

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 211**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2012 PCT/EP2012/065342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13017699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2012 E 12756122 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2739292**

54 Título: **Medios para la regeneración hepática**

30 Prioridad:

**04.08.2011 EP 11006409**

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

**21.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GERMANN, GUENTER y  
KOELLENSPERGER, EVA**

74 Agente/Representante:

**ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María**

ES 2 660 211 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Medios para la regeneración hepática

5 La presente invención concierne a medios y métodos para el tratamiento de enfermedades hepáticas agudas y crónicas. En particular, se refiere a una composición que comprende células germinales adiposas humanas para su uso en la prevención, mejoría o tratamiento de las enfermedades hepáticas agudas o crónicas.

10 Las enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por la destrucción gradual del tejido hepático a lo largo del tiempo. Están incluidas en esta categoría varias enfermedades hepáticas, incluyendo la cirrosis y la fibrosis, la última de las cuales a menudo es la precursora de la cirrosis.

15 La cirrosis es el resultado de las enfermedades hepáticas agudas y crónicas, y se caracteriza por el reemplazo de tejido hepático por tejido cicatricial fibrótico y nódulos regenerativos, lo que conduce a una pérdida progresiva de la función hepática. La fibrosis y la regeneración nodular dan como resultado la pérdida de la arquitectura lobular microscópica normal del hígado. La fibrosis representa el crecimiento de tejido cicatricial que es el resultado de, por ejemplo, una infección, inflamación, lesión e incluso la cicatrización. Con el tiempo, el tejido cicatricial fibrótico reemplaza lentamente al tejido hepático funcional normal, dando como resultado una cantidad cada vez menor de flujo sanguíneo al hígado, dejando al hígado incapaz de procesar de forma completa los nutrientes, hormonas, fármacos y sustancias tóxicas que se encuentran en el torrente sanguíneo. Las causas más comunes de cirrosis incluyen el alcoholismo, las infecciones víricas por virus de la hepatitis C, la ingestión de toxinas y el hígado graso, pero también existen muchas otras posibles causas.

25 La infección crónica por virus de la hepatitis C y la esteatohepatitis no alcohólica son las dos causas principales de las enfermedades hepáticas crónicas en los Estados Unidos, estimándose que afecta a entre tres y cinco millones de personas. Una preocupación creciente es el número cada vez mayor de ciudadanos de Estados Unidos con obesidad y síndrome metabólico que tienen enfermedad del hígado graso no alcohólico, que actualmente asciende a más de 30 millones, de los que aproximadamente el 10 por ciento finalmente presentarán esteatohepatitis no alcohólica. Otras complicaciones corporales son consecuencia de la pérdida de la función hepática. La complicación más común de la cirrosis es una afección conocida como ascitis, una acumulación de líquido en la cavidad peritoneal que puede conducir a un riesgo aumentado de peritonitis bacteriana espontánea, posiblemente dando como resultado la muerte prematura del paciente. Otras complicaciones de la cirrosis con peligro potencial para la vida incluyen la encefalopatía hepática, una anomalía neuropsíquica que es el resultado de que las sustancias tóxicas que normalmente el hígado elimina de la sangre comienzan a impedir el apropiado funcionamiento de las células cerebrales. Aún otra complicación de la cirrosis con peligro potencial para la vida incluye a virus esofágicos o venas submucosas del esófago extremadamente dilatadas que son susceptibles de hemorragia.

40 Una vez que se ha producido una cirrosis o fibrosis en el hígado, en general esta se considera irreversible. Más bien, el tratamiento convencional se centra en la prevención de cualquier evolución adicional de la cirrosis en el hígado y en mitigar las complicaciones que puedan presentarse a partir de la cirrosis. En fases más avanzadas de la cirrosis, el único tratamiento conocido de forma convencional es un trasplante de hígado. La American Liver Foundation estima que más de 300.000 personas en los Estados Unidos son hospitalizadas cada año como resultado de la cirrosis del hígado. También se estima que 18.000 personas necesitan un trasplante de hígado. En Alemania, la cantidad de trasplantes de hígado fue de 5.083 en 2010, mientras que aproximadamente 2.000 pacientes necesitan un trasplante de hígado.

50 El trasplante de células hepáticas es un procedimiento de reciente aparición, que implica la infusión de una suspensión de células hepáticas en el sistema porta del receptor. Su objetivo es la recuperación de la función hepática del paciente como consecuencia del prendimiento del injerto y la repoblación del parénquima afectado. Sin embargo, debido a que el abastecimiento de hepatocitos humanos maduros para el trasplante es aún limitado, de hecho más o menos igual de limitado que la disponibilidad de un hígado entero, la investigación también tiene como objetivo obtener células trasplantables a partir de otras fuentes, tales como células progenitoras y germinales, por ejemplo de origen embrionario o adulto, que pudieran expandirse, por ejemplo *in vitro*, y tuvieran la capacidad de diferenciarse a hepatocitos maduros funcionales, especialmente después del trasplante *in vivo*. Por consiguiente, existe una gran necesidad de desarrollar medios que sean útiles en el tratamiento de diversas enfermedades o afecciones asociadas con las enfermedades asociadas al hígado, en particular dados los tratamientos inadecuados disponibles actualmente para la mayoría de estos trastornos. Parker *et al.* (2006), *Expert Opin Biol Ther* 6 (6): 567-578 y Tholpady *et al.* (2009), *Curr Opin Organ Transplant* 4: 51-56 proponen el uso de células germinales derivadas de tejido adiposo para la regeneración de tejido dañado. Ghaedi *et al.* (2011), *Biochem Biophys Res Comm* 407: 295-300 informa que las células germinales adiposas se diferencian a hepatocitos a través de la señalización del HGF. El documento WO 2010/070141 proporciona diversas composiciones que comprenden células germinales adiposas, sin embargo, no dice nada acerca del uso de tales células germinales para la regeneración de órganos, mientras que el documento WO 2007/127698 proporciona células germinales adultas obtenidas de tejido adiposo en la regeneración hepática. En concreto, el documento WO 2007/127698 enseña que se trasplantan células germinales adiposas encapsuladas en un mamífero receptor a través de inyección intraparenquimática o intrahepática. Sin embargo, a pesar de los intentos realizados hasta el momento en la técnica, todavía existe una

necesidad no satisfecha de medios y de métodos para la regeneración de órganos que, por ejemplo, estén dañados por una enfermedad o traumatismo.

