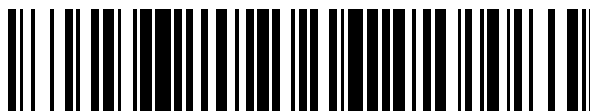


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 315**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/734** (2006.01)

**A61K 31/738** (2006.01)

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61L 31/04** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2008 PCT/IL2008/001552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2009 WO09069131**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2008 E 08853658 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2227237**

54 Título: **Biomateriales de alginato para el tratamiento de trastornos hepáticos**

30 Prioridad:

**27.11.2007 IL 18770707**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.03.2018**

73 Titular/es:

**HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES &  
DEVELOPMENT LTD. (50.0%)  
P.O.BOX 12000  
91120 JERUSALEM, IL y  
BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV  
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ILAN, YARON;  
LALAZAR, GADI;  
SHTEYER, EYAL;  
BEN-YAAKOV, AMI;  
COHEN, SMADAR y  
ELKAYAM, TSIONA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 658 315 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

Biomateriales de alginato para el tratamiento de trastornos hepáticos

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos y composiciones para promover *in vivo* la reparación y regeneración de tejido hepático dañado, y por tanto a la prevención de insuficiencia hepática, basada en la aplicación sistémica o local exclusiva de biomaterial de alginato natural y modificado en forma sólida o en solución.

10

## Antecedentes de la invención

Actualmente, los biomateriales se están utilizando, o están siendo objeto de investigación, como implantes para facilitar la restauración y regeneración de tejidos defectuosos o que faltan, en condiciones causadas por enfermedades, traumatismo o procedimientos de reconstrucción quirúrgica. En particular, los biomateriales inyectables son ideales para la restauración tisular ya que el material fluido se puede suministrar a través de una pequeña incisión, lo que permite un acceso mínimamente invasivo al espacio tisular donde sea apropiado. Los líquidos pueden interdigitarse con los defectos irregulares de las cavidades (por ejemplo, después de un procedimiento quirúrgico) y, dependiendo del material utilizado, pueden unirse físicamente al tejido adyacente. Los biomateriales inyectables también permiten la incorporación y dispersión uniforme de células y/o agentes terapéuticos, tales como factores de crecimiento y citocinas que son valiosos para mejorar los procesos de reparación tisular.

Las características ventajosas adicionales de los biomateriales para la reconstrucción y restauración tisular incluyen su facilidad de producción y manipulación en comparación con los procesos que implican células y sus productos disponibles en el mercado. Los biomateriales, especialmente los derivados de plantas/algas, tales como los polisacáridos de alginato, son no inmunogénicos, biocompatibles, biodegradables y no se ven afectados por la edad o la enfermedad. Tienen un coste relativamente bajo en comparación con los enfoques de terapia celular existentes.

Las cuestiones principales de los armazones inyectables para utilidades tales como voluminosidad, relleno de espacios vacíos y reconstrucción tisular incluyen resistencia mecánica y durabilidad, promoción de la formación de tejido, biodegradabilidad, biocompatibilidad, esterilizabilidad, tiempo mínimo de fraguado y cambio de temperatura, baja viscosidad para facilitar la inyección, así como facilidad para acceder al defecto. El armazón debe exhibir las propiedades mecánicas necesarias, así como proporcionar soporte físico. Preferentemente, el armazón promovería la formación de matriz mientras se degrada a lo largo del tiempo. La biocompatibilidad del material también es de gran importancia. Ni el material inicial ni sus productos de degradación deberían provocar una respuesta inmunitaria no resuelta, promover inmunotoxicidad o expresar citotoxicidad. Para minimizar las infecciones y las respuestas inmunitarias relacionadas el material implantado debe esterilizarse fácilmente conservando la bioactividad y la composición química originales.

Los biomateriales candidatos pueden inyectarse en forma de líquidos viscosos y después curarse mediante métodos tales como reticulación sensible a la temperatura o al pH, fotopolimerización, o adición de un agente solidificante para formar una sustancia gelatinosa. Los biomateriales también se pueden implantar como una matriz sólida preformada, como un armazón macroporoso o hidrogel.

La presente invención describe un método para reemplazar o complementar la función del órgano perdido utilizando biomateriales terapéuticos. Dicho método es ventajoso sobre la manipulación farmacológica o el trasplante de un órgano completo o partes de un órgano, ya que los últimos no curan una enfermedad sino que modifican su resultado, o cambian la enfermedad original por las complicaciones de la inmunosupresión inespecífica.

Todas las estructuras de los organismos vivos se encuentran en un estado de equilibrio dinámico, experimentando una constante renovación, remodelación y reemplazo del tejido funcional que varía de un órgano a otro y de una estructura a otra. Después de producirse un daño de gran alcance, estas habilidades de remodelación y reemplazo se ven enormemente dañadas. Los biomateriales proporcionan armazones temporales al resto de las células del tejido orgánico, y de ese modo permiten a las células segregar la matriz extracelular y posibilitar, a largo plazo, un reemplazo tisular completo y natural. La estructura macromolecular de estos biomateriales se selecciona de modo que sea completamente degradable y para que se retire una vez que haya logrado su función de proporcionar el soporte artificial inicial al resto de las células del tejido orgánico. Para que estos biomateriales sean útiles en los trasplantes celulares, deben ser muy porosos, con grandes relaciones entre superficie/volumen para acomodar una gran cantidad de células, deben ser biocompatibles, es decir, no tóxicos para el tejido del hospedador en el que se trasplantan, deben ser capaces de promover la adhesión celular y permitir la conservación de la función diferenciada de las células adheridas.

El alginato es un polisacárido aniónico derivado de algas pardas. Es un copolímero de bloque de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G). El polímero se utiliza de forma generalizada en las industrias farmacéutica, alimentaria y

65

médica. La sal de alginato de sodio es soluble en agua y en presencia de cationes divalentes, tales como iones de calcio, forma hidrogel a temperatura ambiente.

Más específicamente, los alginatos se han utilizado previamente para el trasplante de células. Los alginatos son polímeros de polisacáridos naturales, la palabra "alginato" se refiere en realidad a una familia de copolímeros de polisacáridos polianiónicos derivados de algas pardas marinas y que comprenden restos de ácido PD-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) enlazados en 1,4 en proporciones variables. Los alginatos son solubles en soluciones acuosas, a temperatura ambiente, y tienen la capacidad de formar geles estables, particularmente en presencia de determinados cationes divalentes, tales como calcio, bario y estroncio. Las propiedades únicas de los alginatos, además de su biocompatibilidad [véase Sennerby, L. et al. *Biomaterials* 8: 49 - 52 (1987) y Cohen, S. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (En prensa) 88 (23): 10440 - 10444 (1991)], coste relativamente bajo y amplia disponibilidad, hace que sean polímeros importantes en aplicaciones medicinales y farmacéuticas.

El documento WO97/44070 en el que participan algunos de los presentes inventores, describe polisacáridos implantables, por ejemplo, esponjas de alginato para uso como una matriz, un sustrato o un armazón para el cultivo de células de mamífero *in vitro* antes de su implantación para reemplazar tejido dañado o extirpado. El documento WO2004/098669 en el que también participan los presentes inventores, describe alginato reticulado inyectable, que forma un hidrogel *in vivo*. Esta solución de alginato reticulado se mostró eficaz en la reparación de daños en el tejido cardíaco y la eliminación de arritmias cardíacas cuando se aplica localmente en el tejido cardíaco. Khotimchenko Y. et al. desvelaron que el alginato cálcico administrado por vía oral reduce la hepatotoxicidad de CC14 mediada por radicales libres y peroxidación (Mar. Drugs 2004, 2, 108-122). Sorprendentemente, y a diferencia, la presente invención muestra ahora que el biomaterial de alginato como un sólido, hidrogel, líquido (reticulado así como no reticulado) es, de por sí, suficiente para la promoción *in vivo* de la reparación y regeneración de tejido dañado, disminuyendo el daño celular y restaurando las funciones de síntesis del órgano a niveles casi normales. Además, utilizando una solución de alginato no reticulado, la invención demuestra, por primera vez, que la aplicación sistémica, mediante una inyección i.p. conduce a la recuperación de las funciones hepáticas, y por lo tanto es factible para tratar los trastornos asociados al hígado expuestos en la reivindicación 1. La capacidad del hígado para auto-regenerarse le permite superar diversas formas de lesiones [véase Fausto, N. et al. *Hepatology* 43 (2Suppl 1): S45-53 (2006)] La hepatectomía parcial en seres humanos a menudo es necesaria y bien tolerada en el contexto de tumores hepáticos primarios o secundarios [véase Geller, DA et al. *J. Gastrointest Surg* 10 (1): 63 - 8 (2006)] Sin embargo, hay casos en los que la hepatectomía parcial prolongada se justifica debido a la gran masa hepática y plantean un alto riesgo de insuficiencia hepática fulminante [véase Kubota, K. et al. *Hepatology* 26 (5): 1176 - 81 (1997)]. En estos casos, el trasplante de hígado es la única opción para el tratamiento. Para evitar este riesgo, se han utilizado terapias innovadoras tales como la embolización de la vena porta y las resecciones hepáticas por etapas, y se ha demostrado que están asociadas a una morbilidad y mortalidad considerables [véase Madoff, DC et al. *J Vasc Interv Radiol* 16 (6): 779 - 90 (2005); y Earle, SA et al. *Mermelada Coll Surg* 203 (4): 436 - 46 (2006)].

Las soluciones de biomaterial de alginato son candidatos ideales para su uso como implantes para facilitar la restauración y regeneración de tejidos defectuosos o que faltan, ya que pueden inyectarse como una solución de baja viscosidad y solidificarse en el sitio [Landa, N. et al., *Circulation* 117: 1388-1396 (2008)]. No hay necesidad de métodos de curación adicionales, tales como reticulación termosensible o reticulación sensible al pH, fotopolimerización o adición de agentes solidificantes. Debería apreciarse que la mayoría de estos métodos de curación tienen inconvenientes, por ejemplo, los polímeros que curan mediante una fotopolimerización podrían plantear un problema debido a una capacidad limitada para acceder a las pequeñas cavidades con la luz necesaria para iniciar la reticulación.

Adicionalmente, los biomateriales de alginato pueden manipularse mediante la modificación con péptidos de adhesión, tales como RGD, para hacerlos más adhesivos, mejorando así sus interacciones e integración con el hospedador. Por ejemplo, la modificación de alginato con RGD invirtió a este polisacárido de ser inerte para la célula a ser un polisacárido que tenía propiedades que promovían la adhesión celular. Dichas modificaciones pueden interdigitarse mejor con el hospedador [Tsur-Gang, O. et al., *Biomaterials* 30 (2): 189-195 (2009)] Además, los biomateriales pueden diseñarse para permitir el suministro controlado de agentes terapéuticos, tales como factores de crecimiento y citocinas.

En la búsqueda de agentes eficientes para la reparación física y funcional *in vivo* del tejido dañado, preferentemente de un agente utilizado por vía sistémica, los presentes inventores descubrieron inesperadamente que las soluciones acuosas de alginato no reticulado o reticulado con calcio, así como formas sólidas de hidrogeles o esponjas de alginato de calcio, podían facilitar la restauración y regeneración funcional del hígado dañado después de una hepatectomía parcial (HP) extendida (90%) o después de una hepatitis mediada por el sistema inmunitario.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para el tratamiento del daño hepático y disfunción hepática, después de una lesión extendida, que emplea un biomaterial de alginato biocompatible, inyectable por vía sistémica o implantable localmente *in situ* para dar soporte y regenerar el hígado defectuoso.

Otro objeto de la invención es proporcionar métodos que utilizan biomaterial de alginato en el tratamiento de sujetos que padecen una alteración grave de las funciones hepáticas debido a una hepatectomía parcial extendida forzada o a hepatitis B o C crónica.

Estos y otros objetos de la invención se pondrán de manifiesto a medida que avance la descripción.

Sumario de la invención

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de los trastornos hepáticos expuestos en la reivindicación 1, en un sujeto que lo necesite. El método de la invención comprende la etapa de administrar a dicho sujeto, preferentemente, mediante una administración sistémica, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un biomaterial de alginato biocompatible así como cualquiera de sus modificaciones y sus combinaciones.

10 En una realización específica, el método de la invención es aplicable a un sujeto que padece una función hepática alterada, resultante de insuficiencia hepática fulminante, de determinadas enfermedades hepáticas y/o de hepatectomía.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para mantener los niveles de albúmina en suero y/o disminuir los niveles en suero de una cualquiera de ALT y AST, en un sujeto que padece cualquiera de los trastornos hepáticos citados en la reivindicación 1. El método de la invención comprende la etapa de administrar, preferentemente de forma sistémica, a dicho sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un biomaterial de alginato biocompatible, así como cualquiera de sus modificaciones y sus combinaciones.

20 En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para reducir el nivel de apoptosis, en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece cualquiera de los trastornos hepáticos citados en la reivindicación 1. La invención proporciona además un método para aumentar la proliferación celular en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece cualquiera de los trastornos hepáticos citados en la reivindicación 1. El método de la invención comprende la etapa de administrar, preferentemente de una manera sistémica, al sujeto tratado, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un biomaterial de alginato biocompatible, así como cualquiera de sus modificaciones y sus combinaciones.

25 Estos y otros aspectos de la invención se pondrán de manifiesto de la mano de los siguientes ejemplos.

Breve descripción de las figuras

30 Figuras 1A-1B: estructura del alginato  
Las figuras muestran micrográficas de armazones macroporosos de alginato (Fig. 1A) y colágeno (Fig. 1B) al microscopio electrónico de barrido (MEB).

35 Figuras 2A-2B: estructura de alginato modificado  
Micrográficas MEB de cortes transversales de armazones macroporosos preparados a partir de alginato no modificado (Fig. 2A) y modificado con RGD (Fig. 2B), barra = 50 µm.

40 Figura 3: curva de supervivencia de Kaplan-Meier  
Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que compara ratones tratados con armazón de alginato, armazón de colágeno y tratados sin armazón La supervivencia disminuyó significativamente cuando se utilizó colágeno o cuando no se utilizó armazón (orden logarítmico = 0,001). No hubo diferencias significativas en cuanto a supervivencia entre los ratones tratados con armazón de colágeno y los tratados sin armazón. Abreviaturas: Sup. acum. (Supervivencia acumulada); TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), Cont. (control sin armazón).

Figura 4: tejido: el armazón de alginato mejora la estructura del tejido dañado

45 La figura muestra una tinción representativa con hematoxilina y eosina (H&E) de hígado en diversos momentos después de una hepatectomía parcial del 87% obtenida de ratones tratados con colágeno (n = 4), alginato (n = 4) y ratones de control sin armazón (n = 4). Abreviaturas: cont (control, sin armazón), h (horas), D (días).

50 Figuras 5A-5B: cambios en los niveles de ALT y AST en respuesta al tratamiento con armazón de alginato  
Los gráficos representan cambios en los niveles de AST (Fig. 5A) y ALT (Fig. 5B) en ratones sin armazón (control), con armazón de alginato y con armazón de colágeno al cabo de 3, 6, 24 y 48 horas y 6 días después de realizar una hepatectomía del 87% del hígado. Abreviaturas: AST (niveles de AST en suero), ALT (niveles de ALT en suero), cont (control, sin armazón), h (horas), D (días), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial).

55 Figura 6: cambios en los niveles de albúmina en suero en respuesta al tratamiento con armazón de alginato  
El gráfico representa cambios en los niveles de albúmina en suero de ratones tratados sin armazón (control), con armazón de alginato y con armazón de colágeno al cabo de 3, 6, 24 y 48 horas y 6 días después de realizar una hepatectomía del 87% del hígado. Abreviaturas: cont. (control, sin armazón), h (horas), D (días), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial).

60 Figuras 7A-7B: los armazones de alginato conducen a reducir la apoptosis

65 La Fig. 7A muestra una tinción inmunohistoquímica para la caspasa-3 de muestras de tejido hepático obtenidas 24 horas después de realizar una hepatectomía parcial del 87% de ratones tratados con armazón de colágeno, de alginato y sin armazón (control).

