácidos nucleicos, etc. Tales polímeros podrían estar, por ejemplo, en suspensión o podrían formar un gel tridimensional con las células embebidas en su interior. Tales polímeros pueden ser preferiblemente biodegradables. Las combinaciones de diferentes polímeros también se incluyen en algunas realizaciones preferidas de la divulgación.

La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Según la presente invención, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente, o aditivo utilizado tendría que ser compatible con el progenitor o las células madre adiposas.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación de las células madre adiposas utilizadas en la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros componentes, según se desee.

Tales composiciones pueden además mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa, o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos gelificantes o promotores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada.

Los textos estándar, tales como "Remington's pharmaceutical science", 17ª edición, 1985, que se incorporan aquí por referencia, pueden consultarse para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación indebida.

La viscosidad de la composición de la invención, si se desea, puede mantenerse al nivel seleccionado utilizando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. La metilcelulosa se prefiere debido a que es fácil y económicamente disponible y es fácil de trabajar. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. La concentración preferida del espesante dependerá del agente seleccionado. La cuestión es usar una cantidad que logre la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas se preparan normalmente a partir de soluciones mediante la adición de tales agentes espesantes.

La presente invención también se refiere a medios para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica, que comprenden la administración de células madre adiposas humanas en su forma no diferenciada o en una forma diferenciada, o un progenitor de células madre adiposas humanas, líneas celulares del mismo o poblaciones de células que comprenden tales, células madre adiposas humanas no diferenciadas o diferenciadas, opcionalmente modificadas genéticamente, a un sujeto, especialmente humano, en necesidad de tal tratamiento. Tal administración es generalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en general una cantidad que proporciona un efecto y rendimiento local o sistémico deseado. En otra realización preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre adiposas humanas en su forma no diferenciada o en una forma diferenciada, o un progenitor de células madre adiposas humanas, líneas celulares del mismo o poblaciones de células que comprenden tales, células madre adiposas humanas no diferenciadas o diferenciadas, opcionalmente modificadas genéticamente. Preferiblemente, la composición farmacéutica es para el tratamiento, la mejora o la prevención de la enfermedad hepática aguda o crónica tal como se define en la presente memoria. A modo de ejemplo y no de limitación, tales células se pueden administrar ventajosamente por medio de inyección, que abarca también la administración a través de catéter, o el implante, por ejemplo, inyección localizada, inyección sistémica, inyección intraesplénica, inyección en una vena portal, inyección en el conducto hepático, por ejemplo, debajo de la cápsula hepática, administración parenteral, inyección intrauterina en un embrión o un feto,

infusión o inyección intrahepática, infusión o inyección intraperitoneal, trasplante de biomaterial que comprende dichas células, o por punción del hígado o el parénquima hepático. La célula madre adiposa tal como se define en la presente memoria se administra mediante una administración seleccionada de infusión o inyección intrahepática. La administración puede, en otra realización preferida, ser apoyada por técnicas de imagen como la ecografía, la tomografía por resonancia magnética o la tomografía computarizada. Las células se pueden proporcionar como una suspensión de células en cualquier medio de conservación, que contiene preferiblemente albúmina humana, después del procedimiento de aislamiento o después de la descongelación después de la criopreservación.

En una realización preferida de la composición de la invención, dicha enfermedad hepática aguda o crónica se selecciona de entre la pérdida de la función hepática, isquemia, fibrosis y/o cirrosis.

En otra realización preferida de la composición de la invención, la enfermedad hepática aguda o crónica se selecciona del grupo que consiste en: isquemia hepática, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, obstrucción del conducto biliar, insuficiencia hepática crónica, hepatitis crónica, cirrosis, enfermedad hepática colestásica, enfermedad quística del hígado, agrandamiento del hígado, hígado graso, galactosemia, cálculos biliares, síndrome de Gilbert, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, adenoma de hígado, cáncer de hígado, hemangioma de hígado, nódulo hepático (hiperplasia nodular focal), hepatitis neonatal, enfermedad hepática no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, infección parasitaria, porfiria, trombosis de la vena porta, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, esteatohepatitis, hepatitis tóxica, tirosinemia, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I, hepatitis viral, enfermedad de Wilson, daño hepático inducido por medicamentos, daño hepático inducido por una toxina, o cualquier combinación de los mismos. Además, la composición y kit de la invención son especialmente adecuados para la mejora o tratamiento de trastornos hepáticos adquiridos debido a infecciones virales o insuficiencia hepática debido a la pérdida de células o tejido del hígado, tales como los causados, por ejemplo, por lesión o cirugía.

Por lo tanto, en otra realización preferida, las células madre adiposas humanas, los progenitores de células madre adiposas humanas, las líneas celulares de los mismos o poblaciones de células que comprenden tales, células madre adiposas humanas no diferenciadas o diferenciadas, opcionalmente modificadas genéticamente como se detalla en la presente memoria, son para su uso en terapia y/o uso de las mismas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades hepáticas agudas o crónicas. Tales enfermedades pueden incluir trastornos que afectan al tejido hepático. Las enfermedades que afectan la viabilidad y/o la función hepatocítica se contemplan específicamente, y pueden representar, por ejemplo, defectos congénitos, enfermedades hepáticas adquiridas, daños hepáticos inducidos por terapia, el efecto de una afección patológica, el efecto de un traumatismo, efectos tóxicos o infecciones virales. Se contemplan específicamente las enfermedades hepáticas que figuran en la presente memoria descriptiva. La administración de las células madre adiposas humanas de acuerdo con la invención puede conducir a la reconstitución y/o regeneración del tejido hepático en el sujeto y/o al alivio de los síntomas de una enfermedad hepática tal como se describe en la presente memoria. Más específicamente, mediante el uso de la composición o kit de la invención que comprende las células madre adiposas descritas en la presente memoria, se puede lograr la regeneración del hígado, la curación acelerada después de la resección parcial del hígado, la recuperación acelerada o aumentada de la función hepática en la insuficiencia hepática, o un menor riesgo de aparición de disfunciones hepáticas o insuficiencia hepática o un efecto reducido de enfermedades metabólicas. Las células se administran de una manera que permita su injerto y migración al sitio de tejido deseado y reconstituir o regenerar la zona funcionalmente deficiente en el hígado.

En una realización preferida de la composición de la invención, la célula madre adiposa se aísla a partir de tejido adiposo humano o de cualquier otra fuente adecuada que comprende células madre adiposas.

El aislamiento de células madre adiposas es bien conocido en la técnica y se especifica más detalladamente en la presente memoria. Por ejemplo, las células madre adiposas se pueden aislar a partir de tejido adiposo subcutáneo o peritoneal, u otro tejido humano adecuado.

En una realización preferida adicional de la composición de la invención, la célula madre adiposa es una célula madre adiposa autóloga, heteróloga o xenóloga.

El término "autóloga" en referencia a una célula madre adiposa como se usa en la presente memoria significa que la célula madre adiposa se deriva de la misma persona. En esta realización preferida, la presente invención contempla ventajosamente la utilización del propio tejido de un paciente, tal como el tejido adiposo u otro tejido adecuado para aislar las células madre adiposas humanas o los progenitores de las células madre adiposas humanas. Tales células serían autólogas para el paciente y podrían ser administradas fácilmente al paciente, sin provocar una respuesta inmunitaria y/o sin correr el riesgo de transmisión de un agente causal de una enfermedad como el VIH o el VHC. Por otra parte, si el paciente es portador de un defecto genético subyacente a una patología particular, tal defecto podría ser evitado mediante la manipulación genética de las células madre adiposas obtenidas. En otra realización preferida, las células madre adiposas humanas o los progenitores de las células madre adiposas humanas se pueden aislar a partir de tejido que no es del propio paciente. En este caso, las células madre adiposas son células madre adiposas heterólogas.

El término “heteróloga”, como se usa en la presente memoria indica que la célula madre adiposa se deriva de otro individuo. Cuando se contempla la administración de tales células a un paciente, puede ser preferible que el tejido sometido a un método para obtener la célula madre adiposa o su progenitor se seleccione de tal manera que se maximice, al menos dentro de los límites posibles, la compatibilidad del tejido entre el paciente y las células administradas, reduciendo así la posibilidad de rechazo de las células administradas por el sistema inmunitario del paciente. Si las células se derivan de una fuente heteróloga, es decir, no autóloga, se puede administrar inmunosupresión concomitante, por ejemplo, usando agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina o FK506.

El término “xenóloga” como se usa en la presente memoria indica que la célula madre adiposa se deriva de una especie distinta del individuo al que está destinado la célula madre adiposa a administrar. Por ejemplo, una célula madre adiposa puede aislarse de cerdos y administrarse a un ser humano.

En una realización preferida adicional de la composición de la invención, la célula madre adiposa es una célula madre mesenquimal.