5 Por lo tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención podría verse como la proporción de medios y métodos que cumplan con las necesidades mencionadas anteriormente. Este problema técnico se ha resuelto mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación en el presente documento.

10 El objetivo de los inventores del presente estudio fue evaluar la posibilidad del trasplante de células germinales para regenerar el hígado, en particular en el campo de las enfermedades hepáticas crónicas, ampliar las actualmente limitadas opciones terapéuticas y, en consecuencia, mejorar la calidad de vida y la supervivencia global de los pacientes afectados. Por lo tanto, se analizaron la integración de las células germinales adiposas en el tejido hepático afectado y su capacidad de asumir funciones hepáticas específicas. Por consiguiente, se estableció en ratas un daño hepático crónico con emplazamiento predominantemente periportal, un patrón comparable con el observado en la hepatitis vírica, que es la causa más frecuente de la insuficiencia hepática crónica [Jung *et al.* 2000, Scand J Gastroenterol 35, 969].

15 Para este fin se utilizó el alialcohol, que induce un daño predominantemente periportal con un pico que se produce a las 48 horas después de la inyección. En este experimento pudo observarse una alta variabilidad en el grado de necrosis de rata a rata, de lóbulo a lóbulo y de corte a corte, lo que concuerda con los resultados de otros estudios que utilizan el sistema de modelo de rata. Sin embargo, los inventores pudieron demostrar con sus experimentos que la inyección de células germinales adiposas en el hígado dañado después de una hepatectomía de 2/3 conduce a un restablecimiento significativamente alto y temprano de la función hepática, en comparación con el grupo de control no tratado con células. Esto podría demostrarse por los niveles más altos de albúmina y de proteínas totales. Notablemente, los inventores no observaron ninguno de los efectos secundarios negativos de la terapia celular, en especial la no formación de tumores.

20 Sorprendentemente, las células germinales inyectadas pudieron encontrarse en cortes histológicos desde la semana 1 hasta más de la semana 8 poscirugía, migrando desde el centro del lóbulo a la periferia. No se observaron reacciones de eliminación de células germinales muertas por parte de macrófagos y no pudieron encontrarse partículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO, forma siglada de *superparamagnetic iron oxide particles*) en los macrófagos.

25 Además, en el presente experimento, los niveles de hierro más bajos en los animales tratados con células 3 semanas poscirugía pueden interpretarse como una regeneración más rápida debida a las células germinales inyectadas. Además, esto hace poco probable un alto recambio de las células germinales marcadas con SPIO ya que se esperaría que conduzca a un aumento de los niveles de hierro.

30 Para finalizar, los inventores han descubierto que el modo de administración de las CGM en el hígado no tiene afecta a su distribución y función en el parénquima hepático. En el presente estudio, las células germinales adiposas inyectadas de forma directa en el lóbulo hepático lateral remanente migraron desde un emplazamiento central inicial dentro del lóbulo a su periferia y pudieron encontrarse hasta 8 semanas después de la inyección. Esta observación es ciertamente sorprendente, dado que en otros estudios se inyectaron células germinales a través de la vena de la cola de ratones (Bañas *et al.*, 2009, Hepatology 24, 70) o en el bazo (Aurich *et al.*, 2009, Gut 58, 570), sin embargo estos estudios no informan resultados tan satisfactorios como los realizados por los presentes inventores. Aún más, incluso se suspendió un estudio clínico en el cual se administraron por la arteria intrahepática células estromales obtenidas de tejido adiposo (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01062750>; Identificador de Clinical Trials.gov: NTC01062750). Por lo tanto, es evidente que el modo de administración es importante para la implantación satisfactoria de células germinales, en particular células germinales adiposas.

35 Debe tenerse en cuenta que, como se usan en el presente documento, las formas singulares “un”, “una” y “el/la”, incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un anticuerpo” incluye uno o más de tales anticuerpos distintos y la referencia a “el método” incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos para los expertos en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

40 A menos que se indique otra cosa, la expresión “al menos” que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán o tendrán la capacidad de determinar utilizando solo la experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Tales equivalentes están destinados a estar abarcados por la presente invención.

45 En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra “comprender” y las variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implican la inclusión de un número entero establecido o etapa, o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa, o grupo de números enteros o etapas. Cuando se utiliza en el presente documento, la expresión “que comprende” puede sustituirse con la expresión “que contiene” o, en

ocasiones, cuando se utiliza en el presente documento con el término “que tiene”.

Cuando se usa en el presente documento, “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de reivindicación. Cuando se utiliza en el presente documento, “que consiste esencialmente en” no excluye materiales o etapas que no afectan de forma material las características básicas o nuevas de la reivindicación. En cada uno de los casos en el presente documento, cualquiera de las expresiones “que comprende”, “que consiste esencialmente en” y “que consiste en” pueden reemplazarse con cualquiera de las otras dos expresiones.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término conjuntivo “y/o” entre múltiples elementos enumerados abarca tanto las opciones individuales como las combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos mediante “y/o”, una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad de los primero y segundo elementos juntos. Se entiende que una cualquiera de estas opciones está incluida dentro del significado y que, por lo tanto, satisface el requisito del término “y/o” como se usa en el presente documento. También se entiende que la aplicabilidad simultánea de más de una de las opciones está incluida dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término “y/o” como se usa en el presente documento.