La Fig 7B muestra un gráfico que cuantifica la cantidad de células apoptóticas positivas a caspasa-3 en muestras de los tres grupos experimentales obtenidas al cabo de 3, 6, 24 y 48 horas y 6 días después de realizar una hepatectomía extendida. Abreviaturas: cont. (control, sin armazón), h (horas), D (días), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), cé. (células), po. (positivas).

5  
 Figura 8: el armazón de alginato aumenta la proliferación celular  
 El histograma demuestra la cuantificación de células positivas a BrdU en muestras obtenidas al cabo de 3, 6 y 24 horas después de realizar una hepatectomía parcial de 87% de ratones tratados con armazón de colágeno, de alginato y sin armazón (control). Abreviaturas: cont. (control, sin armazón), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), cé (células), po (positivas).

10  
 Figura 9: el armazón de alginato aumenta la activación de STAT3  
 El gráfico muestra un histograma que presenta la relación entre STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) fosforilado/STAT3 total, obtenida por densitometría de inmunotransferencia incubada con anticuerpos anti STAT3 fosforilado y anti STAT3. Abreviaturas: cont. (control, sin armazón), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), fos. (fosforilado), tot. (total).

15  
 Figura 10: los armazones de alginato nanoporoso y macroporoso aumentan la supervivencia de los ratones  
 Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que compara la supervivencia en diferentes momentos (horas) después de realizar una hepatectomía de ratones tratados con armazón de alginato (macroporoso), armazón de alginato nanoporoso, armazón de colágeno o ratones de control sin armazón. Abreviaturas: Sup. acum. (Supervivencia acumulada), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), cont. (control), nano (armazón de alginato nanoporoso), alginato (armazón de alginato macroporoso).

20  
 Figura 11: los armazones de alginato nanoporoso y macroporoso aumentan la supervivencia de los ratones  
 Curva de supervivencia de Kaplan Meier que compara los armazones de alginato nanoporoso con los armazones de alginato macroporoso, que muestra que no hay diferencias en cuanto a la supervivencia entre los dos grupos (orden logarítmico = 0,8). Abreviaturas: Sup. acum. (Supervivencia acumulada), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), cont. (control), nano (armazón de alginato nanoporoso), alginato (armazón de alginato macroporoso).

25  
 Figuras 12A-12B: cambios en los niveles de ALT y AST en respuesta al tratamiento con armazón de alginato decorado con RGD

30  
 Los gráficos representan cambios en los niveles de AST (Fig. 12A) y ALT (Fig. 12B) en ratones tratados sin armazón, con armazón de alginato, con armazón de alginato decorado con RGD y con armazón de colágeno al cabo de 3, 6, 24 y 48 horas y 6 días después de realizar una hepatectomía del 87% del hígado. Abreviaturas: AST (niveles de AST en suero), ALT (niveles de ALT en suero), cont. (control, sin armazón), h (horas), D (días), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial).

35  
 Figura 13: cambios en los niveles de albúmina en suero en respuesta al tratamiento con armazón de alginato-RGD

40  
 El gráfico representa cambios en los niveles de albúmina en suero en ratones tratados sin armazón (control), con armazón de alginato, con armazón decorado con RGD y con armazón de colágeno al cabo de 3, 6, 24 y 48 horas y 6 días después de realizar una hepatectomía del 87% del hígado. Abreviaturas: cont (control, sin armazón), h (horas), D (días), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial).

45  
 Figuras 14A-14C: localización del armazón de alginato en el tejido hepático dañado  
 Tinción con H&E de cortes transversales representativos de tejido hepático de un ratón 24 horas después de realizar HP del 87% con armazón de alginato (Fig. 14A) e inmunohistoquímica para biotina de hígado de ratón con armazón de alginato marcado con biotina 3 horas (Fig. 14B) y 6 horas (Fig. 14C) después de HP.

50  
 Figura 15: el alginato líquido no reticulado aumenta la supervivencia de los ratones  
 Curva de supervivencia de Kaplan Meier que compara la supervivencia de ratones (n = 10) tratados con alginato líquido frente a un control tratado con PBS después de una hepatectomía parcial del 87% que muestra una mejora significativa de la supervivencia en el grupo de ratones tratado con alginato (orden logarítmico = 0,001). Abreviaturas: Sup. acum (Supervivencia acumulada), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), líq. (líquido).

55  
 Figuras 16A-16B: cambios en los niveles de ALT y albúmina en suero en respuesta al tratamiento con alginato líquido

La Fig. 16A muestra niveles de ALT en suero de muestras obtenidas de ratones tratados con alginato líquido no reticulado frente a un control tratado con PBS después de una hepatectomía parcial del 87%. La Fig. 16B muestra niveles de albúmina en suero de ambos grupos experimentales. \* p = 0,000001; \*\* p = 0,000001; \*\*\* p = 0,01. PHx = hepatectomía parcial. Abreviaturas: cont (control), líq. (líquido), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial), h (horas).

60  
 Figuras 17A-17B: cambios en los niveles de ALT y albúmina en suero en hepatitis inducida con ConA tratada con alginato líquido

El efecto del alginato líquido sobre la inducción de la hepatitis mediada por el sistema inmunitario con ConA se evaluó a través de los niveles de ALT en suero 6, 24 y 48 horas después de la administración de conA (Fig. 17A), y de albúmina en suero 48 horas después de la administración de conA (Fig. 17B). El alginato líquido se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) dos horas antes de la administración de ConA. \*p = 0,004; \*\*p = 0,04. Abreviaturas: cont (control), líq (líquido), TDHP (tiempo después de la hepatectomía parcial).

65

## Descripción detallada de la invención

La presente invención demuestra en primer lugar que los biomateriales de alginato tienen un efecto significativo sobre la supervivencia después de insuficiencia hepática aguda debido a hepatectomía extendida del 87 %. Como se muestra mediante los siguientes ejemplos, los ratones tratados con biomateriales de alginato se protegieron de la lesión hepatocelular, la necrosis hepática y la apoptosis y, además, exhibieron una función de síntesis hepática mejorada. La tinción con BrdU sugiere que el biomaterial de alginato mejora la regeneración temprana después de la hepatectomía y que el armazón de alginato marcado con biotina muestra que el biomaterial de alginato invade el parénquima hepático. El uso de armazones de hidrogel de alginato nanoporoso y macroporoso fabricados con alginato no modificado y con alginato modificado con RDG, mostró resultados terapéuticos comparables, sugiriendo que el propio biomaterial de alginato, en lugar del tamaño de poro de la matriz o del estado físico (solución o sólido), juega un papel en su efecto terapéutico. Los niveles de STAT fosforilado indican que estos efectos pueden estar mediados por la cascada de IL6-TNF $\alpha$ -STAT3. Por otra parte, la presente invención muestra además, por primera vez, que el alginato puede aplicarse adicionalmente en el daño relacionado con el sistema inmunitario del tejido hepático, por ejemplo, cuando se utilizó el modelo de hepatitis inducida con ConA.

Debe observarse además que la implantación o inyección, preferentemente una aplicación sistémica, de un armazón o solución de alginato acelular por sí mismo en animales que padecen funciones orgánicas gravemente alteradas, específicamente en hígado, como resultado de daño, eliminación o disfunción tisular, elevaron significativamente su supervivencia, disminuyeron el grado de daño celular y mejoraron las funciones de síntesis a niveles casi normales.

La resección parcial de tejido de un órgano dañado a menudo se justifica y se tolera bien en el contexto de tumores primarios y secundarios, de un funcionamiento gravemente deteriorado o de diversas enfermedades. Sin embargo, en los casos en los que es necesario realizar resección extendida, se plantea un riesgo de disfunción orgánica fulminante que solo puede tratarse con un trasplante de órgano. La escasez de donantes limita el número de pacientes que pueden beneficiarse de dichos procedimientos y la considerable morbilidad y mortalidad asociadas a las últimas terapias innovadoras requieren el descubrimiento de un método de tratamiento alternativo.

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de trastornos hepáticos citados en la reivindicación 1 en un sujeto que lo necesite. Más específicamente, el método de la invención comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones. La cantidad eficaz de la esponja, hidrogel o solución de alginato debería ser suficiente para promover la reparación y regeneración del tejido del órgano dañado.

Debe observarse que la etapa de administración o aplicación puede realizarse por vía local o sistémica. El término "administración" incluye aplicación, implantación, pulverización, vendaje, inyección o introducción en dicho sujeto, o si se aplica por vía local a un tejido hepático del sujeto tratado. De acuerdo con una realización, el método de la invención puede ser específicamente eficaz para reparar y/o regenerar un órgano dañado, específicamente, tejido hepático en un sujeto que lo necesita.

La invención se refiere al uso de alginato biocompatible bioabsorbible en forma de esponjas, hidrogeles o soluciones líquidas, cuya estructura macromolecular o nanomolecular es tal que se degradan y eliminan por completo, y no es tóxica para el tejido del órgano hospedador en el que se implantan, administran, pulverizan, inyectan o introducen.

Debería apreciarse además que en el presente documento los términos "esponja" y "armazón" se utilizan de forma intercambiable. Se debe observar además que estos términos también incluyen las soluciones de alginato e hidrogel de alginato después de su deposición en el tejido diana. Como lo demuestra el derivado de armazón de alginato marcado con biotina presentado en la Figura 14, en una realización preferida, las esponjas de alginato biodegradable se degradan lentamente *in vivo* para proporcionar un soporte artificial que es estable durante un tiempo suficiente para permitir la invasión y proliferación de las células de tejidos y vasos sanguíneos circundantes.

Debe apreciarse que los biomateriales de alginato biocompatibles de la invención se pueden utilizar preferentemente solos como un implante o, como alternativa, como una primera fase de un implante que es estable durante un tiempo suficiente para permitir la vascularización de vasos sanguíneos de tejido circundante. Una vez vascularizado, el implante se vuelve accesible para la segunda fase de inyección en una cantidad suficiente de células de elección (por ejemplo, hepatocitos) cultivadas *in vitro* u obtenidas del hospedador, o de un donante adecuado, pudiendo dichas células aclimatarse y proliferar rápidamente en la esponja vascularizada para reemplazar rápidamente el tejido dañado.

Como se usa en el presente documento, el término "implantación" se refiere a la inserción de una esponja, armazón de alginato, o de cualquiera de sus modificaciones, en un paciente que lo necesite, como resultado de daño, eliminación o disfunción tisular. Como se muestra en el Ejemplo 5, cuando se utiliza la solución de alginato líquido, la administración del alginato puede ser aplicando, específicamente, pulverizando el alginato líquido sobre el tejido dañado. Como alternativa, como se muestra en el Ejemplo 6, el alginato líquido se puede administrar mediante

inyección, más específicamente, inyección i. p. al sujeto tratado. Debe apreciarse que este ejemplo demuestra la viabilidad de la aplicación sistémica del biomaterial de alginato para tratar trastornos hepáticos.

Aunque se prefiere la inyección i.p. (intraperitoneal), debe observarse que la etapa de administración puede incluir administración intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intranasal, mucosa, tópica o subcutánea, o cualquiera de sus combinaciones. Debe observarse además que la solución de alginato líquido puede administrarse mediante inyección (con una jeringa y una aguja), cateterismo (a través de catéteres o derivaciones) o cualquier sistema de suministro hepático percutáneo adecuado que incluya un dispositivo de suministro hepático con un alambre guía, incluyendo cartografiado electromecánico o catéteres guiados por MRI, y cualquier otro método y medios adecuados para la administración de un fluido en cualquier parte del cuerpo de un sujeto que lo necesite, particularmente métodos no quirúrgicos. Por lo tanto, la solución de alginato de la invención puede administrarse a un sujeto que lo necesite por cualquiera de los medios detallados anteriormente en este documento.

Dicha inserción o aplicación requiere que las células y los vasos sanguíneos de tejidos circundantes se pongan en contacto con el biomaterial de alginato biocompatible, colocando una cantidad suficiente de esponjas hidrogeles o soluciones de alginato (no reticulado o reticulado) por vía sistémica o local, en lechos favorables de órganos y tejidos para injerto ya sea adhiriendo o suturando, utilizando adhesivos naturales o sintéticos hipoalergénicos, no tóxicos, suturas bioabsorbibles, pulverizando una composición líquida o inyectando composiciones inyectables de soluciones poliméricas capaces de autoensamblarse *in vivo* en el almacén o hidrogel de alginato.

De acuerdo con una realización, el biomaterial de alginato utilizado por el método de la invención puede estar en forma de uno cualquiera de solución de alginato, hidrogel de alginato, esponja de alginato sólido o cualquiera de sus combinaciones.

Según una realización, el biomaterial de alginato utilizado por la invención puede ser un polisacárido de alginato caracterizado por tener al menos uno de: (a) un contenido de residuo de ácido manurónico (M) en el intervalo de aproximadamente 0% y aproximadamente 100% del total de residuos, entre aproximadamente 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, preferentemente entre aproximadamente 25 % a 65%; (b) un contenido de residuo de ácido gularónico (G) en el intervalo de entre aproximadamente 0% y aproximadamente 100% del total de residuos, entre aproximadamente 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, preferentemente entre aproximadamente 35% a 75%; y (c) un peso molecular entre aproximadamente 1000 a 300.000 Dalton, preferentemente, entre aproximadamente 1.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 150.000, 200.000, 250.000, 300.000 Dalton. De acuerdo con una realización particular, la solución de alginato líquido inyectable se puede caracterizar por tener un peso molecular de entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 50,000 Dalton. En otra realización, para el hidrogel o las esponjas, el intervalo de peso molecular preferido es de 5.000 a 100.000 Dalton.

En una realización preferida, el alginato utilizado por el método de la invención puede derivar de algas pardas seleccionadas del grupo que consiste en alginato MVG™ (MVG) derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato LVG™ derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato VLVG™ derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato MVM™ derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato LVM™ derivado de *Laminaria hyperborea* y alginatos derivados de *Macrocystis pyrifera*.

El alginato de la presente invención se puede utilizar en forma de una solución inicial, preparada disolviendo en condiciones homogéneas, una forma comercialmente disponible de polvo de alginato en un disolvente o disolvente tampón adecuado, preferentemente agua, produciendo una solución de sal del alginato. En caso de utilizar un almacén de alginato, esta solución inicial se gelifica después para formar el hidrogel húmedo o se liofiliza para formar la esponja. Esta solución sometida a gelificación se denomina solución final de alginato.

De acuerdo con una realización adicional, la solución de alginato, el hidrogel de alginato o la esponja de alginato sólido utilizados por el método de la invención, puede comprender además un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en las sales de calcio, estroncio o bario. En una realización más preferida, la esponja, el hidrogel o la solución líquida de alginato utilizados por el método de invención, puede comprender un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), cloruro de estroncio (SrCl<sub>2</sub>) y gluconato de calcio (Ca-Gl).

El reticulante utilizado en la esponja de alginato que se utiliza en el método de la invención, está preferentemente en forma de una solución reticulante que tiene una concentración de reticulante suficiente para proporcionar una concentración reticulante entre aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,5 % p/v en la solución final de la cual se obtiene la esponja o el alginato líquido.

Debe apreciarse que la esponja, hidrogel o solución líquida de alginato utilizados por el método de la invención se puede preparar a partir de una solución de alginato con o sin la adición de un agente reticulante.

En una realización, el biomaterial de alginato utilizado puede ser uno cualquiera de una esponja de alginato sólido o un hidrogel de alginato. De acuerdo con esta realización, el alginato se puede caracterizar por tener al menos uno de: (a) un diámetro en el intervalo entre 0,1 mm a 100 mm, preferentemente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mm; (b) un tamaño de poro promedio en el intervalo de 1 nm a 30.000 nm o 300  $\mu\text{m}$ , específicamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 20.000 o 30.000 nm o 300  $\mu\text{m}$ ; (c) un volumen de entre aproximadamente 0,001 a 0,1  $\text{cm}^3$ , específicamente, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 o 0,1  $\text{cm}^3$ ; y (d) una porosidad en el intervalo de 10% a 99%, específicamente, de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%.