La expresión “célula madre mesenquimal” como se usa en la presente memoria indica células madre multipotentes capaces de diferenciarse en células mesenquimales, tales como adipocitos, osteoblastos y condrocitos, aunque también miocitos, neuronas, células endoteliales, astrocitos y células epiteliales. Aunque se describió por primera vez en la médula ósea de adultos normales, las células madre mesenquimales pueden también obtenerse de otras fuentes, tales como sangre del cordón umbilical, de la dermis o pulpa dental, médula ósea y tejido adiposo. La definición de las células madre mesenquimales en la presente memoria requiere criterios mínimos, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, adherencia plástica, potencial de diferenciación múltiple, expresión de marcadores de la superficie celular tales como CD105 y la falta de expresión de CD14, CD34 y CD45 (Pittenger et al. 1999, Science 284, 143).

En una realización preferida de la composición de la invención, la célula madre mesenquimal es positiva para los marcadores de superficie celular CD13, CD29, CD49a, CD63, CD73, CD90, CD105 y/o CD166 y/o negativa para los marcadores de superficie celular CD31, CD34, CD44, CD45 y/o CD106.

Como se expone en más detalle en otra parte en la presente memoria, las células madre mesenquimales son células madre multipotentes que pueden diferenciarse en una variedad de tipos de células. Las células madre mesenquimales se pueden aislar fácilmente y/o no muestran una fuerte tendencia a la degeneración. En esta realización, la célula madre mesenquimal se caracteriza además por un perfil de marcador de la superficie celular específico. El término “positivo para” como se usa en la presente memoria con respecto a marcadores de la superficie celular significa que, en una población de células, más de 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o todas las células expresan dicho marcador. El término “negativo para” como se usa en la presente memoria con respecto a marcadores de la superficie celular significa que, en una población de células, menos de 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o ninguna de las células expresan dicho marcador. La expresión de los marcadores de la superficie celular se puede determinar, por ejemplo, por citometría de flujo, inmunohistoquímica, ELISA, RT-PCR, transferencia de Northern o Western, para un marcador o marcadores de la superficie celular específicos utilizando los métodos convencionales descritos en la técnica.

En otra realización preferida de la composición de la invención, la célula madre adiposa es una célula madre mesenquimal no diferenciada, una célula madre mesenquimal diferenciada o una célula madre mesenquimal modificada genéticamente.

De acuerdo con esta realización, la célula madre adiposa puede ser una célula madre mesenquimal (CMM) indiferenciada, es decir, no diferenciada, una célula madre mesenquimal (pre)diferenciada o una célula madre mesenquimal modificada genéticamente. La célula mesenquimal se puede administrar en la composición o kit de la invención en un estado no diferenciado, por ejemplo, directamente después de su aislamiento a partir de tejido adiposo. Se ha observado que la CMM indiferenciada es menos receptiva al estrés oxidativo que los hepatocitos derivados de la CMM y, por lo tanto, tiene más probabilidades de sobrevivir a la fase hipóxica inicial después del trasplante (Kuo et al. 2008, 134 Gastroenterology, 2111). Además, el uso de células madre adiposas indiferenciadas es menos costoso, supone menos etapas de manipulación y componentes de cultivo, con lo cual existe menos riesgo de contaminaciones e implica menos pérdida de tiempo en el cultivo celular con la consiguiente posibilidad de iniciar rápidamente la terapia de urgencia.

En otra realización, la célula madre mesenquimal aislada se puede diferenciar o pre-diferenciar *in vitro*, antes de ser administrada al paciente que tiene una enfermedad hepática. Mediante el uso de las células madre adiposas (pre)diferenciadas, la integración de dichas células madre en el hígado enfermo y/o el reemplazo de las células hepáticas no funcionales puede ser más eficiente. Por ejemplo, las células madre adiposas pueden someterse a diferenciación adipogénica, osteogénica o hepatogénica eligiendo las condiciones de cultivo celular apropiadas, como se ejemplifica en los siguientes ejemplos; véase también Aurich et al., loc. cit

Además, las células madre adiposas no diferenciadas o (pre) diferenciadas pueden modificarse genéticamente, si es necesario, con el fin de compensar, por ejemplo, un defecto genético en las células hepáticas de un paciente; véase,

por ejemplo, el documento EP 2281875. Se describen métodos de transferencia génica para pacientes humanos, por ejemplo, en Alaei et al. (2011) Genetic vaccines and therapy; 9:4; Sellner et al. (2011) Leukemia & lymphoma; 52(3): 483-90; Grez (2011) Mol Ther; 19(1):28-35.

- 5 Los términos “diferenciación”, “diferenciar” o sus derivados, como se utiliza en la presente memoria indican el proceso por el cual una célula no especializada o relativamente menos especializada se convierte en relativamente más especializada. En el contexto de la ontogenia de la célula, el adjetivo “diferenciada” es un término relativo. Por lo tanto, una “célula diferenciada” es una célula que ha progresado más en una cierta vía de desarrollo que la célula con la que se está comparando. Una célula diferenciada puede ser, por ejemplo, una célula terminalmente diferenciada, es decir, una célula totalmente especializada que lleva a cabo funciones especializadas en diversos tejidos y órganos de un organismo, y que puede ser, o no post-mitótica. En otro ejemplo, una célula diferenciada puede ser también una célula progenitora dentro de un linaje de diferenciación, que puede proliferar y/o diferenciarse más.
- 10
- 15 De manera similar, una célula es “relativamente más especializada” si ha progresado más en una cierta vía de desarrollo que la célula con la que se está comparando, considerándose por consiguiente esta última “no especializado” o “relativamente menos especializada”. Una célula relativamente más especializada puede diferir de la célula no especializada o relativamente menos especializada en una o más características fenotípicas demostrables, tales como, por ejemplo, la presencia, ausencia o nivel de expresión de componentes o productos celulares particulares, por ejemplo, ARN, proteínas, marcadores celulares específicos u otras sustancias, actividad de ciertas vías bioquímicas, aspecto morfológico, capacidad y/o cinética de proliferación, potencial de diferenciación y/o respuesta a las señales de diferenciación, etc., en las que tales características significan una mayor progresión de la célula relativamente más especializada en la vía de desarrollo.
- 20
- 25 Ejemplos no limitantes de diferenciación pueden incluir, por ejemplo, el cambio de una célula madre pluripotente en un tipo dado de progenitor o célula madre multipotente, el cambio de un progenitor o célula madre multipotente en un tipo dado de progenitor o célula madre unipotente o el cambio de un progenitor o célula madre unipotente en tipos de células más especializadas o a en células terminalmente especializadas dentro de un linaje de células dado. La diferenciación de una célula no especializada o menos especializada en una célula más especializada puede producirse por la aparición de células con un grado intermedio de especialización. Por ejemplo, las células madre mesenquimales aisladas pueden diferenciarse *in vitro* a adipocitos, hepatocitos u osteoblastos mediante el uso de factores de crecimiento y diferenciación y componentes de cultivo celular adecuados (“Adipose-Derived Stem Cells - Methods and Protocols” Jeffrey M. Gimble and Bruce A Bunnell (Editors), Methods in Molecular Biology 702, Springer Protocols 2011; Lee et al. (2004) Hepatology 40(6): 1275-84). Por ejemplo, la diferenciación adipogénica de las células madre adiposas puede ser inducida por el uso alternado de medio basal tal como FCS/DMEM 5 % suplementado con mezcla IDI, es decir, 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM , dexametasona 1 μM , indometacina 1 μM , durante 2 días, seguido de medio basal más 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina durante 1 día, como se describe en los siguientes ejemplos. El ciclo de inducción se repite 3 veces. La diferenciación adipogénica se puede analizar utilizando cuantificación con aceite rojo. La inducción osteogénica se puede iniciar cambiando el medio por DMEM que contiene FCS 5 %, suplementado con L-ascorbato-2-fosfato 50 μM , dexametasona 0,1 μM y β -glicerofosfato disódico 10 μM . La deposición de calcio puede ser demostrada histoquímicamente mediante tinción con rojo de alizarina tal como se describe en los ejemplos adjuntos.
- 30
- 35
- 40

45 La inducción de la diferenciación en hepatocitos o células similares a hepatocitos puede llevarse a cabo mediante el cultivo de células madre adiposas durante aproximadamente dos semanas en placas revestidas de colágeno de tipo I y tratamiento con activina A 20 ng/ml y factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4) 20 ng/ml (FGF4) durante tres días, seguido de tratamiento con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 150 ng/ml, FGF1 100 ng/ml, oncostatina M 30 ng/ml, dexametasona 2×10^{-5} mol/l, $1 \times$ insulina-transferrina-selenio (ITS), dimetilsulfóxido (DMSO) 1 % y nicotinamida 0,05 mmol/l durante diez días, y el mantenimiento en medio de cultivo de hepatocitos solo u opcionalmente, con dexametasona 10^{-8} mol/l y nicotinamida 0,05 mmol/l, como se detalla, por ejemplo, en Aurich et al. 2009, Gut 58, 570; Banas et al. 2008, J Gastroenterology and Hepatology 24, 70.

50

En consecuencia, en una realización preferida adicional de la composición de la invención, la célula madre mesenquimal diferenciada es una célula madre mesenquimal diferenciada adipogénicamente, osteogénicamente o hepatogénicamente.