Dados los hallazgos de los presentes inventores, la presente invención se refiere a una composición que comprende células germinales adiposas humanas para su uso en la regeneración del hígado (incluyendo la regeneración de tejido hepático y/o de células hepáticas). Como se usa en el presente documento, cuando se aplican células germinales adiposas “para su uso en”, por ejemplo, la regeneración del hígado, se entiende que las células germinales adiposas son “para su uso en un método para”, por ejemplo, la regeneración hepática. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método de regeneración del hígado en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar células germinales adiposas a dicho sujeto, preferentemente en una cantidad que sea suficiente para regenerar el hígado.

Debido a las afecciones médicas que dañan el hígado, en particular las descritas en el presente documento en el contexto de las enfermedades hepáticas crónicas o agudas, surge una necesidad para la regeneración del hígado. El daño del hígado puede estar provocado por cualquiera de las afecciones médicas descritas en el presente documento en el contexto de las enfermedades hepáticas agudas o crónicas. Sin embargo, la regeneración del hígado también es importante después de la cirugía hepática (incluyendo la resección hepática, en particular la resección hepática parcial), por ejemplo cuando se extirpa un tumor hepático. Los presentes inventores demostraron que la composición de la presente invención es útil para la regeneración del hígado, no solo por la implantación satisfactoria de células germinales en el hígado dañado sino también por la resección de 2/3 del hígado.

El término “hígado”, cuando se usa en el presente documento, incluye el hígado como órgano entero o partes del mismo, tejido hepático y/o células hepáticas.

Cuando se utiliza en el presente documento, “regeneración del hígado” incluye la generación *de novo* de células hepáticas, de tejido hepático y del hígado como órgano entero, a partir de células germinales adiposas. “Regeneración del hígado” también incluye la activación/estimulación de células hepáticas que tengan la capacidad de reparar estructuras hepáticas y/o de repoblar el parénquima hepático. La regeneración del hígado puede, preferentemente, determinarse/observarse mediante la función del hígado, en particular midiendo los diversos parámetros hepáticos descritos en el presente documento, tales como los descritos en el Ejemplo 6.4, y/o analizando la expresión de los ARN específicos del hepatocito tales como la AFP (alfa-fetoproteína), CK19 (citoqueratina), CK7/CX43 (conexina) (típica de los hepatocitos diferenciados de forma temprana) y/o CYP3A4 (citocromo), PCK1 (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), CPS (carbamoil fosfato sintasa), CK18, CX32, CD26, ALB, TFN (transferrina), (típica de los hepatocitos diferenciados de forma tardía); véase la Figura 3 en Aurich *et al.* 2009, Gut 58, 570). Como alternativa o además, la regeneración del hígado puede evaluarse mediante la histología de una muestra de ensayo de hígado que puede obtenerse, por ejemplo, mediante biopsia. Además, como alternativa o aparte de eso, la regeneración hepática puede abordarse mediante inmunofluorescencia de glucógeno o de CK19. La regeneración del hígado también incluye la regeneración del hígado o de partes del mismo después de la resección (parcial) y/o de traumatismo.

En un aspecto preferente, la presente invención se refiere a una composición que comprende células germinales adiposas humanas para su uso en la prevención, mejoría o tratamiento de enfermedades hepáticas agudas o crónicas. Además, dicha composición es para su uso en un método para la prevención, mejoría o tratamiento de enfermedades hepáticas agudas o crónicas, que comprende administrar dicha composición a un sujeto que lo necesite.

El término “composición”, como se usa en el presente documento, significa una composición que comprende células germinales adiposas humanas que pueden utilizarse para la prevención, mejoría o tratamiento de las enfermedades hepáticas agudas o crónicas. Por lo tanto, en una realización preferente de la presente invención, la composición de la invención está destinada al uso en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para su uso en la ingeniería de tejidos y en la terapia celular. Un experto en la materia apreciará que la composición detallada en el presente documento puede implicar el uso de las progenitoras de las células germinales adiposas humanas, de las células germinales

adiposas humanas en su forma no diferenciada o diferenciada, de células germinales adiposas humanas genéticamente modificadas, de líneas celulares de las mismas, las poblaciones celulares que las comprenden, así como la progenie de las mismas, incluyendo la progenie diferenciada o no diferenciada o los derivados genéticamente modificados de las mismas. Como se indicó anteriormente, estas células pueden utilizarse, por ejemplo, para terapias de reemplazo celular, en las que el hígado afectado se injerta y se repuebla con las células germinales adiposas, para recuperar la función hepática del receptor. Las células pueden administrarse a un tejido de interés en un sujeto, preferentemente tejido hepático, para complementar las células en funcionamiento o reemplazar células que han perdido su función. Preferentemente, dicho sujeto es un ser humano. Como alternativa, también se contemplan células germinales adiposas humanas diferenciadas, en las que las células progenitoras o germinales adiposas humanas se aíslan, se diferencian *in vitro* en presencia de factores de diferenciación y/o crecimiento y se administran a un sujeto, como se detalla en el presente documento. Las enfermedades o deficiencias que se caracterizan por la pérdida de masa y/o función hepática, y que podrían beneficiarse de las células progenitoras y/o germinales adiposas humanas como se describe en el presente documento, incluyen a las enfermedades del hígado (o hepáticas) agudas o crónicas.