El almacén de alginato se preparó a partir de la solución de alginato con o sin la adición de un reticulante. Las soluciones finales pueden tener concentraciones de alginato o de alginato y reticulante en los intervalos de LVG o MVG 1% p/v sin reticulante a LVG o MVG 1% p/v y Ca-GI 1% p/v; LVG o MVG 1% p/v y Ca-GI 0,2% p/v; LVG o VG 1% p/v y  $\text{SrCl}_2$  0,15% p/v; o MVG 1% p/v y  $\text{CaCl}_2$  0,1% p/v. Debería apreciarse que puede utilizarse cualquiera de los alginatos descritos más adelante.

De acuerdo con una realización específica, el alginato utilizado por el método de la invención es un alginato reticulado con un porcentaje de ácido D-glucónico (sal hemicálcica) de entre aproximadamente 0,18 a 0,22%, específicamente, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21 o preferentemente, 0,22% (p/v). En la presente invención, dicho alginato se denomina alginato macroporoso. Más específicamente, dicho alginato puede caracterizarse adicionalmente por tener al menos uno de: un diámetro de 5 mm, un volumen de 0,04  $\text{cm}^3$ , un tamaño de poro en el intervalo de 1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ; un espesor de al menos 0,5 mm y una porosidad de al menos 20%, más específicamente, una porosidad de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99%. De acuerdo con una realización específicamente preferida, el almacén de alginato utilizado por el método de la invención tiene un diámetro de 5 mm; un volumen de 0,04  $\text{cm}^3$ , un tamaño de poro en el intervalo de 50  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ; un espesor de 2 mm; y una porosidad de 90%. Debe apreciarse que, en la presente invención, dicho alginato se denomina alginato macroporoso.

De acuerdo con otra realización específica, el alginato utilizado por el método de la invención es un alginato reticulado con  $\text{CaCl}_2$  0,05 M. En la presente invención dicho alginato se denomina alginato nanoporoso, o hidrogel de alginato. Más específicamente, dicho alginato se puede caracterizar adicionalmente por tener al menos uno de: un tamaño de poro en el intervalo de 1 nm a 1000 nm; un espesor de 0,5 mm y una porosidad de 20%, más específicamente, una porosidad de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99%.

En las realizaciones en las que se utilizan esponjas o armazones de alginato, mediante el método de la invención, estos son de naturaleza altamente porosa, que pueden ser fácilmente invadidos por células y/o vasos sanguíneos. La morfología y las propiedades mecánicas de las esponjas permiten una estructura de poro continua con una distribución de tamaño de poro homogénea e interconexiones óptimas entre los poros.

Las esponjas de alginato utilizadas por el método de la invención pueden tener diversas formas y tamaños, por ejemplo, formas cúbicas, esféricas y cilíndricas.

De acuerdo con una realización preferida alternativa, el alginato utilizado por los métodos de la invención puede estar en una forma líquida soluble. Dicho biomaterial de alginato líquido puede estar reticulado o no reticulado.

En una realización específica, la solución de alginato utilizada puede estar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 4% (p/v) de solución de alginato de sodio, específicamente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0 o 4%, que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 a 50.000 Dalton, específicamente, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000 o 50.000 Dalton. La solución de alginato puede estar reticulada con una solución de gluconato de calcio (ácido D-glucónico, sal hemicálcica) de entre aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,5% (p/v), específicamente, y una solución de gluconato de calcio al 0,18, 0,19, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5% (p/v).

En otra realización alternativa más, el alginato utilizado por el método de la invención puede ser una solución de alginato no reticulado. Más específicamente, dicha solución puede comprender solución de alginato de sodio entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5% (p/v), específicamente, una solución de alginato de sodio de uno cualquiera de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3 o 5% (p/v). La solución de alginato no reticulado de la invención se puede caracterizar por tener al menos uno de: un peso molecular de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 300, específicamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 300 kDa y una relación G/M de entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4, específicamente, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3 o 4.

De acuerdo con esta realización particular, cualquiera de los biomateriales de alginato utilizados por el método de la invención puede modificarse o decorarse para mejorar sus propiedades de unión a células y a proteínas, preferentemente uniendo al menos uno de un péptido promotor de adhesión celular y un grupo sulfato. Debe apreciarse que puede utilizarse cualquier péptido que promueva la adhesión, por ejemplo, un péptido RGD. De



acuerdo con una realización específica, el alginato utilizado por el método de la invención puede ser particularmente un almacén de alginato macroporoso unido al péptido RGD, o decorado con el mismo, como se indica por la SEQ ID NO 1. Dicho alginato modificado se describe en el Ejemplo 4. En otra realización más, el hidrogel de alginato puede decorarse con el péptido RGD. Incluso además, el método de la invención puede utilizar una solución de alginato líquido, reticulado o no reticulado, modificado, decorado con péptido RGD de SEQ ID NO 1. Debe observarse además que la adición de un grupo sulfato para mejorar la unión a las proteínas, está bien descrita por parte de los presentes inventores [véase la referencia: Freeman, I. et al., *Biomaterials*, 29 (22): 3260-3268 (2008); Cohen, S. et al., solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/649.844, una CIP de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 11/374.279 (2007)].

Como se indica en los Ejemplos 5 y 6, se utilizaron 200 µl de solución de alginato líquido no ligado. Se debe apreciar además que estas cantidades preferidas de ingredientes activos utilizados por la presente invención son específicas para un tejido y órgano dañado específico, es decir, el hígado. Utilizando ensayos experimentales, el médico tratante debe determinar las concentraciones apropiadas para cualquier otro tejido u órgano.

Los ensayos experimentales pueden incluir experimentos *in vitro* e *in vivo*, basándose en el uso de modelos animales, como se presenta en la invención.

Se pueden utilizar diversos factores de crecimiento como agentes adicionales mediante el método de la invención, por ejemplo, factores estimuladores de la angiogénesis y factores potenciadores de la revascularización.

Por tanto, en una realización adicional, los biomateriales de alginato utilizados por el método de la invención comprenden opcionalmente al menos un factor angiogénico seleccionado del grupo que consiste en: angiopoyetinas, metaloproteinasa (MMP), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligando 4 de tipo delta (DII4), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Estos factores de crecimiento y factores angiogénicos se pueden encapsular en micropartículas o nanopartículas biodegradables que permiten la liberación lenta o la liberación controlada y se pueden incorporar en el almacén de esponja de alginato. Como alternativa, estos factores de crecimiento y angiogénicos se pueden insertar mediante conjugación con sulfato de alginato como se describió anteriormente [Freeman, I. et al., *Biomaterials*, 29 (22): 3260 - 3268 (2008); Cohen, S. et al., solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/649.844, una CIP de la solicitud de patente de Estados Unidos N°. 11/374.279 (2007)].

En otro aspecto, la invención proporciona un método para mantener los niveles de albúmina en suero y/o disminuir los niveles de uno cualquiera de los niveles de ALT y AST en suero, en un sujeto que padece un trastorno hepático, como se especifica en la reivindicación 1. El método de la invención comprende la etapa de administrar, preferentemente de forma sistémica, a dicho sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones.

Debe indicarse que tal como se usa en la presente memoria, mantener los niveles de albúmina, significa mantener o conservar los niveles normales de albúmina que son niveles comparables a los de controles no enfermos o sanos. Disminuir los niveles ALT o AST significa reducir los niveles de ALT o AST aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces, en comparación con un control apropiado no tratado. Como alternativa, la reducción en los niveles de ALT o AST puede ser una reducción de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso de al menos 99 o 100 %, en comparación con los niveles de controles apropiados.

En otro aspecto más, el método de la invención es para reducir el nivel de apoptosis, en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece un trastorno hepático, como se especifica en la reivindicación 1. La invención proporciona además un método para aumentar la proliferación celular en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece un trastorno hepático. El método de la invención comprende la etapa de administrar, preferentemente de manera sistémica, al sujeto tratado, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones.

Debe apreciarse que la reducción del nivel de apoptosis puede ser una reducción de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso de al menos 99 o 100 %, en comparación con los niveles de controles apropiados. La elevación de la proliferación celular puede ser de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso de al menos 99 o 100% en comparación con los niveles de controles apropiados.

De acuerdo con una realización específicamente preferida, cualquiera de los métodos de la invención puede ser específicamente adecuado para el tratamiento de un sujeto mamífero. Un "mamífero", para los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, los animales de investigación, los animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, animales utilizados para el deporte o animales de

compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. En una realización particular, dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.

5 De acuerdo con otra realización específica, los métodos de la invención se pueden aplicar a un sujeto que padece una función hepática alterada resultante de insuficiencia hepática fulminante, enfermedad hepática como se expone en la reivindicación 1 y/o hepatectomía.

10 Como se usa en el presente documento, el término "fulminante" se refiere a cualquier suceso o proceso que se produce de repente, rápidamente y que es intenso y grave hasta el punto de letalidad. Una "enfermedad" es cualquier afección anómala del cuerpo o la mente que causa incomodidad, disfunción o malestar a la persona afectada o a las personas que están en contacto con ella. A veces, el término se utiliza en general para incluir lesiones, discapacidades, síndromes, síntomas, comportamientos anormales y variaciones atípicas de la estructura y la función, mientras que en otros contextos se pueden considerar categorías distinguibles. Debe observarse que en el presente documento los términos "enfermedad", "trastorno", "afección" y "dolencia" se utilizan indistintamente.

15 La "insuficiencia hepática fulminante" (IHF) normalmente se define como la alteración grave de las funciones hepáticas en ausencia de enfermedad hepática preexistente. Esta forma de insuficiencia hepática puede provocar el desarrollo de encefalopatía hepática (confusión, estupor y coma) y una disminución de la producción de proteínas (tales como albúmina y proteínas de coagulación sanguínea) al cabo de cuatro semanas de los primeros síntomas (tales como ictericia) de un problema hepático.

En otro aspecto más, la invención proporciona al menos un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones, para su uso en el tratamiento de trastornos hepáticos.

25 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona adicionalmente derivados de alginato. Más específicamente, de acuerdo con una realización particular, la invención se refiere a un armazón de alginato macroporoso unido al péptido RGD, o decorado con el mismo, como se indica por la SEQ ID NO 1. Dicho alginato modificado se describe en el Ejemplo 4.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende los derivados de alginato o el alginato líquido no reticulado de la invención.

De acuerdo con una realización específica, el uso de la invención puede ser específicamente eficaz para reparar y/o regenerar tejido dañado en un hígado de un sujeto que padece un trastorno hepático.

35 De acuerdo con una realización, el biomaterial de alginato utilizado por la invención puede ser un polisacárido de alginato caracterizado por tener al menos uno de: (a) un contenido de residuo de ácido manurónico (M) en el intervalo de aproximadamente 0% y aproximadamente 100% del total de residuos, entre aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, preferentemente entre aproximadamente 25% a 65%; (b) un contenido de residuo de ácido gulurónico (G) en el intervalo de entre aproximadamente 0% y aproximadamente 100% del total de residuos, entre aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, preferentemente entre aproximadamente 35% a 75%; y (c) un peso molecular entre aproximadamente 1.000 a 300.000 Dalton, preferentemente, entre aproximadamente 1.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 150.000, 200.000, 250.000, 300.000 Dalton. Para la solución de alginato líquido inyectable, el peso molecular preferido puede variar entre aproximadamente 1.000 a aproximadamente por debajo de 50.000 Dalton. El hidrogel o las esponjas se pueden caracterizar preferentemente por tener un peso molecular que varía entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 100.000 Dalton.

50 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un alginato derivado de algas pardas marinas seleccionado del grupo que consiste en alginato MVG™ (MVG) derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato LVG™ derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato VLVG™ derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato MVM™ derivado de *Laminaria hyperborea*, alginato LVM™ derivado de *Laminaria hyperborea* y alginatos derivados de *Macrocystis pyrifera*.

55 De acuerdo con una realización, el alginato utilizado por la invención puede estar en forma de uno cualquiera de solución de alginato, hidrogel de alginato y esponja de alginato sólido.

60 De acuerdo con una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de solución de alginato reticulado, hidrogel de alginato o esponja de alginato sólido. De acuerdo con esta realización, dicho alginato puede comprender además un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en las sales de calcio, estroncio o bario. En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de un alginato que comprende un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), cloruro de estroncio (SrCl<sub>2</sub>) y gluconato de calcio (Ca-Gl).

65

5 En otra realización más, el uso según la invención puede ser uno cualquiera de una esponja de alginato sólido o hidrogel de alginato caracterizado por tener al menos uno de: (a) un diámetro en el intervalo entre 0,1 mm a 100 mm; (b) un tamaño promedio de poro en el intervalo entre 1 nm y 300  $\mu\text{m}$ ; (c) volumen de entre aproximadamente 0,001 a 0,1  $\text{cm}^3$ ; y (d) una porosidad en el intervalo de 10% a 99%. Específicamente, como se describe anteriormente en el presente documento.

10 De acuerdo con una realización específica, el alginato utilizado por la invención es un alginato reticulado con entre aproximadamente 0,18 a 0,22 %, específicamente, 0,22 % (p/v) de ácido D-glucónico (sal hemicálcica). El alginato resultante se denomina en la presente invención alginato macroporoso. Más específicamente, dicho alginato puede caracterizarse adicionalmente por tener al menos uno de: un diámetro de 5 mm, un volumen de 0,04  $\text{cm}^3$ , un tamaño de poro en el intervalo de 1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ; un espesor de al menos 0,5 mm; y una porosidad de al menos 20%, preferentemente, como se describe en el presente documento anteriormente.

15 De acuerdo con otra realización específica, el alginato utilizado por la invención es un alginato de hidrogel reticulado con  $\text{CaCl}_2$  0,05 M. En la presente invención dicho alginato se denomina alginato nanoporoso. Más específicamente, dicho alginato se puede caracterizar adicionalmente por tener al menos uno de: un tamaño de poro en el intervalo de 1 nm a 1000 nm; un espesor de 0,5 mm; y una porosidad de 20 %.

20 En otra realización adicional preferida, la presente invención se refiere al uso de una esponja o hidrogel de alginato con una estructura de poros continua.

De acuerdo con una realización alternativa preferida, el alginato utilizado por la invención puede estar en forma líquida soluble. Dicho biomaterial de alginato líquido puede estar reticulado o no reticulado.

25 En una realización específica, la solución utilizada de alginato reticulado puede estar entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4% (p/v) de solución de alginato de sodio, específicamente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 1,0, 2,0, 3,0 o 4 %, que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 a 50.000 Dalton, específicamente, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, o 50.000 Dalton. La solución de alginato puede reticularse con entre aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,5 % (p/v) de solución de gluconato de calcio (ácido D-glucónico, sal hemicálcica), específicamente, uno de 0,18, 0,19, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 % (p/v) de solución de gluconato de calcio.

35 En otra realización alternativa más, el alginato utilizado por la invención puede ser una solución de alginato no reticulado. Más específicamente, dicha solución puede comprender entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 % (p / v) de solución de alginato de sodio, específicamente, uno cualquiera de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, o 5 % (p/v) de solución de alginato de sodio. La solución de alginato no reticulado de la invención puede caracterizarse por tener al menos uno de: un peso molecular de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 300, específicamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, , 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 300 kDa y una relación G/M de entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4, específicamente, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3 o 4.

40 De acuerdo con esta realización particular, cualquiera de los biomateriales de alginatos utilizados por la invención puede modificarse o decorarse para mejorar sus propiedades de unión con células y proteínas, preferentemente uniendo al menos uno de un péptido promotor de adhesión celular y un grupo sulfato. Debe apreciarse que puede utilizarse cualquier péptido que promueva la adhesión, por ejemplo, un péptido RGD. De acuerdo con una realización específica, el alginato utilizado por el método de la invención puede ser particularmente un armazón de alginato macroporoso unido al péptido RGD, o decorado con el mismo, como se indica por la SEQ ID NO 1. Dicho alginato modificado se describe en el Ejemplo 4. En otra realización más, el alginato de hidrogel puede decorarse con el péptido RGD. Aún más, el método de la invención puede utilizar una solución de alginato líquido reticulado o no entrecruzado modificado, decorado con péptido RGD de SEQ ID NO 1. Debe observarse además que la adición de un grupo sulfato para mejorar la unión con proteínas, está bien descrita por parte de los presentes inventores [véase la referencia: Freeman, I. et al., Biomaterials, 29 (22): 3260-3268 (2008); Cohen, S. et al., solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/649.844, CIP de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 11/374,279].