55

La diferenciación de las células madre adiposas en células diferenciadas adipogénicamente u osteogénicamente puede ser inducida por condiciones de cultivo celular definidas, como se indica anteriormente y se demuestra en los siguientes ejemplos. Además abarcada por la composición de la invención es la diferenciación de células madre adiposas en una célula hepatogénicamente diferenciada, es decir, hepatocitos o células similares a hepatocitos, como se describe, por ejemplo, por Aurich et al. (Gut 2009, 58, 570). Las células madre adiposas pueden en una realización diferenciarse *in vitro* antes de ser administradas a un sujeto que tiene una enfermedad hepática aguda o crónica. Preferiblemente, la célula madre adiposa a la que se hace referencia en la presente memoria se diferencia en una célula diferenciada adipogénicamente, tal como un adipocito, o en una célula diferenciada osteogénicamente, tal como un osteoblasto, o en una célula diferenciada hepatogénicamente, tal como un hepatocito, como se detalla en la presente memoria a continuación y en Aurich et al., loc. cit. Se prefiere que dicha célula madre adiposa

60

65

diferenciada en una célula diferenciada adipogénicamente se caracterice por la acumulación de gotitas de triglicéridos y/o lípidos y/o la expresión de al menos un gen específico de adipocitos, tal como, sin limitación, el gen de la lipoproteína lipasa o del receptor activado por el proliferador de peroxisomas $\gamma 2$ (PRAR $\gamma 2$) o GAPDH. También se prefiere que dicha célula madre adiposa diferenciada en una célula diferenciada osteogénicamente se caracterice por deposiciones de fosfato de calcio extracelular y/o la expresión de al menos un gen específico de osteoblastos, tal como, sin limitación, osteonectina u osteocalcina. Preferiblemente, dicha célula madre adiposa diferenciada en un hepatocito exhibe al menos un marcador específico de hepatocitos, tal como, sin limitación, albúmina, CD26, CD29, HepPar1, carbamoil fosfato sintetasa, triptófano 2,3-dioxigenasa, P450 tipo 3A4 (CYP3A4), FOXA2 o el receptor de asialoglicoproteína (AGPR) y/o al menos una función específica de hepatocitos, tal como, sin limitación, por ejemplo, formación de urea, metabolismo de las purinas, actividad de la enzima citocromo P450, síntesis y almacenamiento de proteínas, transformación de los hidratos de carbono, síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos, desintoxicación, modificación y excreción de sustancias exógenas y endógenas, formación y secreción de bilis, captación de lipoproteína de baja densidad o la síntesis y almacenamiento de glucógeno. Dichas células madre adiposas diferenciadas en hepatocitos son preferiblemente negativas para marcadores de células progenitoras de hepatocitos como CK7 o CX43. Otros marcadores y funciones específicas de hepatocitos son bien conocidos en la técnica (Sato et al. (2005) Blood 106(2): 756-63; Lee et al. (2004) Hepatology 40(6):1275-84.

En otra realización de la composición de la divulgación, la composición comprende además una matriz en la que están embebidas las células.

De acuerdo con esta realización, las células madre adiposas tal como se definen en la presente memoria están embebidas en una matriz, que comprende, por ejemplo, un biopolímero o polímero sintético, con el fin de incrementar potencialmente la supervivencia celular cuando se introducen las células madre en un sujeto en necesidad del mismo, por ejemplo, proporcionando una estructura tridimensional a las células madre adiposas. Los biopolímeros adecuados incluyen, sin limitación, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos. Como polímero sintético, se puede utilizar, por ejemplo, polietilenglicol. La matriz puede en algunas realizaciones comprender, además de las células madre adiposas, citocinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación o construcciones de expresión de ácidos nucleicos y componentes de la matriz extracelular, etc. Tales polímeros pueden estar, por ejemplo, en suspensión o pueden formar un gel tridimensional con las células embebidas en su interior. Preferiblemente, tales polímeros pueden ser biodegradables. Las combinaciones de diferentes polímeros también están abarcadas por algunas realizaciones preferidas de la invención. En otra realización, la matriz comprende un hidrogel.

Preferiblemente, la matriz comprende polietilenglicol, colágeno, fibrina, o una combinación de los mismos.

En otra realización preferida más de la composición de la invención, la composición comprende además un biomaterial, sobre el que se recubren las células.

Preferiblemente, el biomaterial es fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno, proteoglicanos, quitosano, alginato y alginato de ácido hialurónico, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol o cualquier otro biomaterial como se describe en la presente memoria.

En otra realización más de la composición de la invención, la composición comprende además suero u otros componentes de la sangre, tales como plasma.

El plasma o el suero a menudo contienen factores y componentes celulares que son necesarios para la viabilidad celular y la expansión. El plasma se obtiene normalmente a partir de una muestra de sangre completa, que se proporciona o pone en contacto con un anticoagulante, tal como heparina, citrato o EDTA, en, o poco después de extraer la muestra de sangre, para prevenir la coagulación. Posteriormente, los componentes celulares de la muestra de sangre se separan del componente líquido (plasma) por centrifugación. El suero se puede obtener a partir de plasma mediante la eliminación del anticoagulante y de la fibrina.

Preferiblemente, el suero es suero humano o suero humano de plasma pobre en plaquetas.

En otra realización preferida de la composición de la invención, la célula madre adiposa se administra (es para ser administrada) (i) directamente después del aislamiento, (ii) después del cultivo y/o la proliferación en cultivo celular o (iii) después de la crioconservación.

De acuerdo con esta realización, la célula madre adiposa se puede utilizar para la administración al paciente que tiene una enfermedad hepática directamente después del aislamiento. Las células madre también se pueden mantener en cultivo de células y/o propagar en condiciones que permiten el crecimiento y la duplicación de dichas células sin diferenciación. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, las que se utilizan para la obtención de las células madre. Una persona experta capaz de evaluar la presencia o ausencia de diferenciación celular podrá establecer fácilmente otras condiciones. Esto puede aumentar el número de las células madre disponibles para el uso adicional de las mismas. Los presentes inventores han observado que las células madre adiposas primarias o de cualquier pase posterior podrían crioconservarse para su uso posterior, como se conoce generalmente en la

técnica para las células de mamífero. Los presentes inventores han encontrado que las células madre adiposas aisladas retienen sustancialmente su capacidad de proliferación después de la congelación y descongelación. Dichas células se pueden almacenar como una suspensión concentrada de células congeladas, descongeladas, como generalmente se hace en la técnica y sembradas de nuevo en las mismas condiciones como se describe, por ejemplo, en los siguientes ejemplos. En otra realización, las células madre adiposas aisladas pueden diferenciarse en tipos celulares más especializados, mediante el uso de condiciones de cultivo celular adecuadas, como se describe en la presente memoria.

En una realización preferida adicional de la composición de la invención, la célula madre adiposa se administra (es para ser administrada) mediante infusión/inyección intrahepática, con el apoyo de técnicas de imagen como la ecografía, la tomografía por resonancia magnética o la tomografía computarizada.

En una realización preferida adicional de la composición de la invención, el nivel de proteína total y/o el nivel de albúmina en el suero se incrementa, en comparación con un sujeto no tratado.

El nivel de proteína total y/o el nivel de albúmina en el suero se pueden determinar por métodos descritos en la técnica, por ejemplo a partir de sangre o suero.

En otra realización de la composición de la invención, el nivel de hierro en el suero se reduce, en comparación con un sujeto no tratado.

El nivel de hierro en el suero se puede determinar por métodos descritos en la técnica, por ejemplo, a partir de sangre o suero.

Las pruebas de la función hepática son un grupo de análisis de sangre de bioquímica clínica diseñadas para dar información sobre el estado del hígado de un paciente. Los parámetros medidos incluyen albúmina, proteína total, hierro, colinesterasa, lactato deshidrogenasa, transaminasa glutámico-oxalacética, transaminasa glutámico-pirúvica, fosfatasa alcalina, bilirrubina (directa e indirecta) y otros. Las transaminasas hepáticas (aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT incluyendo GPT y AST) no son pruebas de la función hepática, pero son biomarcadores del daño hepático en un paciente con cierto grado de la función hepática intacta. La mayoría de las enfermedades hepáticas solo causan síntomas leves al principio, pero es vital que se puedan detectar estas enfermedades a tiempo. Esta prueba se realiza en una muestra de suero o plasma de un paciente obtenida por flebotomía. Algunas pruebas están asociadas con la funcionalidad (por ejemplo, albúmina); algunas de ellas con la integridad celular (por ejemplo, las transaminasas) y algunas con afecciones relacionadas con la vía biliar (gamma-glutamil transferasa y fosfatasa alcalina). Como es conocido para los expertos en la técnica, varias pruebas bioquímicas son útiles en la evaluación y tratamiento de pacientes con disfunción hepática. Estas pruebas se pueden utilizar para (1) detectar la presencia de enfermedad hepática, (2) distinguir entre diferentes tipos de trastornos hepáticos, (3) medir el grado de daño hepático conocido y (4) seguir la respuesta al tratamiento.