La expresión “célula germinal” como se usa en el presente documento se refiere a una célula progenitora que tiene la capacidad de autorrenovación, es decir, que puede proliferar sin diferenciación, por lo que la progenie de una célula germinal o al menos parte de la misma conserva sustancialmente el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, el potencial de diferenciación y la capacidad de proliferación de la célula germinal madre. La expresión abarca células germinales que tienen la capacidad de una autorrenovación sustancialmente ilimitada, es decir, en las que la capacidad de la progenie o de parte de la misma para una proliferación adicional no está sustancialmente reducida en comparación con la célula madre, así como las células germinales que presentan una autorrenovación limitada, es decir, en la que la capacidad de la progenie o de parte de la misma para una proliferación adicional está reducida de forma demostrable en comparación con la célula madre. Las células germinales también comprenden preferentemente células germinales mesenquimáticas. Las células germinales preferentes son las células germinales adiposas. Las células germinales, cuando se utilizan en el presente documento, abarcan preferentemente células germinales adultas, pero también células germinales procedentes de bibliotecas/bancos de células germinales, solo por nombrar algunos ejemplos no exhaustivos.

Un experto en la materia sabe que las propiedades anteriores se refieren en general al comportamiento *in vivo* de las células progenitoras y germinales, y que pueden, en condiciones apropiadas, multiplicarse completamente o al menos en parte *in vitro* y/o *ex vivo*.

A base de la capacidad para dar lugar a diversos tipos celulares, una célula progenitora o germinal puede habitualmente describirse como totipotente, pluripotente, multipotente o unipotente, siendo preferentes las últimas tres opciones. Una célula “totipotente” individual se define como capaz de crecer, es decir, de desarrollarse, a un organismo completo. Una célula germinal “pluripotente” no tiene la capacidad de crecer a un organismo completo, pero tiene la capacidad de dar lugar a tipos celulares que se originan a partir de las tres capas germinales, es decir, mesodermo, endodermo y ectodermo, y pueden tener la capacidad de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo. Una célula “multipotente” tiene la capacidad de dar lugar a al menos un tipo celular de cada uno de dos o más órganos o tejidos distintos de un organismo, en los que dichos tipos celulares pueden originarse a partir de las mismas o de distintas capas germinales, pero no tiene la capacidad de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo. Una célula “unipotente” tiene la capacidad de diferenciarse a células de un solo linaje celular. Una célula germinal “pluripotente” tiene el potencial de diferenciarse a cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo o ectodermo. El término “pluripotente” también incluye células germinales pluripotentes inducidas (iPS, forma siglada de *induced pluripotent stem cells*) que son conocidas en la técnica. Las iPS pertenecen a una realización particularmente preferente de la invención.

Por consiguiente, la expresión “célula germinal adiposa” como se usa en el presente documento indica un tipo celular multipotente obtenido originalmente a partir de tejido adiposo. El experto en la materia apreciará que la composición detallada en el presente documento puede implicar el uso de la progenitora de las células germinales adiposas humanas, las células germinales adiposas humanas en su forma no diferenciada o en una forma diferenciada, células germinales adiposas humanas genéticamente modificadas, líneas celulares de las mismas, poblaciones celulares que las comprendan, así como la progenie de las mismas, incluyendo la progenie diferenciada o no diferenciada o los derivados genéticamente modificados de las mismas. Sin embargo, preferentemente las células germinales adiposas son células no diferenciadas.

Cuando se cultivan, las células germinales adiposas se cultivan preferentemente en un medio que contiene suero. El suero es preferentemente suero humano, más preferentemente suero humano autólogo, es decir, suero del sujeto del cual preceden las células germinales. En una realización preferente, las células se cultivan en ausencia de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Como alternativa, sin embargo también es preferente que las células germinales adiposas no se cultiven, es decir, las células germinales adiposas obtenidas de un sujeto no se cultivan pero después de que estas células se obtienen, por ejemplo, a partir de un sujeto se aplican posteriormente en las composiciones, usos y métodos como se describe en el presente documento. Sin embargo, las células germinales adiposas pueden, por ejemplo, lavarse después de que se han obtenido, por ejemplo, de un sujeto.

Aunque las células germinales adiposas pueden cultivarse sobre una matriz, es preferente en el contexto de la

presente invención que las células germinales adiposas no se cultiven sobre una matriz extracelular. También es preferente que las células germinales adiposas de la presente invención no estén encapsuladas, por ejemplo, utilizando un aparato de generación de perlas electroestáticas después de mezclar las células en una solución de alginato de sodio, como se describe en el documento WO 2007/127698, página 9, párrafo [0039]. Además, es preferente que las células germinales adiposas de la presente invención no estén unidas a perlas microsoporte tales como Cytodex3 de Amersham Pharmacia, como se describe en el documento WO 2007/127698, en la página 9, párrafo [0040].

Por ejemplo, las células germinales adiposas incluyen, pero sin limitación a ello, células vasculares-estromales obtenidas de tejido adiposo, que son células precursoras/progenitoras. Las células germinales adiposas también incluyen preadipocitos o células intersticiales obtenidas de tejido adiposo, células germinales obtenidas de tejido adiposo, células germinales de adipocitos, células progenitoras endoteliales, células germinales hematopoyéticas o células germinales mesenquimáticas. La expresión "tejido adiposo" como se usa en el presente documento significa tejido adiposo o grasa corporal o depósito de grasa que es tejido conectivo laxo compuesto de, entre otros, adipocitos y células germinales adiposas.

Sin ligarse a teoría alguna, se asume que las células germinales procedentes de tejido adiposo se convierten en preadipocitos, los cuales se convierten después adipocitos. Por consiguiente, el tejido adiposo comprende células germinales, preadipocitos y/o adipocitos. También comprende lipoblastos. En los seres humanos el tejido adiposo está emplazado, por ejemplo, debajo de la piel, alrededor de órganos internos, en la médula ósea y en el tejido mamario.