55 Opcionalmente, el armazón de alginato utilizado por el método de la invención comprende al menos un factor angiogénico seleccionado del grupo que consiste en: angiopoyetinas, metaloproteinasas (MMP), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF ligando 4 de tipo delta (DII4), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

60 De acuerdo con una realización particularmente preferida, el método de la invención es específicamente adecuado para el tratamiento de un sujeto mamífero. En una realización particular, dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.

65 En una realización, la presente invención se refiere al uso de la esponja, del hidrogel o de la solución de alginato en un sujeto que padece un aspecto de la función hepática alterada resultante de insuficiencia hepática, enfermedad hepática y/o hepatectomía.

En otra realización de este aspecto, la presente invención se refiere al uso de la esponja, del hidrogel o de soluciones de alginato en la reparación de daños resultantes de enfermedades hepáticas malignas, tales como tumores hepáticos primarios y secundarios (incluido el hepatocarcinoma celular también denominado hepatoma, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma del hígado, sarcoma de células de Kupper y metástasis malignas de otros tumores), así como de enfermedades hepáticas crónicas tales como cirrosis del hígado, hepatopatía alcohólica, hepatitis C crónica, hepatitis B crónica, enfermedad del hígado graso, hepatitis autoinmunitaria, hipertensión portal, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, sarcoidosis, atresia biliar y síndrome de Zellweger.

"Tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico. Las personas que necesitan tratamiento son sujetos mamíferos que padecen función orgánica alterada como resultado de daño tisular, eliminación o disfunción. Por "paciente" o "sujeto necesitado" se entiende cualquier mamífero en el que esté garantizada la implantación del armazón de alginato, para promover la reparación y regeneración del tejido del órgano dañado.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones, para la preparación de una composición farmacéutica para mantener los niveles normales de albúmina en suero, en un sujeto que padece un trastorno hepático, como se expone en la reivindicación 9. La invención proporciona además el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones, para la preparación de una composición farmacéutica para disminuir los niveles de uno cualquiera de los niveles de ALT y AST en un sujeto que padece un trastorno hepático, como se expone en la reivindicación 10.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones, para la preparación de una composición farmacéutica para reducir el nivel de apoptosis en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece trastorno hepático, como se expone en la reivindicación 11. La invención se refiere además al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un biomaterial de alginato biocompatible, cualquiera de sus modificaciones y combinaciones, para la preparación de una composición farmacéutica para aumentar la proliferación celular en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece trastorno hepático, como se expone en la reivindicación 11. De acuerdo con una realización preferida, la composición de la invención se puede administrar por vía sistémica o local. Debe observarse que se prefiere una administración sistémica.

Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" significan una cantidad necesaria para lograr un resultado seleccionado. La "cantidad eficaz de tratamiento" está determinada por la gravedad de la enfermedad junto con los objetivos preventivos o terapéuticos, la vía de administración y el estado general del paciente (edad, sexo, peso y otras cuestiones conocidas por el médico tratante). Aunque el método de la invención está destinado particularmente para el tratamiento de trastornos hepáticos en mamíferos, particularmente seres humanos, también se incluyen otros mamíferos. Como ejemplos no limitantes, los sujetos mamíferos incluyen monos, equinos, ganado, caninos, felinos, roedores tales como ratones y ratas, y cerdos. Debe apreciarse que la cantidad eficaz puede definirse también de acuerdo con el tamaño y la naturaleza del animal tratado.

Se debe observar además que para el método de tratamiento proporcionado en la presente invención, dicha cantidad, o dosificación, terapéutica eficaz, depende de la gravedad y de la capacidad de respuesta de la patología que se vaya a tratar, con el transcurso del tratamiento que dura de varios días a varias semanas, o hasta que se realice una curación o se logre una disminución de la patología. Los regímenes de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente. Los expertos habituales en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. En general, la dosificación se calcula de acuerdo con el peso corporal, y puede administrarse una vez o más al día, semanal o mensualmente. Los expertos habituales en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación en función de los tiempos de residencia medidos y de las concentraciones de la composición combinada de la invención en fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento satisfactorio, puede ser opcional hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia de la patología, en donde la composición combinada de la invención se administra en dosis de mantenimiento, una vez o más al día.

De acuerdo con un ejemplo no limitante, la cantidad eficaz de biomaterial de alginato puede variar entre aproximadamente 1 ng a 100 g. Preferentemente, entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g, más preferentemente, de 1 mg a 100 mg.

El Ejemplo 6 presenta claramente, utilizando el modelo de hepatitis inducida por ConA, la aplicabilidad del alginato no reticulado líquido, inyectado por vía i.p. en el tratamiento de la hepatitis mediada por el sistema inmunitario. La posibilidad de aplicar por vía sistémica la solución de alginato demuestra por primera vez en el presente documento, la viabilidad de utilizar alginato para tratar cualquier daño hepático que pueda causar cualquier agente inmunitario vírico o químico. Por ejemplo, el tratamiento del daño hepático causado por el uso de analgésicos, tales como el paracetamol (Tylenol, por ejemplo). También se desvela un kit que comprende un polímero de alginato adecuado, un disolvente tampón adecuado, opcionalmente un agente reticulante, preferentemente Ca-GI, medios para implantar

en el tejido del órgano una esponja, un hidrogel o una solución de alginato (ya sea no reticulado o reticulado) preparado del anterior y un manual con instrucciones sobre cómo preparar el armazón de alginato e instrucciones de uso.

5 Desvelada y descrita, debe entenderse que esta invención no se limita a los ejemplos, etapas de métodos y composiciones particulares descritas en la presente memoria, ya que dichas etapas de métodos y composiciones pueden variar algo. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria se utiliza solo con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

10 Debe observarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno(a)" y "el/la", incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

15 A lo largo de esta memoria descriptiva y en los siguientes ejemplos y reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

20 Los siguientes ejemplos son representativos de las técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo aspectos de la presente invención.

### **Ejemplos**

#### 25 Procedimientos experimentales

##### *Animales y procedimientos quirúrgicos*

30 En todos los experimentos se utilizaron ratones macho C57BL/6, con un peso de 25-28 g., y se mantuvieron en una sala con temperatura controlada alternando ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Una hepatectomía de dos tercios convencional consistía en la extirpación de los lóbulos lateral izquierdo, izquierdo central y derecho central. Para emplear una hepatectomía del 87%, los inventores resecaron además el lateral, el lóbulo cuadrado y el proceso piriforme del hígado, reservando solo el lóbulo caudado. Este procedimiento proporciona un modelo para la insuficiencia hepática aguda. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Hospital Universitario Hadassah. Los animales recibieron asistencia humanizada de acuerdo con los criterios descritos en la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*.

##### *Preparación del armazón macroporoso*

40 Se utilizaron armazones macroporosos de alginato y colágeno con estructuras porosas similares (porosidad del 90 %, tamaño de poro de 50-100  $\mu\text{m}$ , volumen de 0,04  $\text{cm}^3$  (Figura. 1). Los armazones de alginato (Figura 1A) se prepararon a partir de una solución de alginato de sodio al 1 % (p/v) (LVG (100 kDa), 65% de contenido de G, NovaMatrix, FMC Biopolymer, Drammen, Noruega) reticulado con ácido D-glucónico al 0,22 % (p/v) (sal hemicálcica) mediante una técnica de liofilización [véase Shapiro, L. y Cohen, S. *Biomaterials* 18 (8): 583 - 90 (1997)]. Se prepararon armazones de colágeno de piel de ternero (Figura 1B) a partir de una solución de colágeno al 1 % (p/v) en ácido acético al 0,2% (v / v) y después se liofilizó en condiciones utilizadas para preparar armazones de alginato. Los armazones de colágeno se sometieron adicionalmente a reticulación UV para mejorar la estabilidad.

50 La estructura interna de los armazones se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB, Joel JSM-35CF, Tokio, Japón) después de recubrir secciones finas del armazón con oro de 100 Å, utilizando un aparato de recubrimiento E5100 polar.

Para detectar los armazones dentro del hígado, se prepararon armazones macroporosos de alginato marcados con biotina con porosidad similar como se describió anteriormente.

##### *55 Modificación de alginato con RGD*

60 El péptido GGGGRGDY (BioSight, Karmiel, Israel) también representado por SEQ ID NO 1, se unió por enlace covalente a polisacárido de alginato (LVG, 100 kDa, 65% de contenido de G, NovaMatrix FMC Biopolymers, Drammen, Noruega) mediante química de carbodiimida [Rowley, JA et al *J. Biomed Mater Res* 60: 217 - 223 (2002)] para producir una tasa de modificación del 0,2 % de monómeros de ácido urónico por las secuencias peptídicas. El armazón macroporoso de RGD-alginato se preparó como se describió anteriormente.

*Efecto de la decoración de alginato con péptido sobre la porosidad del armazón fabricado a partir de este biomaterial*

El proceso de formación del armazón de alginato [Shapiro, L. y Cohen, S. Biomaterials 18: 583-590 (1997)] comprende la reticulación de alginato mediante reticulantes bivalentes, por ejemplo, gluconato de calcio, congelando el alginato reticulado y liofilizando para producir un armazón esponjoso. La reticulación iónica es importante para mantener la estabilidad del armazón en el medio de cultivo, mientras que el proceso de congelación afecta al tamaño de los poros y a la arquitectura. Es importante abordar la estabilidad y la morfología interna del armazón ya que la modificación masiva del alginato se realiza mediante la unión covalente del péptido con el grupo carboxilo en alginato y, como se mencionó anteriormente, el grupo carboxilo participa en la reticulación de alginato durante la formación del armazón.

La evaluación de la arquitectura y de la morfología interna del armazón se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). El alginato y el armazón de alginato decorado con RGD mantuvieron una alta porosidad con un intervalo similar de tamaños de poro (55-120 µm de diámetro, Figura 2). La estabilidad del armazón modificado se ensayó en medio de cultivo, a 37 °C, mientras se mezclaba o en un biorreactor. Mediante inspección visual, la forma y el tamaño del armazón no cambiaron durante al menos 3 semanas.

*Preparación de hidrogel de alginato (estructura nanoporosa)*

El hidrogel de alginato se preparó a partir de alginato al 1 % (p/v) (LVG, 150 kDa, 65% de contenido de G, NovaMatrix, FMC Biopolymer, Drammen, Noruega) y se reticuló con cloruro de calcio 0,05 M. Esto da como resultado la formación de hidrogel de alginato con un tamaño de poro en el intervalo de 1 nm a 1000 nm; un espesor de 0,5 mm; y una porosidad del 20%.

*Preparación de la solución de alginato de sodio no reticulado*

Las muestras de alginato de sodio (con un Pm que varía de aproximadamente 15 a 160 kDa; y una proporción G/M de 2,1) se adquirieron en FMC Biopolymers, Drammen, Noruega. Se prepararon muestras de alginato de peso molecular más pequeño mediante radiación gamma como se describe en el documento [WO / 2008/098109]. Para la preparación de soluciones no reticuladas: las muestras de alginato de sodio se disolvieron en agua bidestilada (DDW) a una concentración final de 1 % (p/v). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h para una disolución completa del alginato.

*Preparación de la solución de alginato reticulado*

Para la preparación de soluciones reticuladas de calcio: las muestras de alginato de sodio se disolvieron en agua bidestilada (DDW) a una concentración final de 2% (p/v) y después se mezclaron con solución de gluconato de calcio al 2 % (p/v) (ácido D-gluónico, sal hemicálcica, Sigma). La composición final preferida es alginato al 1 % (p/v) y gluconato cálcico al 0,3 %. Las mezclas se homogeneizaron utilizando el homogeneizador Heidolph DIAx 900 equipado con un cabezal 10 G, que funcionaba a 26.000 rpm durante aproximadamente 2 minutos. Después de la homogeneización, las preparaciones se enfriaron a aproximadamente 4-8 °C hasta su uso.

*Tinción de H&E*

Para evaluar la lesión hepática de tejido hepático fijado en formol e incluido en parafina se utilizó tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

*Tinción inmunohistoquímica de BrdU y caspasa-3*

Las secciones de tejido hepático fijado con formalina e incluido en parafina se tiñeron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU o anticuerpo de ratón suscitado contra caspasa-3 escindida activada.

La incorporación de BrdU se determinó contando los núcleos de los hepatocitos teñidos positivamente en tres a seis campos de microscopio de baja potencia (10x), y se calculó la media.

El marcaje con caspasa-3 activada se evaluó contando las células apoptóticas en diez campos de microscopio de baja potencia (40x).

*Análisis de inmunotransferencia*

Para el análisis de lisados tisulares completos, se homogeneizaron trozos de hígado congelados instantáneamente en 0,75 ml de PBS helado y después se centrifugaron a 4 °C durante cinco minutos a 2.000 rpm. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se lisaron con beta glicerofosfato 50 mM, EGTA 1,5 mM, pH 7,3, EDTA 1 mM, pH 7,3, DTT 1 mM, vanadato de sodio 0,1 mM, NP-40 al 1 % y cócteles de proteasa y fosfatasa (Sigma) y después se dejó en hielo durante 10 min. Los lisados se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 14.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios. Cantidades equivalentes de lisados (15 µg/carril), determinadas mediante el ensayo de

Bradford (Bio-Rad, Rehovot, Israel), se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

#### *Enzimas hepáticas y albúmina*

Se obtuvieron sueros de ratones individuales. Los niveles en suero de AST, ALT y albúmina se midieron con un analizador automático.

#### *Análisis estadístico*

Los datos cuantitativos se expresaron como media  $\pm$  ETM (error típico de la media). Si las desviaciones típicas (DT) eran iguales dentro de las poblaciones, se utiliza la prueba bilateral de la t de Student para comparar los grupos de tratamiento. Se realizó la curva de supervivencia de Kaplan-Meier para evaluar la supervivencia y la prueba de orden logarítmico para calcular la significación estadística. Los valores de  $p$  inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

#### Grupos experimentales

Se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos. En un primer conjunto, se examinó la viabilidad de un almacén de alginato macroporoso para mejorar la reconstrucción hepática después de hepatectomía parcial (HP) y se comparó con un almacén de colágeno macroporoso. Como se muestra en las Figuras 1A y 1B ambos almacenes de alginato y colágeno tenían una estructura porosa similar (Figuras 1A y 1B, respectivamente), y difieren por su naturaleza química. El almacén de colágeno se utiliza con frecuencia en cirugías de hemostasia y los inventores lo utilizaron como control para evaluar si el efecto del almacén de alginato era por hemostasia.

El segundo conjunto experimental examinó la eficacia del almacén de alginato macroporoso en la reducción de la muerte de células hepáticas después de realizar una HP, en comparación con el hidrogel de alginato que tiene una estructura nanoporosa y un alginato modificado, específicamente, un almacén macroporoso de alginato decorado con RGD.

En el hígado que quedó después de realizar la hepatectomía, se colocaron tres almacenes por animal. Para evaluar la supervivencia de los animales, se hizo un seguimiento a los grupos tratados e intervenidos de manera simulada, 10 ratones en cada uno, durante 6 días sin recoger ninguna muestra. Para analizar el hígado y el suero, los ratones se sacrificaron al cabo de 3, 6, 24 y 48 horas y 6 días después de la hepatectomía, 3-5 ratones en cada grupo.

Se examinó la solución de biomaterial de alginato líquido no reticulado utilizando dos modelos experimentales, la hepatectomía parcial extendida y la hepatitis mediada por el sistema inmunitario inducida por ConA. Los grupos experimentales de ambos modelos se describen en detalle en los Ejemplos 5 y 6.