Se pueden utilizar las mediciones de proteína total para detectar y facilitar el diagnóstico de la enfermedad hepática. Los bajos niveles de proteína total pueden sugerir un trastorno hepático. Un nivel de proteína total más alto en el suero de un paciente que tiene una enfermedad hepática tratada con células madre adiposas es indicativo de la restauración de la función hepática, en comparación con el nivel de proteína total en el suero de un paciente no tratado con la misma enfermedad hepática.

La albúmina es una proteína producida específicamente por el hígado y se puede medir de forma barata y fácilmente. Es el principal constituyente de las proteínas totales; la fracción restante se llama globulina, incluyendo las inmunoglobulinas. Los niveles de albúmina están disminuidos en la enfermedad hepática crónica, como la cirrosis. Un nivel de albúmina superior en el suero de un paciente que tiene una enfermedad hepática tratada con células madre adiposas indica restauración de la función hepática, en comparación con el nivel de albúmina en el suero de un paciente no tratado que tiene la misma enfermedad hepática.

Mediante el uso de un modelo animal, los inventores pudieron demostrar en los siguientes ejemplos que la inyección de células madre adiposas en el hígado dañado después de una hepatectomía de 2/3 conduce a una restauración significativamente mayor y más temprana de la función hepática en comparación con el grupo control no tratado con células. Esto podría demostrarse por unos niveles más altos de albúmina y de proteína total.

Los niveles de hierro en suero son elevados en las enfermedades hepáticas y se han utilizado como marcador de daño hepático en el pasado. Bajos niveles de hierro en un sujeto tratado con células madre adiposas que tiene una enfermedad hepática pueden ser interpretados como una regeneración más rápida del hígado, en comparación con el nivel de hierro en el suero de un paciente no tratado que tiene la misma enfermedad hepática.

Los niveles de hierro más bajos en los animales tratados con células 3 semanas después de la cirugía pueden ser interpretados como una regeneración más rápida debido a las células madre adiposas inyectadas, como puede deducirse de los ejemplos adjuntos.

5 La alanina transaminasa o alanina aminotransferasa (ALT), también llamada transaminasa glutámico-pirúvica sérica (SGPT), es una enzima presente en los hepatocitos y se utiliza como un marcador de la lesión hepática. Cuando una célula se daña, esta enzima se filtra en la sangre, en la que se mide. La ALT aumenta drásticamente en el daño hepático agudo, como la hepatitis viral o la sobredosis de paracetamol. Las elevaciones se miden a menudo en múltiplos del límite superior de la normalidad (LSN).

10 La aspartato transaminasa o aspartato aminotransferasa (AST), también llamada transaminasa glutámico-oxalacética sérica (SGOT), es similar a ALT al tratarse de otra enzima asociada a las células del parénquima hepático. Se utiliza como marcador de lesión hepática ya que se eleva en el daño hepático agudo. Sin embargo, dicha enzima está también presente en los eritrocitos y en el músculo cardíaco y esquelético y, por lo tanto, no es específica del hígado. La relación entre AST y ALT a veces se utiliza para diferenciar entre las causas de daño hepático.

15 Se prevé que la ALT, la AST, la lactato deshidrogenasa y/o el amoníaco se reduzcan después de la administración de las células madre adiposas al paciente humano que tiene una enfermedad hepática tal como se define en la presente memoria.

20 La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima presente en las células que recubren los conductos biliares del hígado. Los niveles de ALP en el plasma aumentarán en caso de una obstrucción del conducto biliar grande, colestasis intrahepática o enfermedades infiltrativas del hígado. Sin embargo, la ALP también está presente en el hueso y en el tejido placentario.

25 La bilirrubina es un producto de degradación del grupo hemo. El hígado es responsable de la eliminación de la sangre de la bilirrubina. La bilirrubina se absorbe en los hepatocitos, se conjugado y se secreta en la bilis, la cual se excreta en el intestino. El aumento de la bilirrubina total causa ictericia, y puede ser señal de problemas hepáticos que se reflejan como deficiencias en el metabolismo de la bilirrubina, por ejemplo, la reducción de la absorción en hepatocitos, el deterioro de la conjugación de la bilirrubina y la reducción de la secreción de los hepatocitos de la bilirrubina. Ejemplos de ello son la cirrosis y la hepatitis viral.

30 Aunque razonablemente específica del hígado y un marcador más sensible del daño colestásico que la ALP, la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) puede estar elevada con niveles incluso menores, sub-clínicos, de disfunción hepática. Por ejemplo, la GGT está elevada en la toxicidad alcohólica crónica. También puede ser útil para identificar la causa de una elevación aislada de la ALP.

35 Las pruebas de la función hepática que analizan los parámetros mencionados anteriormente se describen, por ejemplo, en Manizate F, Hiotis SP, Labow D, Roayaie S, Schwartz M. Liver functional reserve estimation: state of the art and relevance for local treatments: the Western perspective. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*; 17(4):385-8; Martínez SM, Crespo G, Navasa M, Forns X. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* (Baltimore, Md; 53(1):325-35; Rodríguez et al. (2010) *Nutr Hosp*; 25(5):712-7.

40 En otra realización más de la composición de la invención, las células madre se pueden detectar durante al menos 4, 6, o preferiblemente 8 semanas, más preferiblemente más de 8 semanas después de la infusión o del trasplante.

45 Como se desprende de los siguientes ejemplos, las células madre adiposas inyectadas migran desde una ubicación inicialmente central en el lóbulo hasta su periferia y se podían encontrar hasta 8 semanas después de la inyección.

La divulgación también se refiere a una matriz implantable que comprende células madre adiposas humanas para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica.

50 Las definiciones y ventajas establecidas en la presente memoria para la composición y kit de la divulgación se aplican *mutatis mutandis* a la matriz implantable. La matriz puede contener polietilenglicol, colágeno, fibrina, o una combinación de los mismos, opcionalmente con un tampón fisiológicamente aceptable.

55 La divulgación además se refiere a una composición en un tampón fisiológicamente compatible, que comprende: células madre adiposas humanas y al menos uno de (i) una sustancia semisólida o (ii) una sustancia biodegradable o (iii) suero humano, preferiblemente suero de plasma pobre en plaquetas, para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica.

60 La sustancia semisólida o sustancia biodegradable puede ser ácido hialurónico, colágeno, trombina, elastina, sulfato de condroitina, albúmina o una mezcla de los mismos.

65 Por último, la divulgación se refiere a un kit que comprende la composición o la matriz implantable de la invención y una hoja de instrucciones, para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica. El kit puede comprender células madre adiposas humanas que son autólogas o heterólogas respecto al paciente como se describe en la presente memoria, así como medios para el aislamiento de células madre adiposas y/o medios para la administración de células madre adiposas tal como se describe en la presente memoria, lo más

preferiblemente mediante infusión o inyección intrahepática. En consecuencia, dicho kit puede contener por tanto una hoja de instrucciones que describe el método para aislar y/o cultivar y/o administrar las células madre adiposas tal como se describe en la presente memoria.

- 5 La hoja de instrucciones contiene información sobre la dosificación y administración de las células madre adiposas, opcionalmente con las condiciones del cultivo celular para la proliferación y/o diferenciación de las células madre adiposas. En cuanto a la matriz implantable, esta contiene información acerca de la implantación de la matriz implantable.

10 FIGURAS

La **Figura 1** muestra los resultados de FACS de las células madre adiposas humanas (hADSC) utilizando los marcadores de superficie celular indicados. Las células madre fueron positivas para CD13, CD29, CD49a, CD63, CD73, CD90, CD105 y/o CD166 y/o negativas para CD31, CD34, CD44, CD45 y/o CD106. Las células, por lo tanto, cumplen con los criterios de consenso mínimos para las células madre mesenquimales.

La **Figura 2** muestra la tinción con aceite rojo para la acumulación de triacilglicéridos intracelulares en células madre adiposas humanas diferenciadas adipogénicamente. Las células madre inducidas adipogénicamente mostraron una concentración más alta de aceite rojo estadísticamente significativa que los controles no inducidos en todos los donantes.

La **Figura 3** muestra la tinción con rojo de alizarina para la deposición de calcio extracelular en las células madre adiposas humanas (hADSC) diferenciadas osteogénicamente. Las hADSC diferenciadas osteogénicamente mostraron una elevada deposición de calcio extracelular, analizada con tinción de rojo de alizarina. Las células no inducidas no mostraban deposición de calcio extracelular.

La **Figura 4** muestra los niveles séricos de albúmina, proteína total, CHE (colinesterasa), GOT (transaminasa glutámico-oxaloacética) y LDH (lactato deshidrogenasa). Las barras negras muestran los valores estándar normales, las barras rojas los valores de los animales tratados con células y las barras verdes los valores de animales control no tratados con células. Los datos se expresaron como la media \pm EE. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student y cuando la prueba de normalidad fallaba, con la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

La **Figura 5** muestra la tinción con azul de Prusia de células madre adiposas humanas marcadas con SPIO (partículas superparamagnéticas de óxido de hierro) en cortes de lóbulo de hígado de rata. a) 2 semanas después de la inyección y b) 4 semanas después de la inyección.

Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una exposición y descripción completas de cómo hacer y utilizar las realizaciones, y no se pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni se pretende representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, y la temperatura es en grados Celsius. Se utilizan abreviaturas estándar.

Ejemplo 1: Células

50 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Después de obtenido el consentimiento informado, se aislaron células del estroma mesenquimales de tejido adiposo subcutáneo recién extirpado de seis adultos (mujeres en el intervalo de 34-59, con una mediana de la edad de 39,5 años) sometidos a cirugía plástica electiva utilizando un procedimiento modificado de Hauner et al. (1989). En resumen, después de la eliminación de tejido fibroso, el tejido adiposo se lavó dos veces en BSA/PBS 1 %, se trituró y digirió enzimáticamente con colagenasa, (colagenasa CLS; 220 U/mg, Biochrom AG, Berlín, Alemania, 1,5 mg/ml, en BSA/solución de Krebs-Ringer) 1 % durante 45 minutos bajo agitación constante a 37 ° C. Los adipocitos maduros y el tejido conjuntivo se separaron por centrifugación (700 x g, 7 min., TA). Las células sedimentadas se resuspendieron, se pasaron a través de un filtro de malla de 100 μ m (Neolab, Heidelberg, Alemania) y se lavó dos veces con BSA/PBS 1 %. Después de la lisis de los eritrocitos (3 minutos, cloruro de amonio 155 mM, bicarbonato de potasio 10 mM; EDTA 0,1 mM), las células se lavaron de nuevo dos veces y se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/cm² en medio de expansión. Después de 12 horas, se cambió el medio para eliminar las células no adheridas. El medio de expansión se reemplazó cada segundo día.

65 Las células se cultivaron en medio de expansión (DMEM 60 % (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania)), MCDB-201 40 % (Sigma), $1 \times$ insulina-transferrina-selenio (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania), dexametasona 10^{-8} M, ácido

ascórbico-2-fosfato 0,1 mM, suero de ternera fetal 2 % (Biochrom, Berlín, Alemania), penicilina 100 U/ml (Biochrom), estreptomycin 0,1 mg/ml (Biochrom), EGFhr 10 ng/ml (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) y rhPDGF-BB 10 ng/ml (CellSystems, St. Katharinen, Alemania). El medio se intercambiaba cada segundo día. Una vez que las células alcanzaron 70 % de confluencia, estas fueron separadas con tripsina-EDTA 0,25 % (Biochrom, Berlín, Alemania) y se volvieron a sembrar con $3,5 \times 10^3$ células por cm^2 . Los cultivos se incubaron a 37 ° C con CO_2 5 %.

Ejemplo 2: Diferenciación adipogénica y osteogénica

Diferenciación adipogénica

Las células se sembraron en medio de expansión a una densidad de 24.000 células/ cm^2 . Después de alcanzar 90 % de confluencia, la adipogénesis se indujo mediante el uso alternado de medio basal (FCS/DMEM 5 %) suplementado con mezcla IDI (3-isobutil-1-metilxantina 500 μM , dexametasona 1 μM , indometacina 1 μM) durante 2 días, seguido de medio basal más 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina durante 1 día, como se describe en los siguientes ejemplos. El ciclo de inducción se repite 3 veces. La diferenciación adipogénica se analizó utilizando cuantificación con aceite rojo como se describe anteriormente [Ramírez-Zacarias et al. 1992, Histochemistry 97, 493].

Diferenciación osteogénica

Después de sembrar con una densidad de 24.000 células/ cm^2 , las células se cultivaron en medio de expansión hasta el 90 % de confluencia. La inducción osteogénica se inició cambiando el medio por DMEM que contenía FCS 5 %, suplementado con L-ascorbato-2-fosfato 50 μM , dexametasona 0,1 μM y β -glicerofosfato disódico 10 mM. La deposición de calcio se demostró histoquímicamente mediante tinción con rojo de alizarina tal como se describe anteriormente (Landoff (1948) Acta Orthop Scand. 1948; 17 (3-4):270-302; Wise et al. (1979) J. Biol. Chem. 54(2): 273-5. Un protocolo típico para la cuantificación de calcio de CMM diferenciadas osteogénicamente es el siguiente: Las células se analizaron 14, 21, 35, y 42 días después de la inducción de la diferenciación. Las capas de células de CMM diferenciadas osteogénicamente se lavaron dos veces con PBS sin $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$. El Ca^{2+} extracelular depositado se extrajo con HCl 0,6 M mediante la incubación de las células a temperatura ambiente en un agitador de placa durante 2 horas. Los extractos se centrifugaron durante 5 minutos a 15.700 x g y el contenido de Ca^{2+} en el sobrenadante se cuantificó por el método del complejo de O-cresolftaleína (Fluitest Ca-CPC, Biocon, Vöhl-Marienhagen, Alemania). Posteriormente las células extraídas se lavaron tres veces con PBS sin $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, se rasparon con una espátula de goma en NaOH 0,1 M/SDS 1 % y se trataron con ultrasonidos tal como se describe anteriormente. Después de centrifugación a 4 ° C y 8.000 x g durante 5 minutos se determinó el contenido de proteína de los sobrenadantes con el kit BCA (Pierce, Rockford, EE.UU.).

Un protocolo típico para la tinción de alizarina es como sigue: las monocapas de CMM mineralizadas se lavaron dos veces con un exceso de PBS y se fijaron con etanol al 70 % pre-refrigerado durante 1 hora a -20 ° C. Después de una etapa breve de lavado con H_2O la capa de células se incubó con rojo de alizarina 40 mM (pH 4,2) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después de la aspiración del colorante no incorporado, las células se lavaron dos veces más con exceso de H_2O y una vez con PBS antes del análisis microscópico

Ejemplo 3: Citometría de flujo

Se examinaron células madre adiposas humanas (hADSC) expandidas hasta el pase cuatro para determinar la expresión del marcador de superficie mediante citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb) conjugados con fluorocromos: anti-CD13-APC, anti-CD29-PE, anti-CD31-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD44-APC, anti-CD45-FITC, anti-CD49a-PE, anti-CD63-FITC, anti-CD73-PE, anti-CD90-APC, anti-CD105-FITC, anti-CD166-PE (todos de Becton Dickinson). Para todos los fluorocromos se incluyeron anticuerpos de isotipo.

Las células fueron separadas con tripsina-EDTA 0,25 %, se incubaron con mAb conjugados directamente en tampón FACS (FCS 1 %, NaN_3 0,1 % en PBS) durante 30 min en hielo, se lavaron dos veces con tampón FACS y se fijaron con paraformaldehído/PBS 1 %. Las células se analizaron utilizando un sistema de citometría de flujo FACSCanto (Becton Dickinson). La adquisición y el análisis de los datos se realizó con el software Diva (Becton Dickinson).

Ejemplo 4: Marcado con SPIO

Las células se marcaron con partículas superparamagnéticas de hierro para el rastreo *in vivo*. Esto no interfirió con la proliferación o diferenciación celular.

Ejemplo 5: Animales

Todos los estudios se llevaron a cabo siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Uso de Cuidado de Animales de la Universidad Ruprecht Karls de Heidelberg, Alemania, y en conformidad con los Institutos Nacionales de Salud.

Las ratas Sprague Dawley hembra con un peso de 140-200 g se adquirieron en Charles River Laboratories. Estas se mantuvieron en un ciclo automático de 12 h de luz/oscuridad y se alimentaron con pienso estándar para ratas y agua *ad libitum*.

5 Administración de agentes tóxicos

Después de 1 semana de aclimatación, todas las ratas recibieron dos inyecciones intraperitoneales de retrorsina, separadas por un intervalo de 13 días, cada una de 30 mg/kg de peso. La retrorsina se disolvió en HCl (pH 2,5), seguido de neutralización con NaOH 0,1 N, como se ha descrito (Lan et al. 2008, *Transpl Int* 21, 58192; Kuo et al. 2008, *Gastroenterology* 134, 2111).

Treinta días después de la segunda inyección, los animales recibieron 10 inyecciones repetidas de alcohol alílico cada tres días, cada una de 0,31-0,372 mmol/kg de peso corporal. Tres días después de la última inyección de alcohol alílico, todos los animales fueron sometidos a una hepatectomía parcial de dos tercios; véase el procedimiento quirúrgico.

Procedimiento quirúrgico

Tres días después de la última inyección de alcohol alílico, todos los animales fueron sometidos a una hepatectomía parcial de dos tercios (véase, por ejemplo, Gordon et al. (2000) *American Journal of Pathology* 156 (2): 607-19; Laconi et al. *Cell Transplantation* 2008; 17(12):1415-21).