El tejido adiposo se encuentra en emplazamientos específicos que se denominan "depósitos adiposos". El tejido adiposo contiene varios tipos celulares, con el mayor porcentaje de células que son adipocitos que contienen gotitas de grasa. Otros tipos celulares incluyen fibroblastos, macrófagos, células del endotelio y células germinales adiposas. Las células germinales adiposas pueden prepararse y cultivarse de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, las células germinales adiposas pueden aislarse mediante troceado/triturado mecánico de, por ejemplo, lóbulos grasos y/o tejido graso, seguido de digestión enzimática tales como con colagenasa. El tejido graso o los lóbulos grasos pueden, por ejemplo, aislarse y/o separarse de los tejidos adiposos mediante liposucción, precipitación, tratamiento con una enzima, tal como colagenasa y la eliminación del sobrenadante, como los glóbulos rojos a través de centrifugación, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2005/042730. En los siguientes ejemplos también se muestran el aislamiento a partir de tejidos adiposos, el cultivo y la diferenciación de células germinales adiposas. Es más preferente que la célula germinal adiposa como se define en el presente documento sea una célula germinal adiposa humana, es decir, obtenida de un ser humano. Las células germinales adiposas de la composición de la invención pueden utilizarse solas o en combinación con otras células germinales mesenquimáticas, tales como, por ejemplo, células progenitoras endoteliales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula aislada" se refiere en general a una célula que no está asociada con una o más células, o uno o más componentes celulares, con los que la célula está asociada *in vivo*. Por ejemplo, una célula aislada puede haberse retirado de su entorno nativo, o puede ser el resultado de la propagación, por ejemplo, la propagación *ex vivo* de una célula que se ha retirado de su entorno nativo. Preferentemente, la célula germinal adiposa como se usa en el presente documento es una célula germinal adiposa aislada. Por ejemplo, las células germinales adiposas pueden aislarse de tejido adiposo, por ejemplo, tejido adiposo subcutáneo o peritoneal, u otro tejido adecuado que comprende células germinales adiposas. Preferentemente, las células germinales adiposas se aíslan de un ser humano.

La expresión "*in vitro*" como se utiliza en el presente documento indica fuera de, o de forma externa a, un animal o, preferente, un cuerpo humano. La expresión "*in vitro*" como se usa en el presente documento debería entenderse que incluye "*ex vivo*". La expresión "*ex vivo*" normalmente se refiere a tejidos o células extraídas de un animal o cuerpo humano y mantenidas o propagadas fuera del cuerpo, por ejemplo, en un recipiente de cultivo.

La expresión "población celular" como se usa en el presente documento se refiere en general a un agrupación de células. A menos que se indique otra cosa, la expresión se refiere a un agrupación de células que consiste en o que comprende células germinales adiposas aisladas como se define en el presente documento. Una población celular puede consistir en células que tienen un fenotipo común o puede comprender al menos una fracción de células que tienen un fenotipo común. Se dice que las células tienen un fenotipo común cuando son sustancialmente similares o idénticas en una o más características demostrables, incluyendo, pero sin limitación, el aspecto morfológico, la presencia, la ausencia o el nivel de expresión de componentes o productos celulares particulares, por ejemplo, ARN, proteínas, marcadores específicos de células u otras sustancias, la actividad de determinadas rutas bioquímicas, la capacidad y/o cinética de proliferación, el potencial de diferenciación y/o la respuesta a las señales de diferenciación o el comportamiento durante el cultivo *in vitro*, por ejemplo, la adherencia, la no adherencia, el crecimiento en monocapa, la cinética de proliferación o similares. Tales características demostrables pueden, por lo tanto, definir una población celular o una fracción de la misma.

Cuando en el presente documento se dice que una población celular es "heterogénea", esto en general indica una población celular que comprende dos o más células o fracciones de células que no tienen un fenotipo común, por

ejemplo, una población celular que comprende células de dos o más tipos celulares distintos. A modo de ejemplo y sin limitación, una población celular heterogénea puede aislarse a partir de tejido adiposo o de grasa corporal o de depósito de grasa, y puede comprender diversos tipos celulares incluyendo, pero sin limitación, células germinales adiposas, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales.

5 Cuando en el presente documento se dice que una población celular es homogénea, esta consiste en células que tienen un fenotipo común. Una población celular que se dice en el presente documento que es “sustancialmente homogénea” comprende una mayoría sustancial de células que tiene un fenotipo común. Una población celular “sustancialmente homogénea” puede comprender al menos el 70 %, al menos el 80 %, preferentemente al menos el 10 90 %, al menos el 95 % o incluso al menos el 99 % de células que tienen un fenotipo común, tal como el fenotipo denominado en concreto, por ejemplo, el fenotipo de células germinales adiposas humanas como se define en el presente documento o progenitoras de células germinales adiposas humanas como se define en el presente documento. Como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente homogénea” abarca también una población homogénea.

15 La expresión “población celular que comprende células germinales adiposas humanas o progenitoras de las mismas” se refiere a una población celular como se define en el presente documento que comprende al menos una célula progenitora o germinal adiposa humana, y normalmente una fracción de células progenitoras o células germinales adiposas humanas, como se define en el presente documento. Habitualmente, las células progenitoras o 20 germinales adiposas humanas de dicha fracción pueden tener un fenotipo común.

La expresión “célula progenitora” se refiere en general a una célula no especializada o relativamente menos especializada y con capacidad de proliferación, la cual, o la progenie de la cual, puede dar lugar a al menos un tipo 25 celular relativamente más especializado. A modo de ejemplo y sin limitación, una célula progenitora puede dar lugar a descendientes que pueden diferenciarse a lo largo de uno o más linajes, para producir de forma creciente células relativamente más especializadas, en la que tales descendientes y/o células de forma creciente relativamente más especializadas se convierten en células progenitoras, o incluso para producir células diferenciadas de forma terminal, es decir, células completamente especializadas, que pueden ser posmitóticas. La expresión también abarca células germinales como se define en el presente documento.

30 Se dice que una célula progenitora “da lugar” a otra célula relativamente más especializada, a modo de ejemplo y sin limitación, la célula progenitora se diferencia para convertirse en la otra célula sin experimentar primero una división celular, o la otra célula se produce después de uno o más ciclos de división celular y/o la diferenciación de la célula progenitora o de la progenie de la misma.