#### Ejemplo 1

##### *Supervivencia entre los grupos experimentales*

La hepatectomía es a menudo el último y mejor recurso para tumores hepáticos grandes y metástasis. Sin embargo, la hepatectomía puede afectar gravemente a las funciones hepáticas y, por lo tanto, a la supervivencia de los pacientes en condiciones en las que se justifica la resección quirúrgica del hígado. Como se muestra en la Figura 3, la supervivencia fue significativamente mayor en el grupo con el almacén de alginato implantado, 60% en comparación con 10% sin el almacén (orden logarítmico = 0,001). No hubo diferencias significativas en la supervivencia en los grupos tratados con colágeno y sin almacén, lo que indica que el efecto del almacén de alginato no está mediado por la hemostasia. La supervivencia disminuyó significativamente cuando se utilizó un almacén de colágeno o ningún almacén. Los inventores valoraron adicionalmente el daño hepatocelular en los tres grupos experimentales, como se demuestra en la Figura 4. Como se muestra en dicha figura, tres horas después de la hepatectomía, la necrosis masiva es claramente evidente en el grupo de control, mientras que el grupo tratado con alginato muestra una arquitectura hepática casi normal. A medida que pasa el tiempo después de la hepatectomía, se observan células inflamatorias en el parénquima y la fibrosis es notable.

#### Ejemplo 2

##### *Enzimas hepáticas y niveles de albúmina entre grupos experimentales*

La transaminasa hepática proporciona evidencia de lesión de células hepáticas, mientras que la albúmina proporciona una indicación de la capacidad sintética del hígado. Las pruebas dan una indicación sobre el estado del hígado de un paciente. Como se muestra en las Figuras 5A, 5B y en la Tabla 1, los niveles de ALT y AST confirmaron los hallazgos histopatológicos que demostraron un aumento significativo de entre dos y veinte veces en los grupos de control en comparación con niveles casi normales en ratones con el almacén de alginato implantado ( $p < 0,0001$  en 6, 24, horas y 6 días). Los niveles alcanzaron su punto máximo 24 horas después de la hepatectomía en grupos sin almacén y con almacén de colágeno y permanecen estables en el grupo tratado con alginato.

Como se muestra en la Figura 6, la albúmina fue significativamente más alta en el grupo tratado con alginato en comparación con el grupo tratado con colágeno y el control. Estos resultados indicaron que el armazón de alginato previene el daño hepatocelular y mejora la función de síntesis hepática después de hepatectomía parcial subtotal.

5

Tabla 1: Resumen de los niveles de AST, ALT y albúmina

Tiempo	Armazón	AST (media ± DT)	ALT (media ± DT)	Albúmina (media ± DT)	Valor de p*	Valor de p**
6 horas	Alginato	186±35	160±46	25±5,8	0,0002	0,01
	Colágeno	745±8	722±246	12±4,6		
	Sin armazón	750±0	898±89	10±0,5		
24 horas	Alginato	113±34	94±45	26±1,7	0,0002	0,00008
	Colágeno	2180±432	1239±238	11±1,7		
	Sin armazón	1269±401	1316±158	10±0		
6 días	Alginato	122±42	86±29	24±1,5	0,002	0,0001
	Colágeno	712±393	641±335	10±0		
	Sin armazón	748±429	595±306	10±0		

\* valor de p que compara los valores de ALT entre alginato y sin armazón

\*\* valor de p que compara los niveles de albúmina entre alginato y colágeno

10 Ejemplo 3

*Efecto del alginato sobre la apoptosis y la multiplicación celular*

15 Para investigar adicionalmente si el efecto beneficioso de la aplicación de alginato sobre el tejido hepático remanente implicaba procesos apoptóticos, a continuación los inventores compararon marcadores apoptóticos en los tres grupos experimentales. Como se muestra en la Figura 7, la inmunohistoquímica para la caspasa 3 escindida fue significativamente mayor en los grupos de control, mientras que en el grupo tratado con alginato no se observó tinción, lo que sugiere una apoptosis significativamente reducida en el grupo tratado con alginato. La ausencia de tinción con caspasa 3 en el grupo tratado con alginato es particularmente significativa en vista del marcado aumento en la apoptosis en los grupos de control, especialmente 24 horas después de la hepatectomía.

20 Por lo tanto, los inventores examinaron después el efecto del tratamiento con alginato sobre la multiplicación celular. Se utilizó BrdU (bromodesoxiuridina) como un marcador de la multiplicación de hepatocitos. Como se muestra en la Figura 8, se demuestra claramente un aumento significativo en la tinción celular a las 3, 6 y 24 horas en el grupo tratado con alginato. Cabe señalar que solo después de 48 horas, se pudo detectar un aumento en la multiplicación de los hepatocitos en todos los grupos experimentales. Estos resultados indican que los armazones de alginato mejoran la regeneración temprana después de hepatectomía parcial y que el segundo aumento en la multiplicación es independiente del alginato.

25 Para analizar más a fondo las rutas de señalización que actúan como mediadoras en el aumento observado de la proliferación celular en respuesta al tratamiento con alginato, a continuación se examinó la activación de STAT3. Como se muestra en la Figura 9, la inmunotransferencia para STAT3 y STAT3 fosforilado demuestra claramente un aumento en la activación de STAT3, 6 y 24 horas después de realizar la HP en el grupo tratado con alginato en comparación con los grupos de control. Sin estar sujetos a ninguna teoría, estos resultados sugieren que el alginato puede aumentar la supervivencia al promover la activación de STAT-3, iniciando así una respuesta regenerativa intensa.

Ejemplo 4

40 *Alginatos modificados en el tratamiento de la hepatectomía*

45 Alentados por los resultados utilizando el armazón de alginato macroporoso, los inventores probaron a continuación el efecto de diferentes preparaciones de alginatos modificados. Por lo tanto, a continuación se examinó la supervivencia de los ratones hepatectomizados tratados con cualquiera de armazón de hidrogel de alginato nanoporoso, armazón de alginato macroporoso, armazón de colágeno macroporoso o control sin tratar. Como se muestra en la Figura 10, los armazones de alginato tanto nanoporoso como macroporoso elevaron significativamente la supervivencia de los ratones, particularmente en comparación con los grupos tratados con armazón de colágeno o los grupos de control no tratados. Un análisis adicional presentado en la Figura 11,



demuestra una supervivencia mejorada comparable de los ratones tratados con armazón de alginato nanoporoso (hidrogel de alginato).

5 Análisis adicional de alginatos modificados, por ejemplo, armazón de alginato decorado con RGD presentado en las Figuras 12 y 13, mostró efectos comparables sobre las transaminasas (AST en la Figura 12A, ALT en la Figura 12B) y la albúmina (Figura 13).

10 El alginato marcado con biotina se utilizó después como una herramienta para evaluar la posición *in vivo* del armazón. Por lo tanto, se crearon armazones de biotina-alginato y se insertaron después de la hepatectomía y los ratones se sacrificaron 3 y 6 horas después de la cirugía. Como se muestra por la tinción inmunohistoquímica de H&E presentada en la Figura 14, se detectó biotina dentro del tejido hepático, lo que sugiere que el hígado se regeneró en los armazones.

15 Ejemplo 5

*Uso de alginato líquido no reticulado en el tratamiento de la hepatectomía*

20 Los notables resultados de la aplicación de las diferentes estructuras de alginato sobre tejido hepático dañado, llevaron a los presentes inventores a evaluar adicionalmente la viabilidad de utilizar diferentes aplicaciones de alginato sobre el tejido lesionado, específicamente, en forma líquida. Por lo tanto, se realizó una hepatectomía parcial prolongada (87%) en dos grupos de ratones (10 ratones por grupo) como se describió anteriormente, y se comparó el efecto del alginato líquido sobre la supervivencia de los ratones con el control tratado con PBS. Se pulverizó alginato líquido (200  $\mu$ l) o PBS sobre la parte superior del hígado que quedaba después de la hepatectomía sin inyectar en el parénquima hepático. Como claramente se muestra en la Figura 15, después de 100 horas, el 80% de los ratones tratados con alginato líquido sobrevivió, mientras que solo sobrevivió el 40% de los ratones tratados con PBS. Después de 144 horas, todos los ratones tratados con PBS de control murieron mientras que sobrevivió el 60% de los ratones tratados con alginato líquido. Después de 10 días, todos los ratones murieron.

30 Adicionalmente, el efecto del alginato líquido sobre la recuperación del tejido hepático hepatectomizado se evaluó examinando parámetros funcionales. Por lo tanto, se midieron los niveles de ALT en suero en ratones tratados con alginato líquido o con PBS ( $n = 4$ ), al cabo de 6 y 24 horas después de una hepatectomía extendida. El suero se obtuvo de la vena de la cola a las 6 horas. Tanto el suero como el hígado se aislaron de los ratones sacrificados 24 horas después de realizar la HP. La Figura 16A representa que los niveles de ALT en suero se elevaron significativamente en el grupo tratado con PBS en comparación con el grupo tratado con alginato líquido al cabo de 6 y 24 horas después de una HP extendida ( $p = 0,000001$  y  $p = 0,000001$ , respectivamente). Además, los niveles de ALT disminuyeron significativamente de 6 a 24 horas en el grupo tratado con alginato líquido ( $p = 0,01$ ).

40 Para evaluar las funciones de síntesis hepática, se midió la albúmina en suero 24 horas después de una HP extendida. Como se demuestra en la Figura 16B, los ratones tratados con alginato líquido mostraron niveles significativamente elevados de albúmina en suero en comparación con los controles tratados con PBS ( $p = 0,000001$ ).

45 Estos resultados demuestran claramente la viabilidad de utilizar alginato, ya sea en forma de armazones líquidos o sólidos para recuperar el tejido hepático lesionado.

Ejemplo 6

*Efecto del alginato líquido no reculado en la hepatitis inducida por ConA*

50 La concanavalina A (Con A) es un modelo generalmente utilizado para la lesión hepática mediada por el sistema inmunitario. La Con A induce una lesión hepática aguda mediada por el sistema inmunitario después de una sola inyección intravenosa a ratones. Para estudiar el efecto del alginato líquido inyectable sobre la lesión hepática, se inyectaron 200  $\mu$ l de ConA (400  $\mu$ g/ratón=20 mg/kg) en la vena de la cola de los ratones ( $n = 4$ ) dos horas después de inyección IP de 200  $\mu$ l de alginato líquido o PBS. El suero se obtuvo de la vena de la cola para el análisis de los niveles de ALT al cabo de 6 y 24 después de la inyección de ConA. Los ratones se sacrificaron a las 48 horas después de la inyección de ConA, y se obtuvo suero (para ALT y albúmina) e hígado. La Figura 17A representa niveles significativamente más bajos de ALT en suero 6 y 24 horas después de la inyección de ConA en el grupo tratado con alginato en comparación con el grupo de control ( $p = 0,004$  y  $0,04$ , respectivamente). Cuarenta y ocho horas después de la inyección de ConA, los niveles de ALT fueron dos veces más altos en el grupo de control en comparación con el grupo tratado con alginato líquido, sin embargo, esto no ha alcanzado una significación estadística.

60 Para evaluar la función de síntesis hepática, se midió la albúmina en suero 48 horas después de la inyección de ConA. Como se muestra en la Figura 17B, los niveles de albúmina en suero fueron significativamente más altos en los ratones tratados con alginato líquido ( $p = 0,00000001$ ).

Estos resultados demuestran claramente la viabilidad de utilizar biomaterial de alginato líquido para suprimir la inflamación hepática, mejorar la supervivencia y las funciones de síntesis hepática en los dos modelos diferentes de insuficiencia hepática aguda examinados en este documento, la hepatectomía parcial extendida así como en la hepatitis inmunitaria (ConA).

5

Listado de secuencias

- 10 <110> HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES & DEVELOPMENT LTD. AND BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
- <120> BIOMATERIALES DE ALGINATO PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS HEPÁTICOS
- <130> 23217-wo-07
- 15 <150> IL 187707  
<151> 27-11-2007
- <160> 1
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1  
<211> 8  
<212> PRT
- 25 <213> artificial
- <220>  
<223> el péptido de adhesión RGD
- 30 <400> 1

Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Tyr  
1 5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un biomaterial de alginato biocompatible, que consiste en un alginato que tiene un peso molecular entre 1.000 y 300.000 Dalton, y seleccionándose dicho alginato del grupo que consiste en alginato no reticulado y alginato reticulado con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en calcio, estroncio y bario para su uso en el tratamiento de función hepática alterada en un sujeto que lo necesite, siendo dicha función hepática alterada resultado de insuficiencia hepática fulminante, hepatectomía y/o enfermedad hepática seleccionada del grupo que consiste en hepatitis autoinmunitaria, hepatitis C crónica y hepatitis B crónica, en el que dicho tratamiento comprende la implantación o la inyección de un armazón o de una solución de alginato acelular por sí mismo.
- 10 2. El biomaterial de alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho alginato está en forma de una cualquiera de una solución de alginato, hidrogel de alginato y esponja de alginato sólido.
- 15 3. El biomaterial de alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho alginato es uno cualquiera de una esponja de alginato sólido o hidrogel de alginato, caracterizado por tener una porosidad en el intervalo de 10 % a 99 %.
- 20 4. El biomaterial de alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha esponja de alginato sólido es un alginato reticulado con entre 0,18 y 0,22 % (p/v) de ácido D-glucónico (sal hemicálcica), caracterizado por tener al menos uno de: un diámetro de 5 mm, un volumen de 0,04 cm<sup>3</sup>, un tamaño de poro en el intervalo de 1 µm a 100 µm; un espesor de al menos 0,5 mm; y una porosidad de al menos 20 %.
- 25 5. El biomaterial de alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho hidrogel de alginato es un alginato reticulado con al menos 0,05 M de CaCl<sub>2</sub> y se caracteriza por tener al menos uno de: un tamaño de poro en el intervalo de 1 nm a 1000 nm; un espesor de 0,5 mm; y una porosidad de 20 %.
- 30 6. El biomaterial de alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha solución de alginato comprende entre 0,1 y 4 % (p/v) de alginato de sodio, teniendo el alginato dentro de la solución un peso molecular de entre 1.000 a 50.000 Dalton, y estando reticulado con entre 0,18 y 0,5 % (p/v) de solución de gluconato de calcio (ácido D-glucónico, sal hemicálcica).
- 35 7. El biomaterial de alginato para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha solución de alginato comprende entre 0,1 y 5 % (p/v) de alginato de sodio no reticulado que tiene una relación G/M de entre 0,5 a 4.
- 40 8. El biomaterial de alginato para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho alginato se modifica uniendo al menos uno de un péptido promotor de adhesión celular y un grupo sulfato.
- 45 9. Un biomaterial de alginato biocompatible, que consiste en un alginato que tiene un peso molecular entre 1.000 y 300.000 Dalton, y seleccionándose dicho alginato del grupo que consiste en alginato no reticulado y alginato reticulado con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en calcio, estroncio y bario, para su uso en el mantenimiento de niveles de albúmina en suero en un sujeto que padece función hepática alterada como resultado de insuficiencia hepática fulminante, hepatectomía y/o enfermedad hepática seleccionada del grupo que consiste en hepatitis autoinmunitaria, hepatitis C crónica y hepatitis B crónica, en el que dicho tratamiento comprende la implantación o la inyección de un armazón o de una solución de alginato acelular por sí mismo.
- 50 10. Un biomaterial de alginato biocompatible, que consiste en un alginato que tiene un peso molecular entre 1.000 y 300.000 Dalton, y seleccionándose dicho alginato del grupo que consiste en alginato no reticulado y alginato reticulado con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en calcio, estroncio y bario para su uso en la reducción de los niveles de uno cualquiera de los niveles de ALT y AST en suero en un sujeto que padece función hepática alterada como resultado de insuficiencia hepática fulminante, hepatectomía y/o enfermedad hepática seleccionada del grupo que consiste en hepatitis autoinmunitaria, hepatitis C crónica y hepatitis B crónica, en el que dicho tratamiento comprende la implantación o la inyección de un armazón o de una solución de alginato acelular por sí mismo.
- 55 11. Un biomaterial de alginato biocompatible, que consiste en un alginato que tiene un peso molecular entre 1.000 y 300.000 Dalton, y seleccionándose dicho alginato del grupo que consiste en alginato no reticulado y alginato reticulado con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en calcio, estroncio y bario para su uso en la reducción del nivel de apoptosis en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece función hepática alterada y el aumento de la proliferación celular en un tejido hepático dañado de un sujeto que padece función hepática alterada, siendo dicha función hepática alterada resultado de insuficiencia hepática fulminante, hepatectomía y/o enfermedad hepática seleccionada del grupo que consiste en hepatitis autoinmunitaria, hepatitis C crónica y hepatitis B crónica, en el que dicho tratamiento comprende la implantación o la inyección de un armazón o de una solución de alginato acelular por sí mismo.
- 60
- 65

12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9 a 11, en la que dicha composición se administra por vía sistémica.