Se extirpó el lóbulo hepático derecho e izquierdo medial y el lóbulo hepático lateral izquierdo, todos los demás lóbulos quedaron *in situ*. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos. El grupo 1 recibió 2×10^6 de CM en 200 μ l de DMEM inyectadas directamente en el lóbulo hepático lateral derecho restante, el grupo 2 recibió 200 μ l de DMEM. El orificio de entrada se cerró con un breve electroimpulso bipolar. Después de un enjuague a fondo para eliminar los coágulos de sangre, se implantó una bomba osmótica (ALZET) en la cavidad abdominal para la liberación continua de ciclosporina. La pared abdominal se cerró en 3 pasos solo con suturas. Los lóbulos del hígado extirpados se fijaron en formalina para la estadificación y el análisis histológico. El cuidado postoperatorio se administró con buprenorfina y carprofeno cada 12 horas y en caso necesario.

Concentraciones sanguíneas

Se extrajo sangre a través de la vena de la cola cada 7 días, comenzando desde el día 3 después de la operación para determinar las concentraciones de colinesterasa, proteína total, albúmina, GOT, GPT, hierro y lactato deshidrogenasa.

Ejemplo 6: Resultados

40 **Ejemplo 6.1: Citometría de flujo**

Las células madre adiposas humanas (hADSC) fueron positivas para los marcadores de la superficie celular CD13, CD29, CD49a, CD63, CD73, CD90, CD105 y CD166. Las hADSC fueron negativas para los marcadores de la superficie celular CD31, CD34, CD44, CD45 y CD106. Por lo tanto, las células cumplen los criterios de consenso mínimos para las células madre mesenquimales; véase la Figura 1.

Ejemplo 6.2: Aislamiento y cultivo de células

Diferenciación adipogénica

50 Las células inducidas adipogénicamente mostraron una concentración de aceite rojo más alta estadísticamente significativa que la de los controles no inducidos en todos los donantes; véase la Figura 2.

Diferenciación osteogénica

55 Las hADSC diferenciadas osteogénicamente mostraron una elevada deposición de calcio extracelular, se analizaron con tinción de rojo de alizarina; véase la Figura 3. Las células no inducidas no mostraron deposición de calcio extracelular.

60 **Ejemplo 6.3: Parámetros de laboratorio**

Antes de la primera aplicación de retrorsina, todas las concentraciones sanguíneas determinadas en los animales de experimentación fueron concordantes con las concentraciones de base publicadas en la literatura.

65

Ejemplo 6.4: Concentraciones sanguíneas postoperatorias

Los datos se expresaron como la media \pm EE. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student y cuando la prueba de normalidad fallaba, con la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo

Albúmina

Las concentraciones postoperatorias de albúmina estuvieron sistemáticamente por debajo de los valores estándar. Hubo concentraciones de albúmina más altas estadísticamente significativas en los animales tratados con células que en los animales control no tratados con células en la semana uno y dos después de la cirugía ($p = 0,016-0,017$). La albúmina funciona como un buen marcador para la síntesis hepática.

Proteína total

La proteína total fue más elevada en los animales tratados con células a lo largo de todo el período de análisis. Los valores estándar se alcanzaron después de la tercera semana después de la cirugía en los animales tratados con células y después de la sexta semana en los animales de control. Las concentraciones de proteína total fueron estadísticamente significativamente mayores en el grupo tratado con células en comparación con el grupo control en la semana uno y dos después de la cirugía ($p = 0,015-0,031$).

Colinesterasa (CHE)

Las concentraciones postoperatorias de CHE estaban claramente por debajo de los valores estándar, lo que representa un marcador específico del hígado de una función hepática y síntesis significativamente reducidas, inicialmente entre 30 y 50 %. No se alcanzó el valor estándar dentro del período de la investigación. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con células y los no tratados con células. El grupo de control no tratado tenía concentraciones más altas de CHE que el grupo tratado con células. En ambos grupos las concentraciones de CHE comenzaron a aumentar lentamente 6 semanas después de la cirugía hasta el 75 % del valor estándar en la semana 10 después de la cirugía.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

Las concentraciones postoperatorias de LDH en los animales de control permanecieron sistemáticamente por debajo de los valores estándar. En los animales tratados con células hubo un máximo de LDH en la semana 2 después de la cirugía. En semanas 2, 4 final de la 5, la LDH fue estadística y significativamente mayor en el grupo tratado con células ($p = 0,003-0,04$).

Transaminasa glutámico-oxalacética (GOT)

La GOT era más elevada en los animales tratados con células que en los animales no tratados con células desde la primera hasta la octava semana después de la cirugía, siendo en las semanas 1 y 8 esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001-0,014$).

Transaminasa glutámico-pirúvica (GPT)

La administración de alcohol alílico y retrorsina condujo a una elevación de las concentraciones de GPT antes de la cirugía en comparación con las concentraciones estándar. Las concentraciones postoperatorias de GPT fueron mayores en el grupo no tratado con células, con un máximo en la segunda semana después de la cirugía. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con células y los no tratados con células. La GPT se considera que es específica del hígado.

Fosfatasa alcalina {AP}

La fosfatasa alcalina estaba claramente elevada en comparación con las concentraciones normales después de la cirugía hasta la semana 6. Después de la semana 6, las concentraciones de fosfatasa alcalina fueron mayores en los animales tratados con células en comparación con los animales control. No hubo una diferencia estadística significativa ($p > 0,05$).

Hierro

Las concentraciones postoperatorias de hierro estaban claramente por debajo de las concentraciones normales. Desde la semana 3 después de la cirugía, los animales tratados con células mostraron una concentración menor de hierro que los animales control. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0,05$).

Ejemplo 6.5: Histología

5 Las células migraron después de la inyección desde el centro del lóbulo hasta la periferia. Las células marcadas con SPIO se tiñeron con colorante azul de Prusia. No se encontraron partículas SPIO en los macrófagos. Debido a la alta intensidad de hierro del hígado, las partículas SPIO no se pudieron detectar por resonancia magnética. Se pudo observar una gran variación en el grado de necrosis de una rata a, de un lóbulo a otro y de un corte a otro. No se ha observado durante todo el periodo de seguimiento de 16 semanas la formación de tumores.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende células madre adiposas humanas para su uso en un método para la regeneración del hígado, que comprende administrar dichas células madre en el hígado mediante infusión o inyección intrahepática, en la que las células madre adiposas no están embebidas en una matriz que consiste en un polímero, seleccionado de un biopolímero y un polímero sintético, que forma un gel tridimensional.
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1 para la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad hepática aguda o crónica.
- 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 2, en la que la enfermedad hepática aguda o crónica se selecciona de pérdida de la función hepática, isquemia, fibrosis y/o cirrosis.
- 20 4. La composición para el uso de la reivindicación 2 o 3, en la que la enfermedad hepática se selecciona del grupo que consiste en: isquemia hepática, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, cirrosis, enfermedad hepática colestásica, enfermedad quística del hígado, hígado graso, galactosemia, cálculos biliares, síndrome de Gilbert, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, cáncer de hígado, hepatitis neonatal, enfermedad hepática no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, porfiria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, esteatohepatitis, tirosinemia, enfermedad del almacenamiento del glucógeno tipo I, hepatitis vírica, enfermedad de Wilson o cualquier combinación de las mismas.
- 25 5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula madre adiposa se aísla a partir de tejido adiposo humano.
- 30 6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula madre adiposa es una célula madre adiposa autóloga, heteróloga o xenóloga.
- 35 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula madre adiposa es una célula madre mesenquimal.
- 40 8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula madre mesenquimal es positiva para los marcadores de la superficie celular CD13, CD29, CD49a, CD63, CD73, CD90, CD105 y/o CD166 y/o negativas para los marcadores de la superficie celular CD31, CD34, CD44, CD45 y/o CD106.
- 45 9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula madre adiposa es una célula madre mesenquimal indiferenciada, una célula madre mesenquimal diferenciada o una célula madre mesenquimal modificada genéticamente.
- 50 10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula madre mesenquimal diferenciada es una célula madre mesenquimal diferenciada adipogénicamente, osteogénicamente o hepatogénicamente.
- 55 11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se formula como una solución, suspensión, dispersión o emulsión.
- 60 12. La composición para el uso de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un biomaterial, sobre el cual se recubren las células.
- 65 13. La composición para el uso de la reivindicación 12, en la que el biomaterial es fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno, proteoglicanos, quitosano, alginato y alginato de ácido hialurónico, quitosano, ácido hialurónico o polietilenglicol.
14. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además suero o plasma.
15. La composición para el uso de la reivindicación 14, en la que el suero es suero humano o suero humano de plasma pobre en plaquetas.
16. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula madre adiposa se administra (i) directamente después del aislamiento, (ii) después del cultivo y/o la proliferación en cultivo celular o (iii) después de la criopreservación.
17. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nivel de proteína total y/o el nivel de albúmina en el suero aumenta, en comparación con un sujeto no tratado.

18. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nivel de hierro en el suero disminuye, en comparación con un sujeto no tratado.

5 19. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células madre adiposas se pueden detectar durante al menos 4, 6, o preferiblemente 8 semanas después de la infusión o el trasplante.