35 Los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento” como se usan en el presente documento indican la mejora o incluso la eliminación de uno o más síntomas asociados con una enfermedad hepática aguda o crónica como se define en el presente documento, mediante la administración de una composición de la invención que comprende células germinales adiposas humanas a un sujeto que lo necesite.

40 El término “mejoría” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier mejora de la enfermedad de un paciente que tiene una enfermedad hepática aguda o crónica especificada en el presente documento, mediante la administración de una composición de la invención que comprende células germinales adiposas humanas a un sujeto que lo necesite. Tal mejora también puede verse como un enlentecimiento o la detención de la progresión de 45 la enfermedad de un paciente que tiene una enfermedad hepática aguda o crónica expuesta en el presente documento.

El término “prevención” como se usa en el presente documento significa evitar la aparición o la reaparición de una enfermedad hepática como se especifica en el presente documento, mediante la administración de una composición 50 de la invención que comprende células germinales adiposas humanas a un sujeto que lo necesita.

Utilizando la composición de la invención que comprende las células germinales adiposas descritas en el presente documento, puede lograrse de forma ventajosa la regeneración del hígado, la cicatrización acelerada después de la resección parcial del hígado, la recuperación acelerada o aumentada de la función hepática en la insuficiencia 55 hepática o un riesgo reducido de aparición de disfunciones hepáticas o de un deterioro hepático, o un efecto reducido de las enfermedades metabólicas. Al mismo tiempo se minimizan los efectos adversos en comparación con las terapias convencionales, tales como el trasplante de hígado. La resección o resección parcial del hígado puede opcionalmente estar precedida de la embolización de la vena porta.

60 La expresión “enfermedad hepática” como se usa en el presente documento se refiere a un trastorno hepático. En general, una enfermedad hepática puede estar provocada por cualquier afección que da como resultado la alteración de la integridad morfológica y/o funcional del hígado. La etiología y el tratamiento de las enfermedades hepáticas se describen, por ejemplo, en Oxford Textbook of Medicine (Warrell, Oxford Textbook of Medicine) David A. Warrell, Timothy M. Cox, John D. Firth, Oxford University Press, EUA; 5ª edición (22 de julio de 2010) y Johns Hopkins Internal Medicine Board Review 2010-2011: Certification and Recertification: Expert Consult - En línea e impreso 65 (Redonda Miller, Bimal Ashar MD, Stephen Sisson, Johns Hopkins Hospital Mosby; 3ª edición (2 de marzo de 2010).

La expresión “enfermedad hepática aguda” como se usa en el presente documento significa la aparición de complicaciones graves de forma rápida tras los primeros signos de enfermedad hepática, tal como ictericia, e indica que el hígado tiene un daño sostenido. Las complicaciones son, por ejemplo, encefalopatía hepática y síntesis de proteínas alterada, medido, por ejemplo, por los niveles de seroalbúmina y el tiempo de la protrombina en sangre. La clasificación de 1993 define hiperagudo como dentro de 1 semana, agudo como 8-28 días y subagudo como 4-12 semanas (Williams *et al.*, 1993, Lancet 342, 273). Esto refleja el hecho de que el ritmo de la evolución de la enfermedad influye fuertemente en el pronóstico. La etiología subyacente es otro determinante significativo de la valoración (Grady 2005, Postgrad Med J 81, 148). La “falla hepática aguda” se produce cuando el hígado pierde rápidamente su capacidad de funcionar. La insuficiencia hepática aguda es una enfermedad multisistémica compleja que evoluciona rápidamente después de una agresión catastrófica del hígado que conduce al desarrollo de encefalopatía. Mientras que, de forma más frecuente, la insuficiencia hepática evoluciona lentamente a lo largo del transcurso de años, en la insuficiencia hepática aguda la falla hepática evoluciona en cuestión de días. La etiología subyacente y el ritmo de progresión influyen fuertemente en la evolución clínica. Las causas comunes son, por ejemplo, el paracetamol, las reacciones farmacológicas idiosincrásicas, la hepatitis B y la hepatitis seronegativa, las amatoxinas o falotoxinas, ambas de las especies de *Amanita*.

La expresión “enfermedad hepática crónica” como se usa en el presente documento indica un proceso patológico del hígado que implica la destrucción progresiva y la regeneración del parénquima hepático, lo que conduce a fibrosis y cirrosis. Las causas de la enfermedad hepática crónica pueden ser cualquier afección que de cómo resultado la degradación y la renovación de las células del tejido en un hígado. Este proceso habitualmente da como resultado fibrosis o cirrosis, y puede ser potencialmente fatal en los casos de insuficiencia hepática crónica. La clasificación de las fuentes de enfermedades hepáticas crónicas se divide en cinco agrupamientos: (i) causas víricas tales como la hepatitis B y C, o el citomegalovirus o el virus de Epstein Barr, (ii) causas metabólicas tales como la hemocromatosis, la enfermedad del hígado graso no alcohólico o la enfermedad Wilson, (iii) las causas por respuesta autoinmunitaria tal como la hepatitis crónica autoinmunitaria, la cirrosis biliar primaria o la colangitis esclerosante primaria, (iv) causas relacionadas con toxinas tales como la enfermedad hepática alcohólica o la nitrofurantoína, la amiodarona o el metotrexato, y (v) otras causas diversas tales como la insuficiencia cardíaca derecha. Sin embargo, la causa principal de las enfermedades hepáticas crónicas es al consumo excesivo de alcohol, lo que conduce a cirrosis y hepatitis. Por lo tanto, el grupo de riesgo más alto son las personas que son propensas al abuso del alcohol. Los síntomas asociados con las enfermedades hepáticas crónicas dependen del nivel de degeneración en el hígado.