5 13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9 a 12, en la que dicha composición farmacéutica comprende alginato en forma de una solución acuosa.

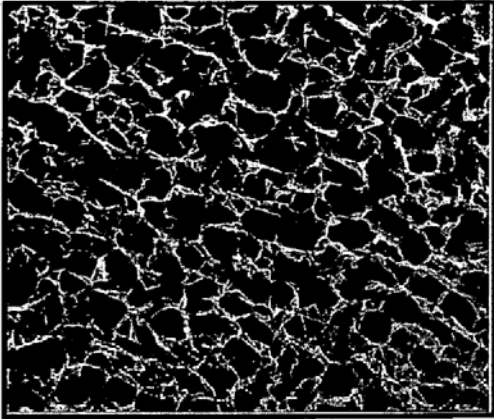


Fig. 1A

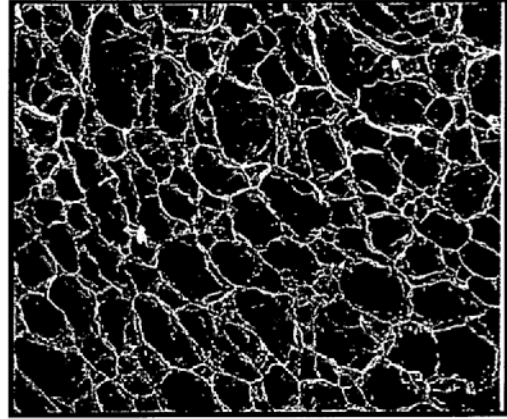


Fig. 1B

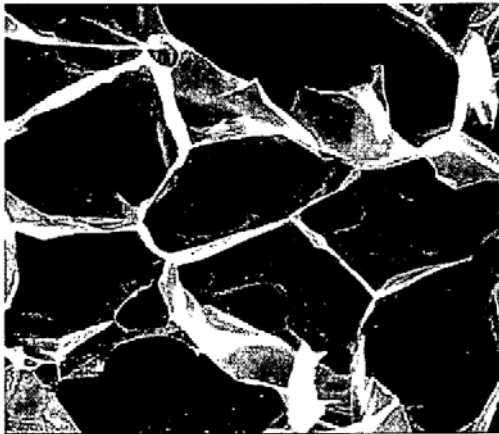


Fig. 2A

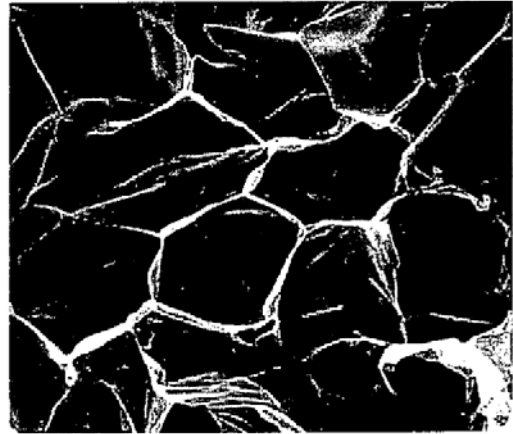


Fig. 2B

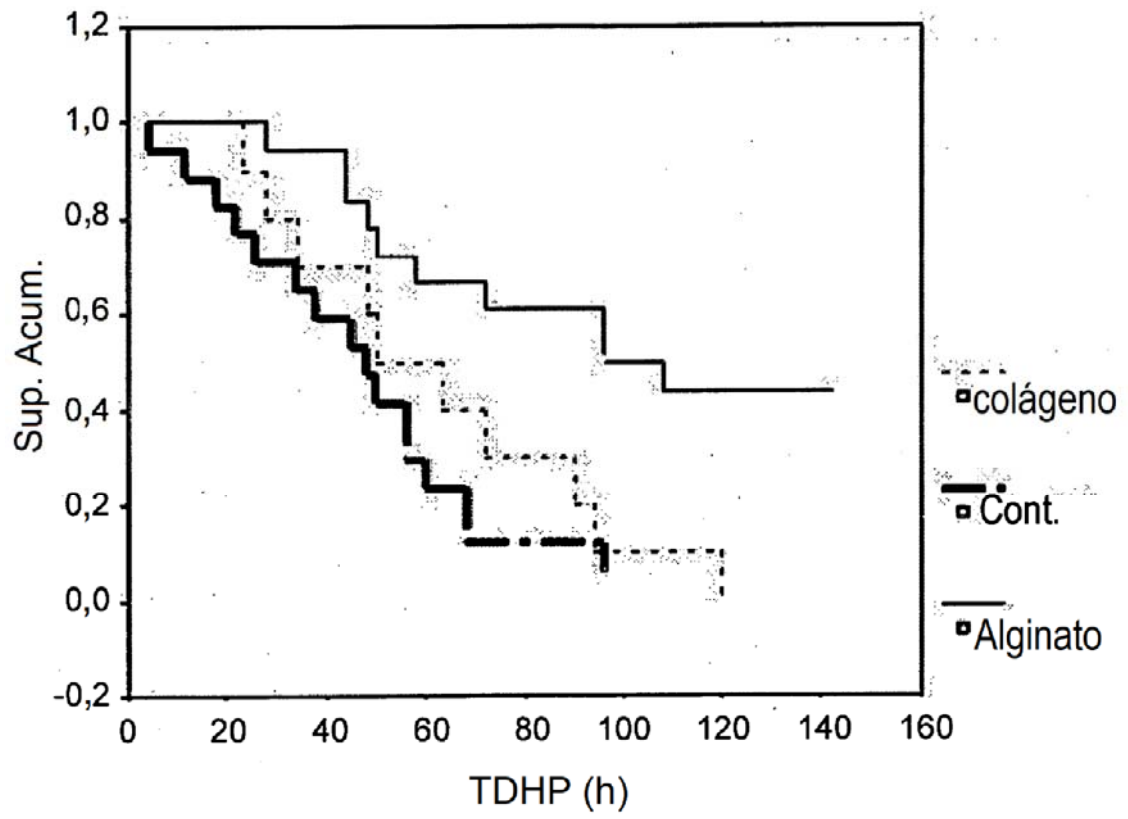


Fig. 3

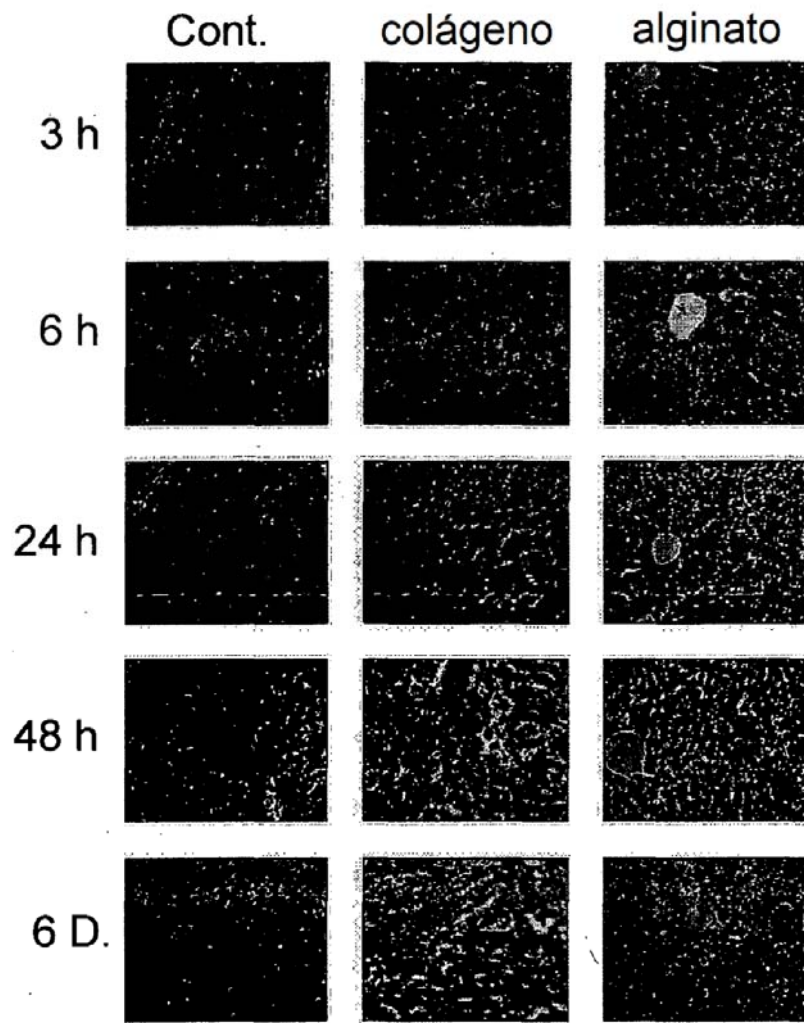


Fig. 4

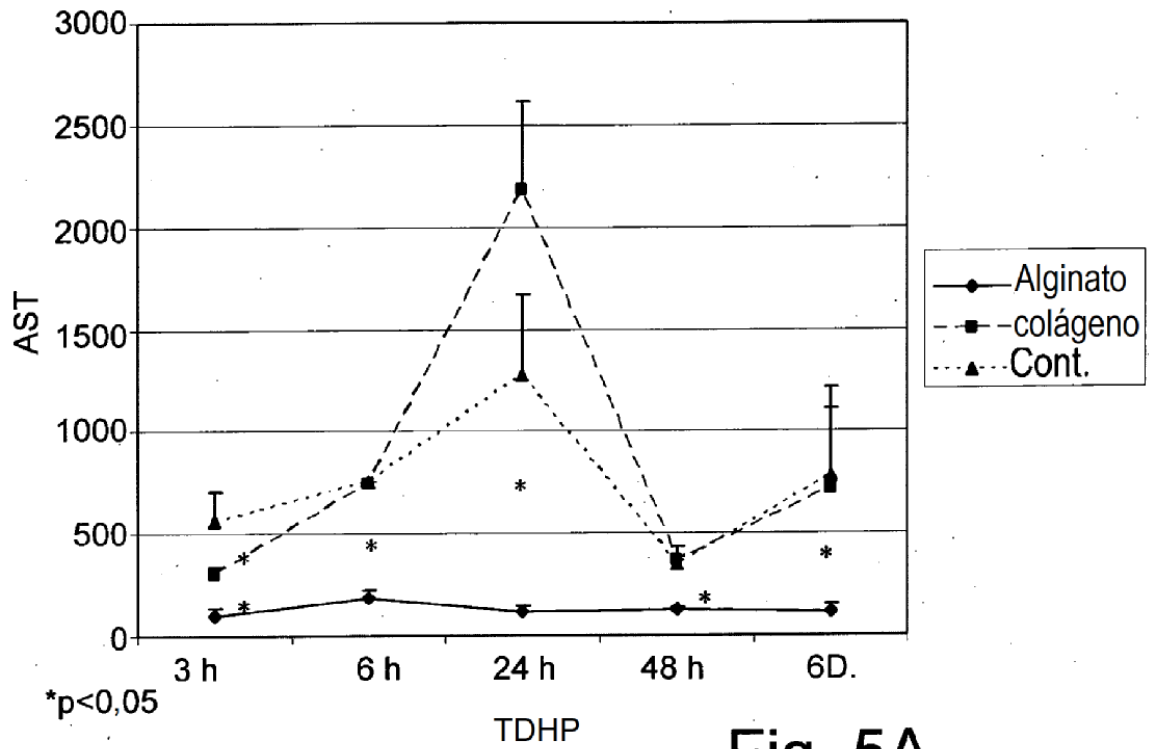