Figura 1

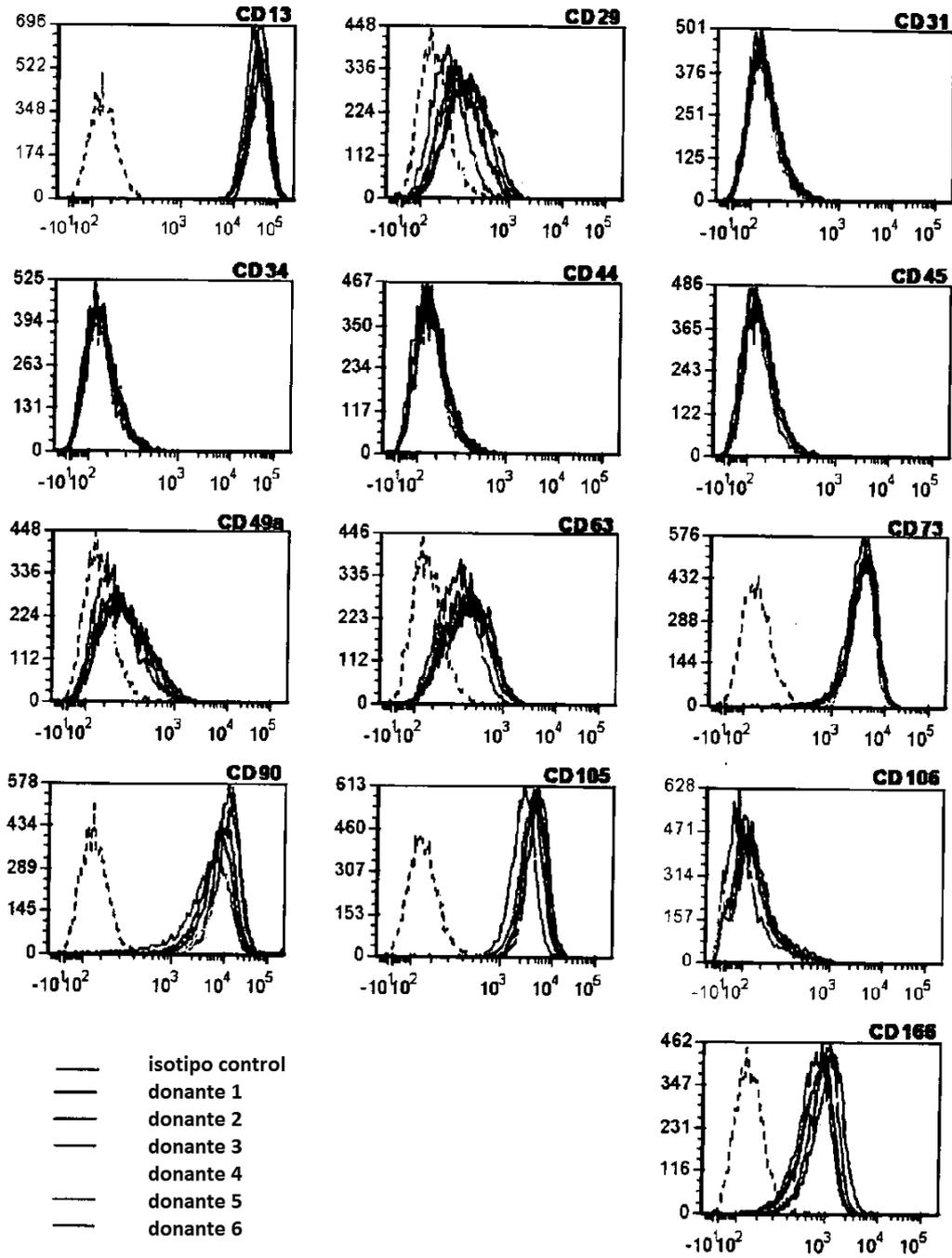


Figura 2

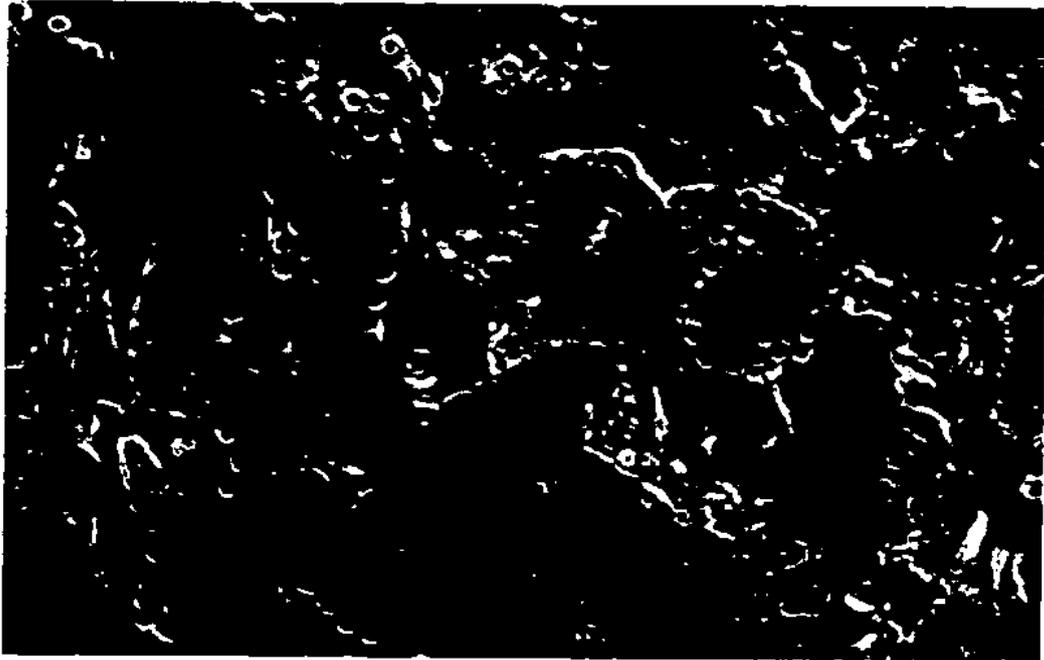
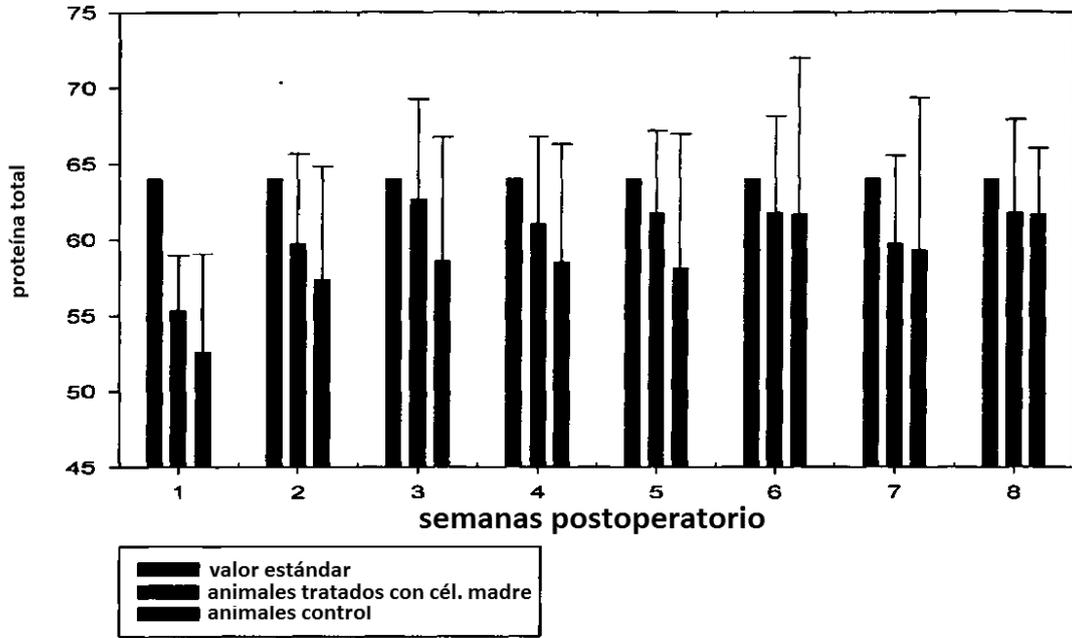