Las fases iniciales son habitualmente asintomáticas y solo pueden detectarse por pruebas médicas específicas, como se define en otros lugares en el presente documento. Las enfermedades hepáticas que se han transformado en hepatitis pueden reconocerse por confusión mental, ictericia grave, problemas de coagulación sanguínea o hemorragia intestinal. Los casos que han alcanzado el nivel de cirrosis pueden apreciarse por lo siguiente: problemas nerviosos, crecimiento del pecho masculino, contracciones de Dupuytren, alopecia, insuficiencia renal, eritema de las palmas, inapetencia, contracción testicular, debilidad, pérdida de peso, prurito, cálculos biliares y ascitis. La cirrosis se considera como una posible fase final de muchas enfermedades hepáticas y se produce cuando el tejido hepático sano se daña y es reemplazado por tejido cicatricial. El proceso de reemplazo no sucede de inmediato, sino que tiene lugar a lo largo de un curso de tiempo gradual. El nuevo tejido cicatrizado impide la regeneración o la curación de las células hepáticas. El hígado perderá la capacidad de funcionar dado que a medida que el tejido cicatrizado se extiende. Alrededor del 10 % de los bebedores empedernidos a la larga alcanzarán la fase de cirrosis. Se cree que la cirrosis se alcanza en general tras diez años o más de un elevado consumo de alcohol. Desafortunadamente, una vez que el paciente tiene daño sostenido del hígado, el daño no es reversible. Sin embargo, la composición de la invención que comprende células germinales adiposas humanas puede utilizarse de forma ventajosa para la mejoría y el tratamiento de las enfermedades hepáticas agudas o crónicas.

El término “sujeto” como se usa en el presente documento incluye un mamífero tal como una rata, cerdo, vacuno, caballo, oveja, en particular un ser humano.

En un ejemplo comparativo que utiliza un modelo de daño hepático tóxico crónico en ratas, los inventores han investigado la capacidad del tejido hepático patológico de incorporar células germinales adiposas trasplantadas. Por la aplicación intraperitoneal repetitiva de retrorsina y alialcohol, se inhibió la proliferación endógena de hepatocitos y se generó necrosis hepática. Desde el punto de vista histológico, el daño hepático debido al alialcohol es periportal y se asemeja a la insuficiencia hepática vírica, que es la causa más frecuente de esta insuficiencia orgánica en seres humanos. Para simular una reducción del tejido hepático funcional y estimular la regeneración, se realizó una hepatectomía de dos tercios. Las células germinales adiposas humanas se inyectaron directamente en uno de los lóbulos hepático restantes. Como se menciona en otros lugares en el presente documento, la administración directa de células germinales adiposas resultó ser decisiva para una implantación satisfactoria y la regeneración hepática. De hecho, la técnica anterior tal como Banas *et al.*, citado anteriormente, enseña la administración de células germinales adiposas a través de la vena de la cola de ratones. Se aplicó ciclosporina para conseguir la inmunotolerancia frente a células germinales alogénicas. Cada semana después de la cirugía se extrajeron muestras de sangre para determinar múltiples valores sanguíneos correlacionados con el hígado. Dos, cuatro, seis, ocho y doce semanas después de la cirugía, se sacrificaron los animales y se analizaron cortes histológicos. Los inventores descubrieron que las células germinales adiposas humanas elevaron de forma significativa los niveles de albúmina

postoperatoria y de proteínas totales. Las células trasplantadas podían encontrarse hasta ocho semanas poscirugía en cortes histológicos, migrando del centro del lóbulo a la periferia. No había eliminación de células germinales adiposas humanas por parte de macrófagos. De nuevo, este éxito está en contraste con la técnica anterior tal como Banas *et al.*, citado anteriormente, quienes no pudieron observar células germinales en el hígado. Más bien, estos  
 5 autores observaron que las células germinales estaban, por ejemplo, en el conducto biliar, lo que es una indicación de que las células germinales no alcanzaron el hígado o fueron eliminadas del mismo. Los datos de la invención demuestran que el uso terapéutico de las células germinales adiposas humanas proporciona una alternativa interesante al trasplante de hepatocitos o de hígado en pacientes con insuficiencia hepática grave, en particular a la luz del hecho de que la cirrosis hepática es la causa más importante de insuficiencia hepática crónica en los seres  
 10 humanos y en vista de la persistente falta de órganos de donante y el riesgo concomitante en los alotrasplantes.

En resumen, en contraste con la técnica anterior, tal como Banas, citado anteriormente, los presentes inventores observaron una supervivencia a largo plazo de las células germinales, así como la proliferación y, por lo tanto, la regeneración hepática. Por lo tanto, sin ligarse a teoría alguna, la vía de administración de las células germinales  
 15 adiposas parece desempeñar un papel importante. Esto también puede deducirse a partir de un estudio clínico que se detuvo. En particular se suspendió un ensayo clínico (identificador NCT01062750 "Terapia de regeneración hepática por la administración arterial intrahepática de células estromales obtenidas de tejido adiposo autólogo"). En este ensayo, se administraron a pacientes células germinales adiposas a través de cateterización arterial intrahepática. Sin embargo, aparentemente no se observó éxito en pacientes de cirrosis hepática. Por lo tanto, otra vez la vía de administración aplicada en este estudio es distinta de la vía escogida por los presentes inventores, y los presentes inventores observaron un éxito.