Fig. 5A

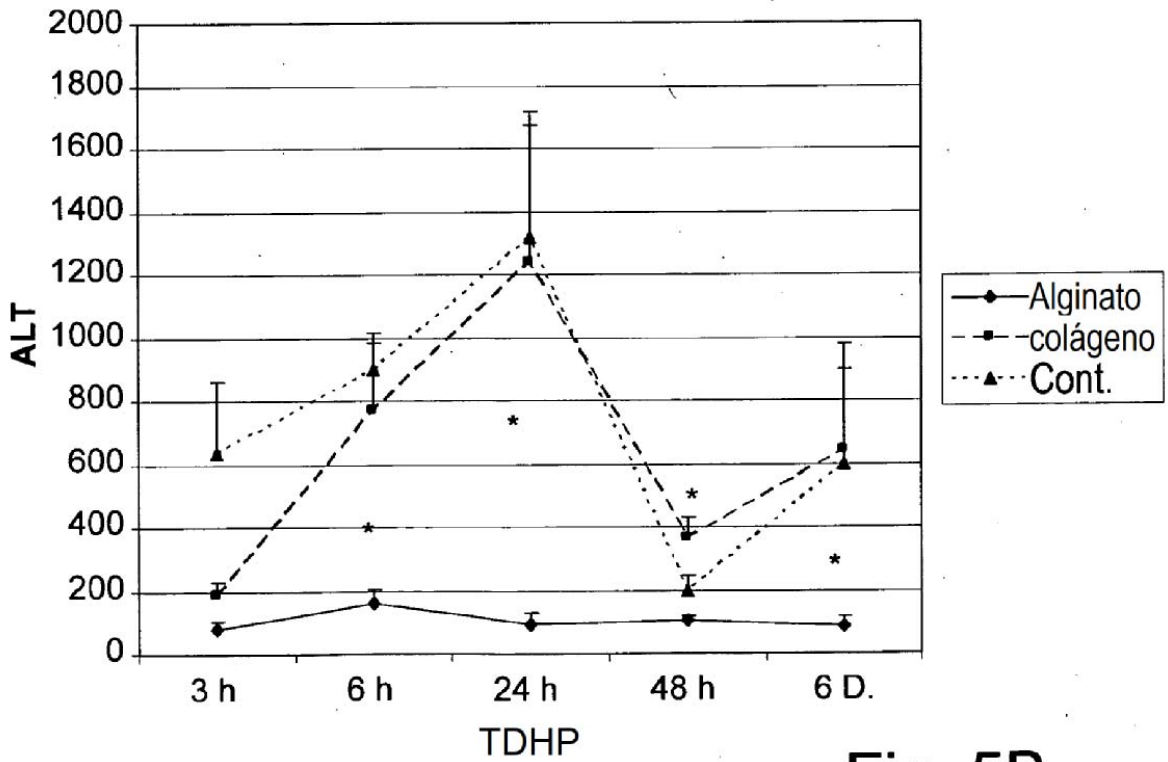


Fig. 5B



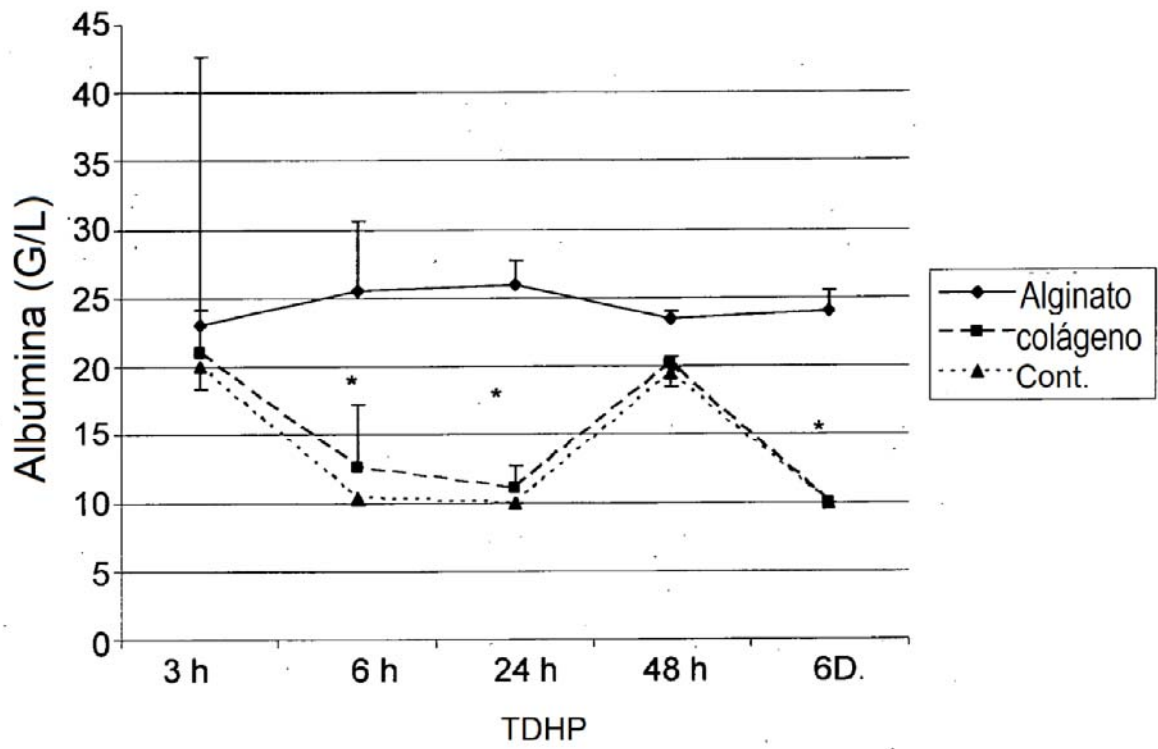


Fig. 6

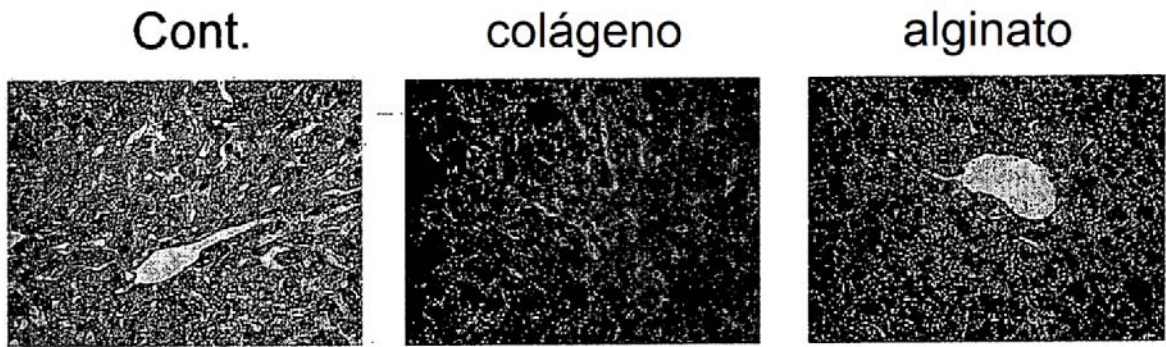


Fig. 7A

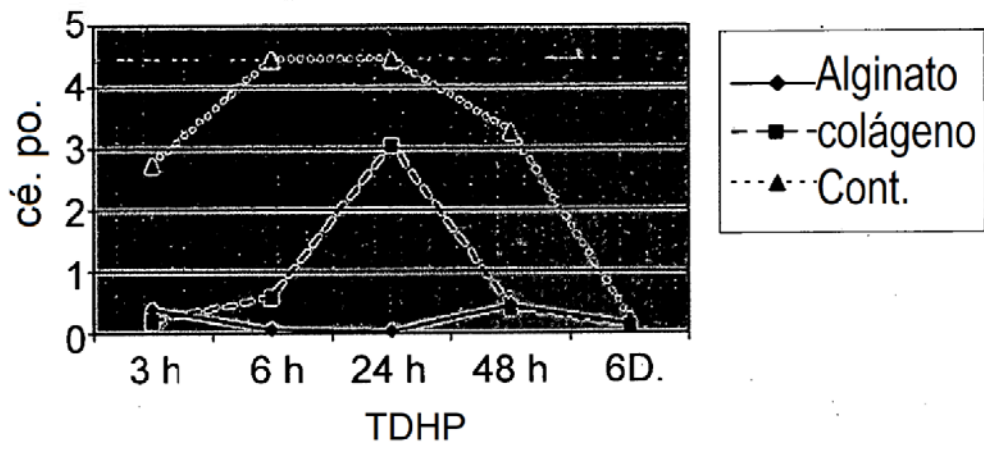


Fig. 7B

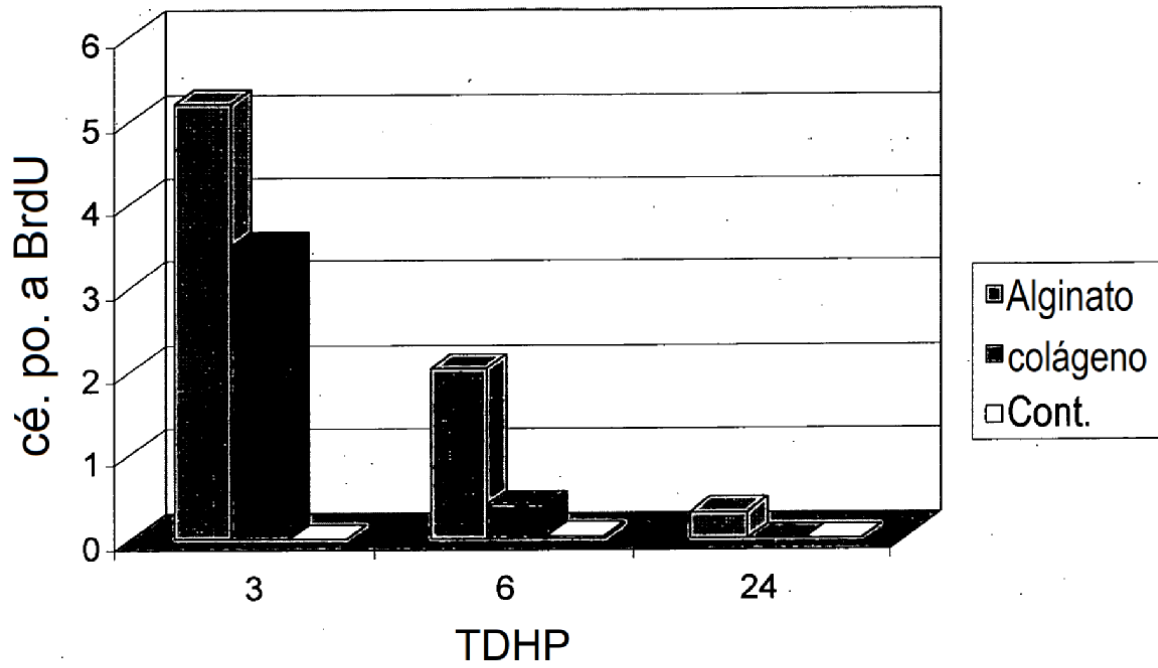


Fig. 8

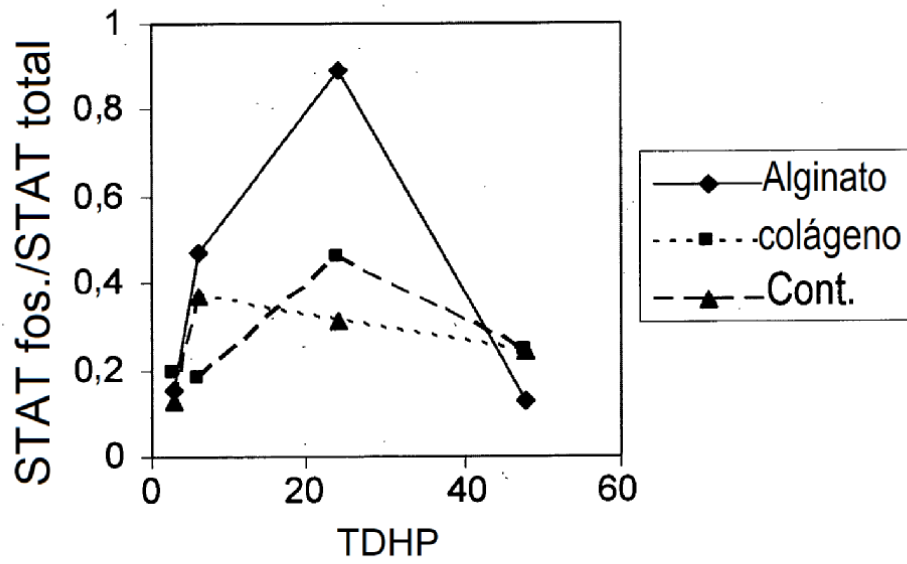


Fig. 9

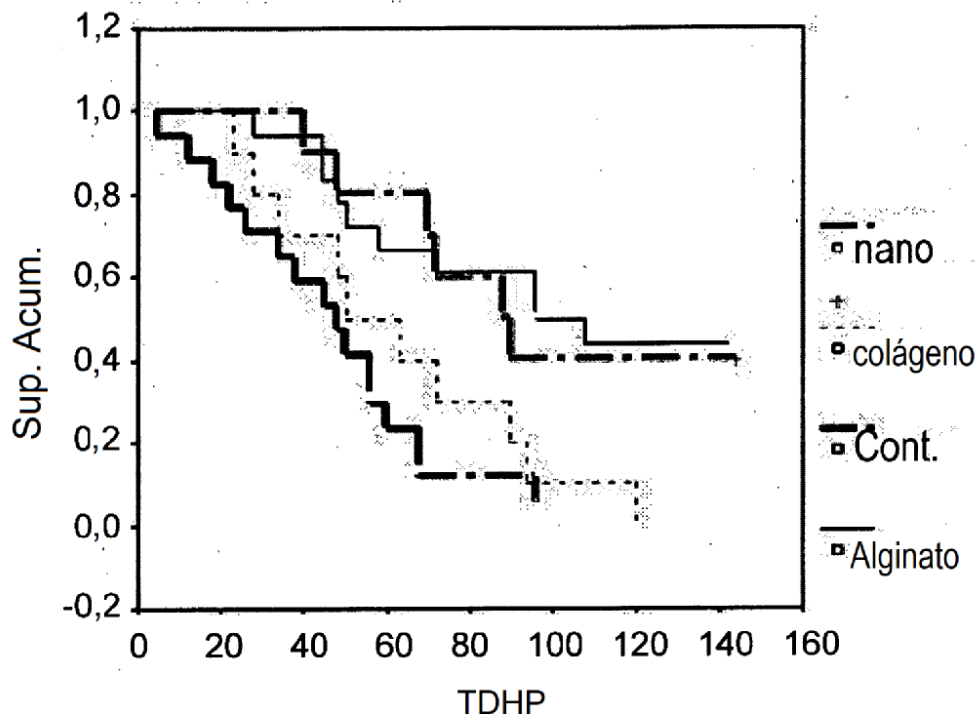


Fig. 10

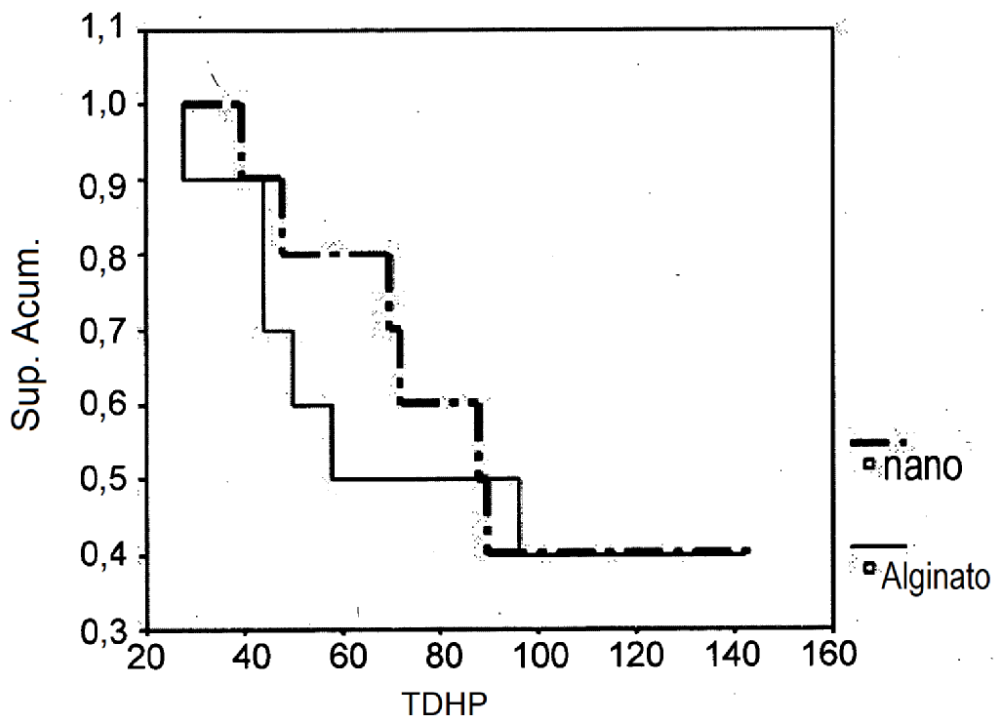


Fig. 11

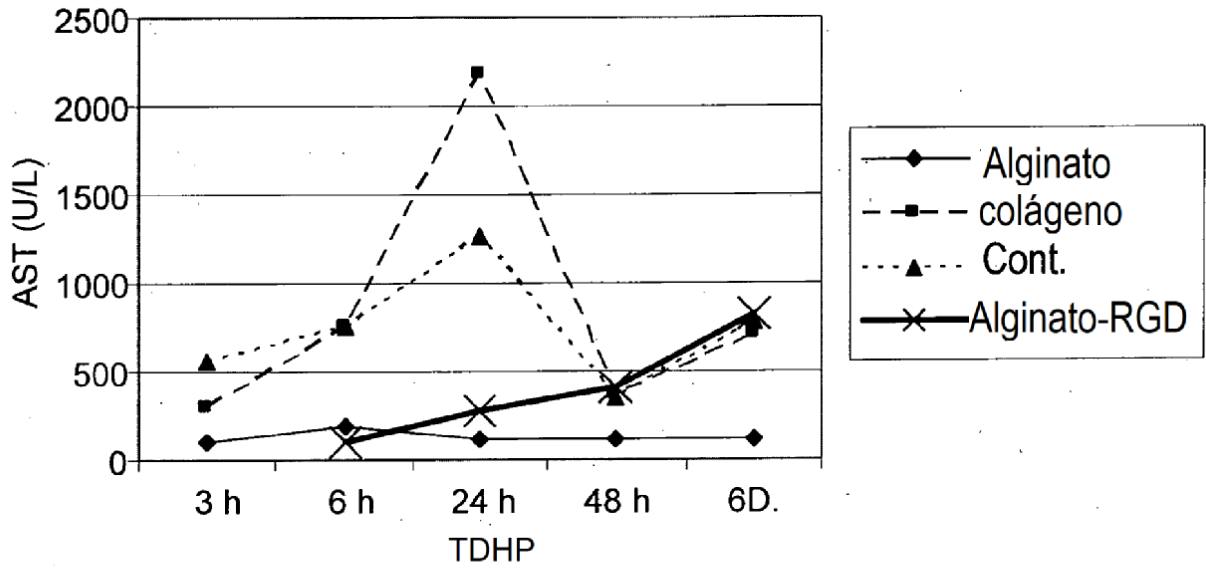


Fig. 12A

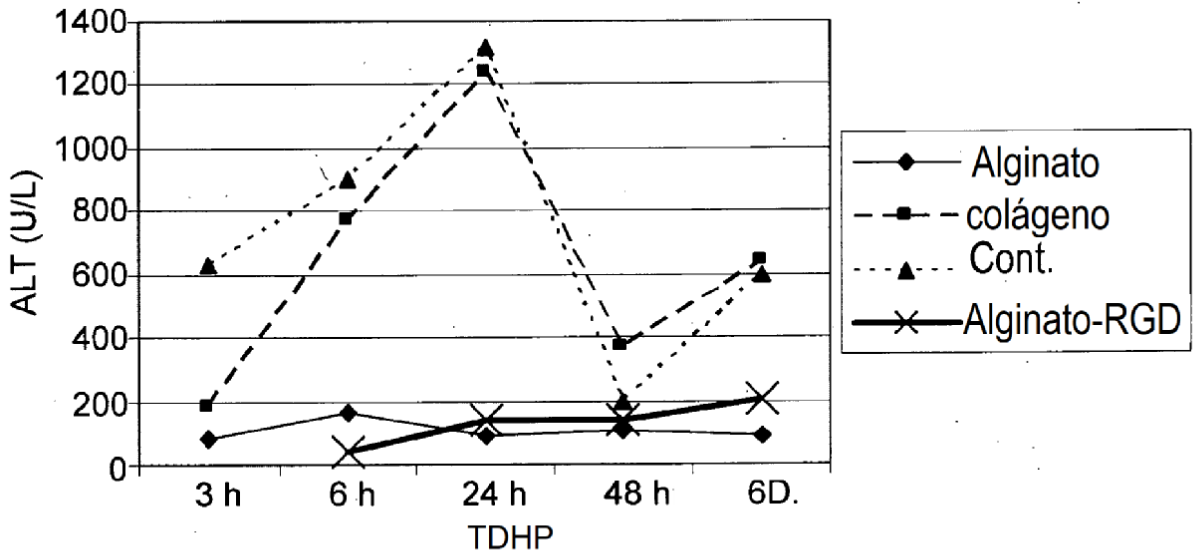