Figura 3



Figura 4
proteína total
- postoperatorio -



albúmina
- postoperatorio -

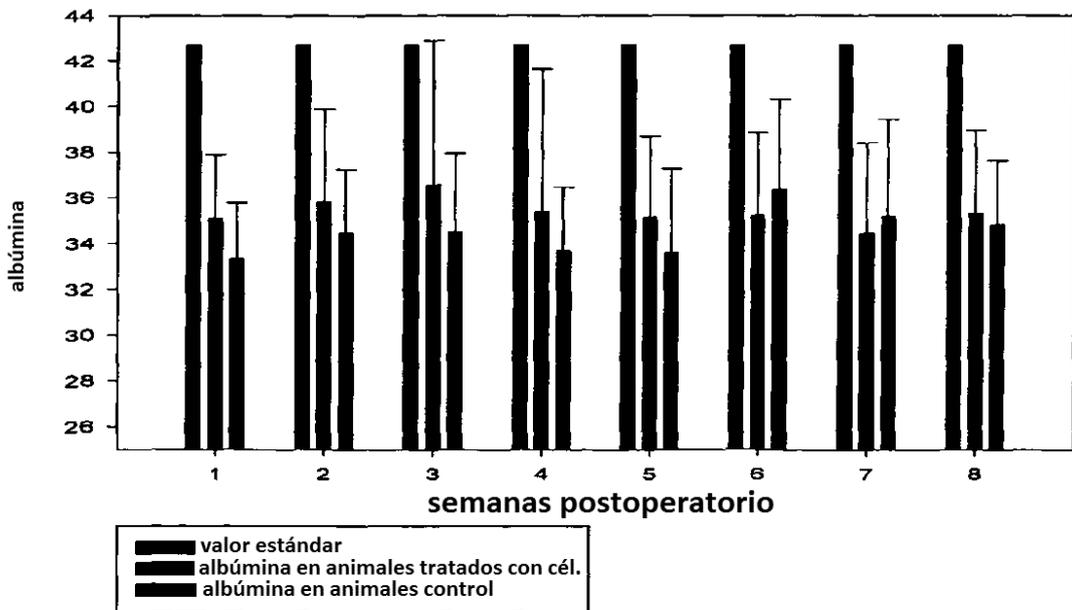
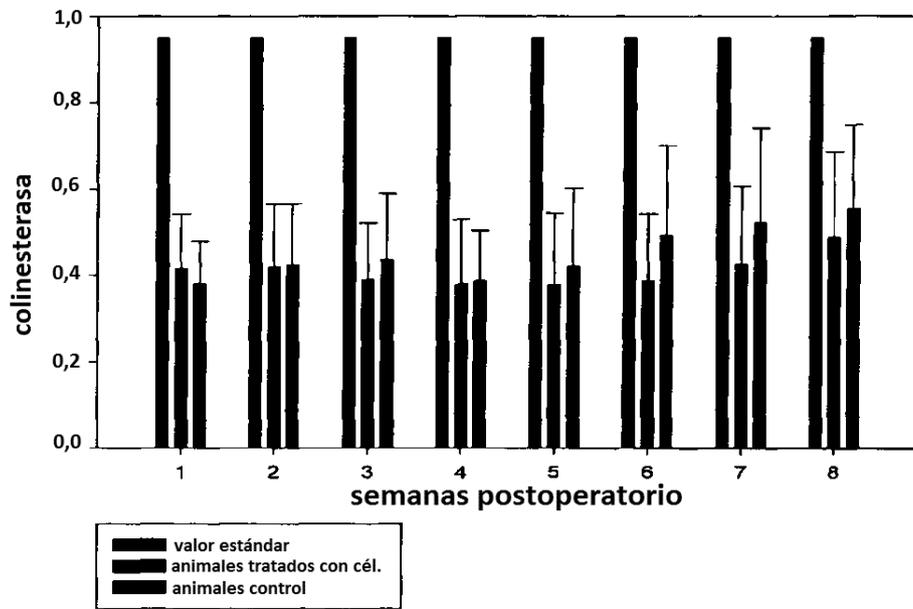


Figura 4 (cont.)

colinesterasa
-postoperatorio-



transaminasa glutámico-oxaloacética
- postoperatorio -

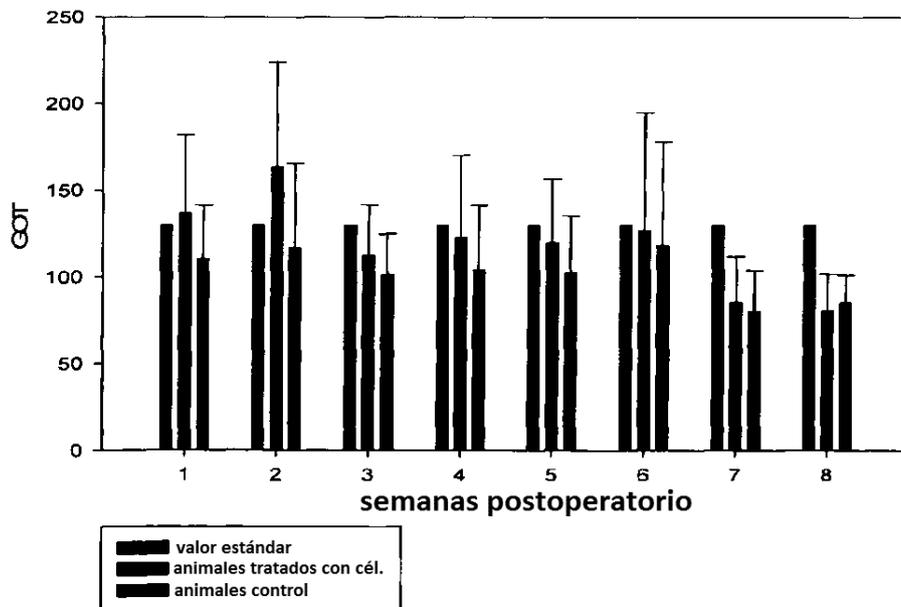


Figura 4 (cont.)

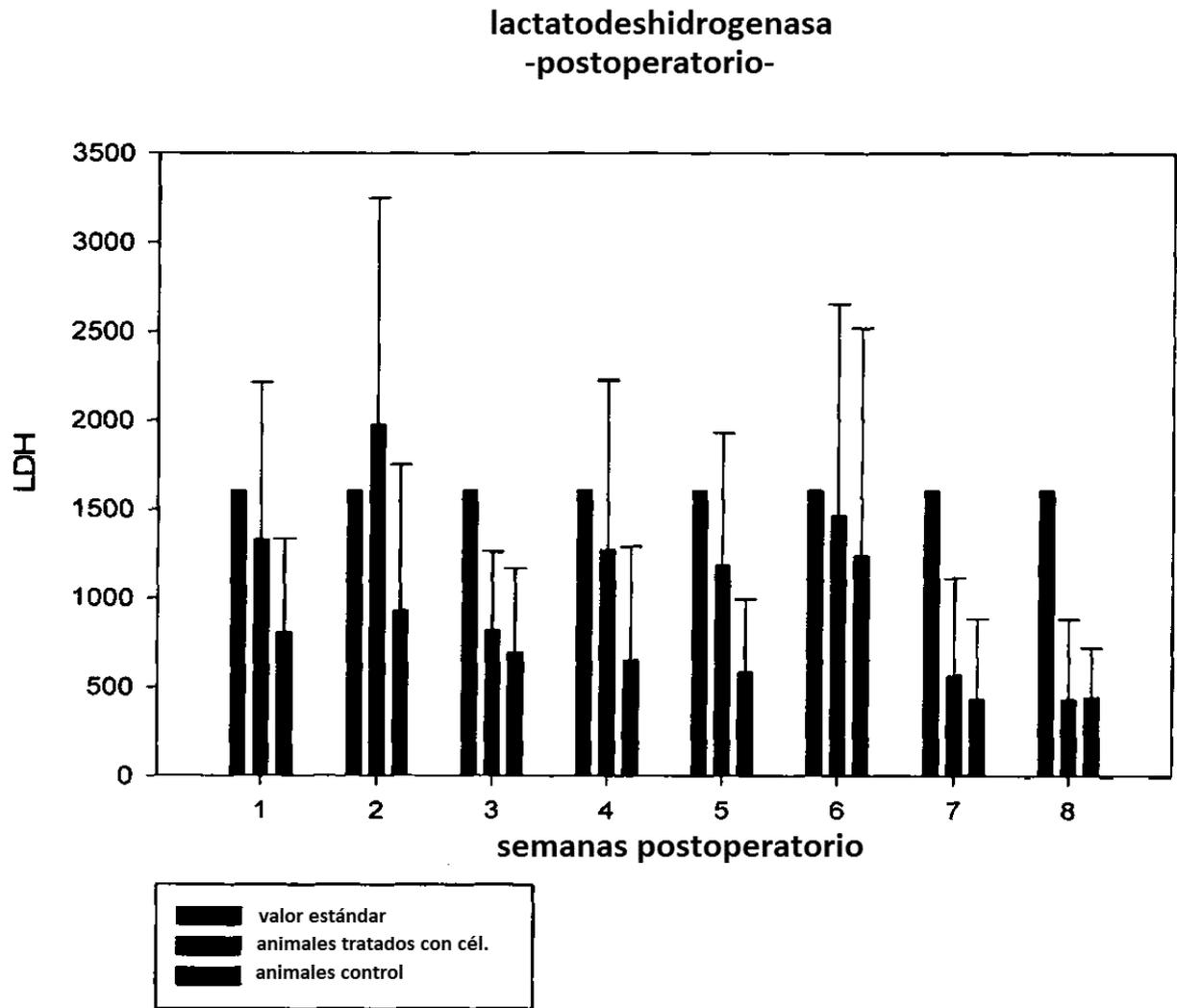


Figura 5

A)



B)