Fig. 12B

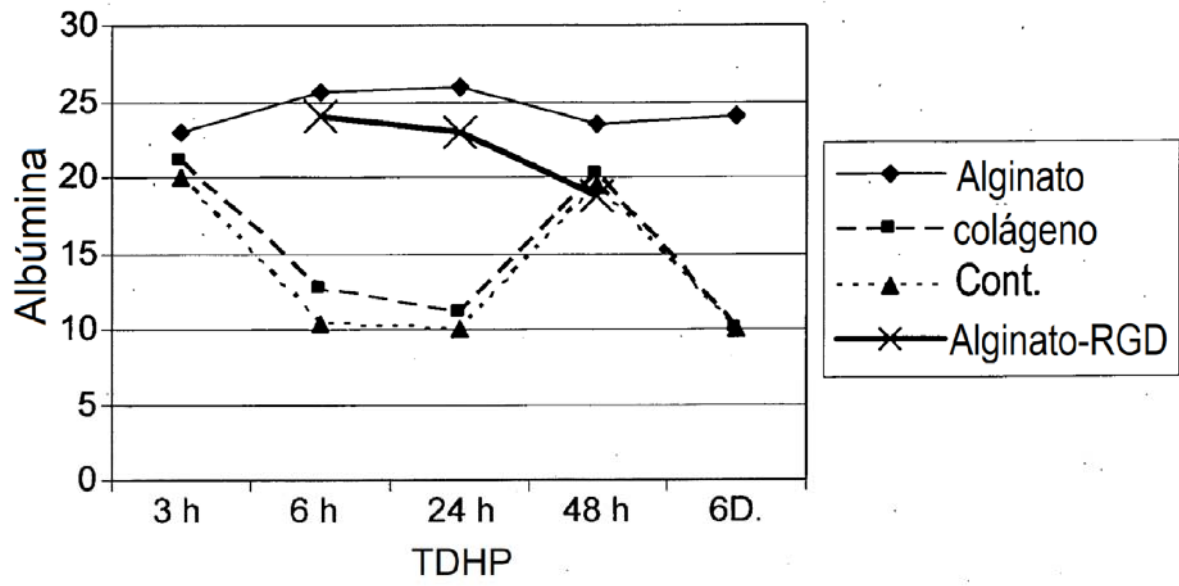


Fig. 13

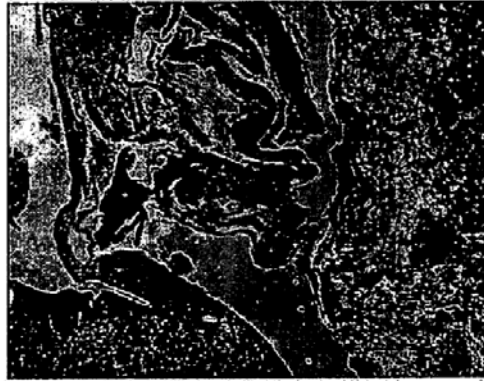


Fig. 14A

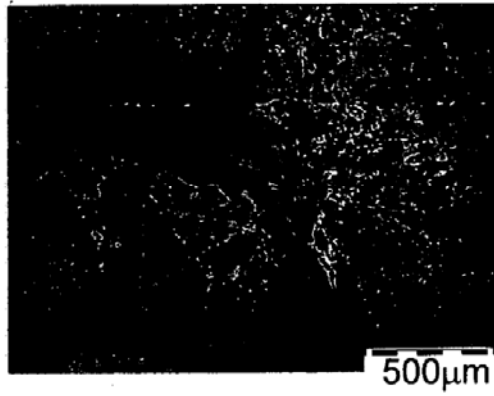


Fig. 14B

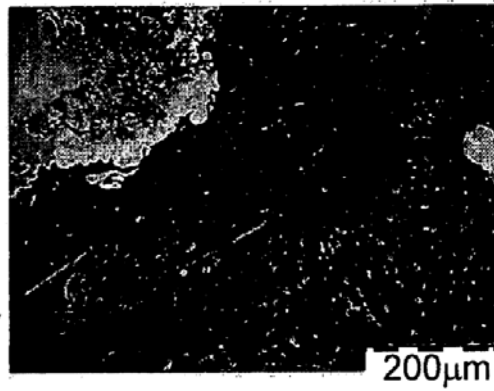


Fig. 14C

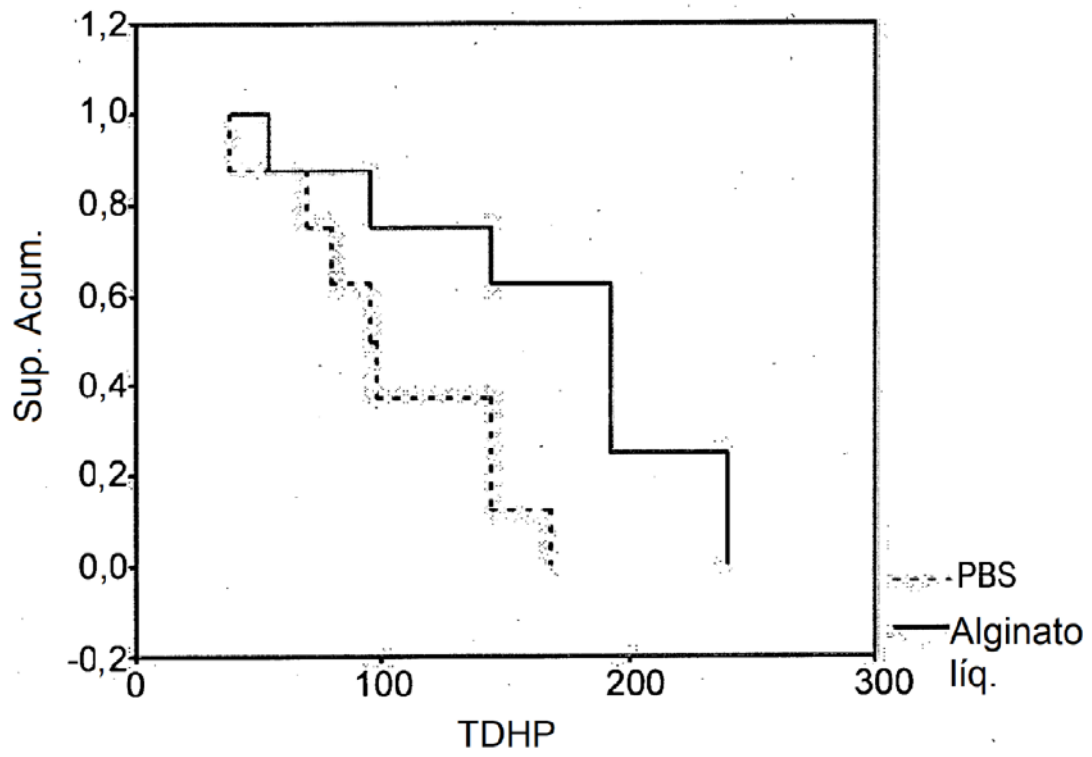


Fig. 15



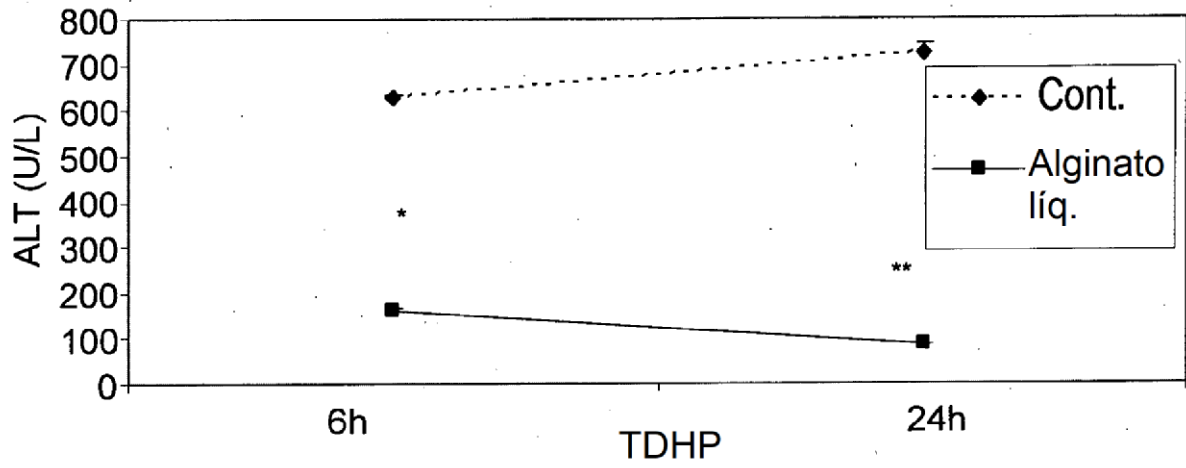


Fig. 16A

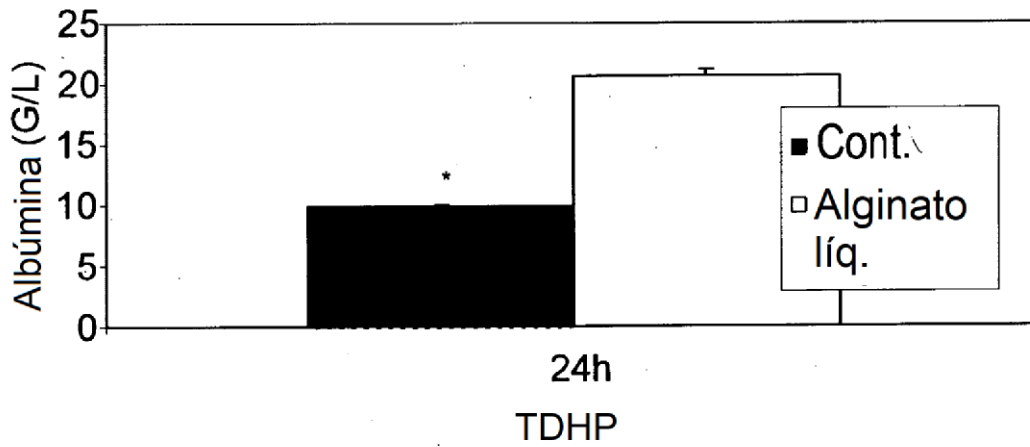


Fig. 16B

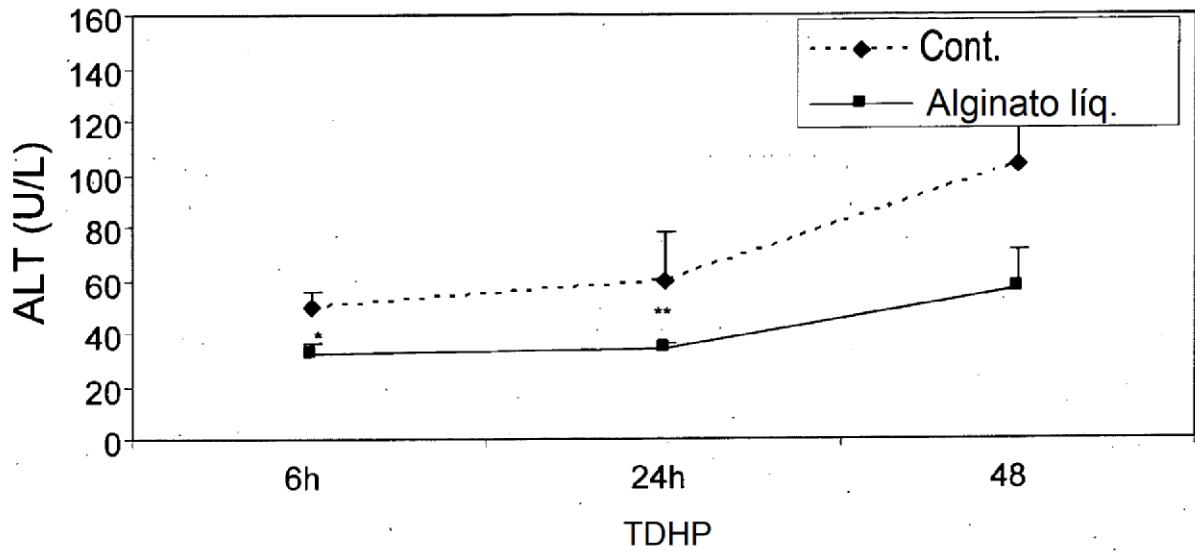


Fig. 17A

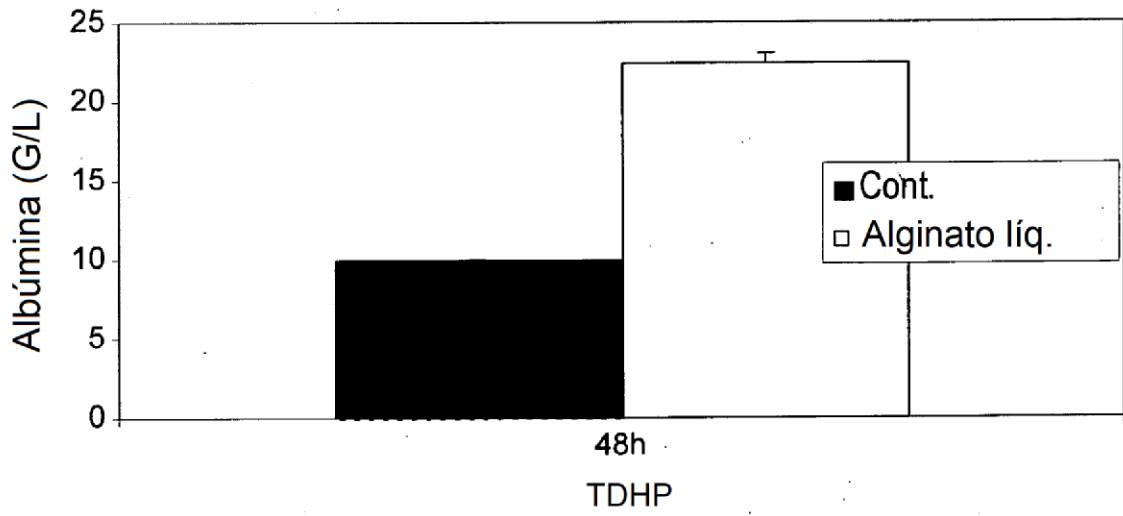


Fig. 17B