Las ventajas adicionales de los medios y métodos de la presente invención pueden resumirse brevemente como sigue: el tejido adiposo humano como una fuente potencial de células germinales adiposas está disponible de forma  
 25 casi ubicua. Las células germinales adiposas son fáciles de aislar, como se describe en el presente documento. Adicionalmente, la recogida de tejido adiposo mediante, por ejemplo, liposucción, en general no provoca un daño importante al sujeto. Las células germinales adiposas sobreviven durante más tiempo en cultivo y tienen una actividad de proliferación más alta en comparación con las células germinales obtenidas de médula ósea (CGMO). Además, las CGMO han mostrado ser un componente crucial en el desarrollo de la fibrosis hepática durante la lesión hepática, presumiblemente debido a la mediación de la interleucina 10 (Lan *et al.*, 2008, *Transpl Int* 21, 58192). Por el contrario, los inventores no observaron evidencia de una fibrosis hepática potenciada en ratas tratadas con células germinales adiposas. Las células germinales adiposas pueden cultivarse o crioconservarse. Además, las células germinales adiposas pueden utilizarse en una forma diferenciada o no diferenciada, o (pre-) diferenciada, o pueden utilizarse en una forma genéticamente modificada, aunque es preferente la forma no  
 30 diferenciada. De forma ventajosa, las células germinales adiposas como se describe en el presente documento pueden utilizarse para (i) la regeneración del hígado afectado, (ii) la cicatrización acelerada tras la resección parcial del hígado, (iii) una recuperación acelerada o aumentada de la función del hígado en la insuficiencia hepática, (iv) la mediación de un riesgo reducido de aparición de insuficiencias hepáticas y/o (v) conferir un efecto reducido de los trastornos metabólicos. Al mismo tiempo, los efectos secundarios negativos se minimizan mediante el tratamiento de las enfermedades hepáticas con células germinales adiposas, en comparación con las terapias convencionales, tales como el trasplante de hígado. Por ejemplo, las células germinales adiposas autólogas como se definen en el presente documento pueden utilizarse para tratar la enfermedad hepática de un paciente, evitando de este modo una respuesta inmunitaria frente a las células germinales terapéuticas. A la luz de lo anterior, las células germinales  
 40 adiposas representan un modo más sencillo, más eficaz y más seguro que el trasplante de un órgano entero para curar pacientes que padecen enfermedades hepáticas. Sin ligarse a teoría alguna, los beneficios funcionales de las células germinales adiposas pueden deberse al soporte funcional de las células trasplantadas o inyectadas. La fusión con hepatocitos hospedadores no está excluida. Asimismo, son posibles el soporte y la activación de progenitores endógenos.

Un asunto relacionado con el uso terapéutico de las células germinales adiposas humanas o los progenitores de las mismas, es la cantidad de células necesaria para conseguir un efecto óptimo. La dosificación para la administración puede ser variable, puede incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores y un técnico en la materia puede determinarla provisto de la presente divulgación. Normalmente, la dosis o dosificación administrada proporcionará una cantidad terapéuticamente eficaz de células, es decir, una que logre el efecto y desempeño  
 55 locales o sistémicos deseados. En los estudios en seres humanos de células de médula ósea mononucleares autólogas se han utilizado con resultados alentadores dosis empíricas que varían de 1 a  $4 \times 10^7$  células. Sin embargo, distintos escenarios pueden requerir una optimización de la cantidad de células germinales adiposas humanas o de progenitoras administradas, por lo tanto la cantidad de células a administrar variará para el sujeto a tratar. En una realización preferente, pueden administrarse a un sujeto humano entre  $10^2$  y  $10^9$ , o entre  $10^3$  y  $10^9$ , o entre  $10^4$  y  $10^9$ , tal como entre  $10^4$  y  $10^8$ , o entre  $10^5$  y  $10^7$ , por ejemplo aproximadamente  $1 \times 10^5$ , aproximadamente  $5 \times 10^5$ , aproximadamente  $1 \times 10^6$ , aproximadamente  $2 \times 10^6$ , aproximadamente  $5 \times 10^6$ , aproximadamente  $1 \times 10^7$ , o aproximadamente  $2 \times 10^7$ , aproximadamente  $3 \times 10^7$ , aproximadamente  $4 \times 10^7$ , aproximadamente  $5 \times 10^7$ , aproximadamente  $6 \times 10^7$ , aproximadamente  $7 \times 10^7$ , aproximadamente  $8 \times 10^7$ , aproximadamente  $9 \times 10^7$  o aproximadamente  $1 \times 10^8$  células. Incluso más preferente, el número de células germinales adiposas a administrar al paciente es suficiente para repoblar al menos el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o el 25 % o más, tal como el 30,  
 65 35, 40, 45, 50 % o incluso más, tal como más del 50 % de la masa hepática del paciente. Sin embargo, la

determinación precisa de una dosis terapéuticamente eficaz puede basarse en factores individuales de cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, tamaño de daño tisular y el tiempo desde que se produjo el daño, y un experto en la materia puede determinarla fácilmente a partir de la presente divulgación y del conocimiento en la técnica.

5 Preferentemente, la pureza de las células germinales adiposas humanas o de las progenitoras de las mismas, o de una población celular que comprende dichas células para la administración, puede ser aproximadamente menor de aproximadamente el 50 %, el 50 a aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 55 a aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 65 a aproximadamente el 70 %. Más preferentemente, la pureza puede ser aproximadamente del 70 a aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 75 a aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 85 % y muy preferentemente la pureza puede ser de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 95 % y aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 100 %. La pureza de las células germinales adiposas puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con el perfil de marcadores de superficie celular dentro de una población celular, expuesto en el presente documento. Para la determinación de la pureza de las células germinales adiposas, puede llevarse a cabo un análisis, por ejemplo, de FACS. Un experto en la materia puede ajustar fácilmente las dosificaciones. Por ejemplo, una pureza inferior puede requerir un aumento de la dosificación.

20 El experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de células y los aditivos, vehículos y/o transportadores opcionales en las composiciones de la invención. Normalmente, cualquier aditivo (además de la célula (o células) progenitora o germinal adiposa activa, y/o de citocina (o citocinas)) puede estar presente en una solución en una cantidad del 0,001 al 50 % (p/p o p/v) en solución salina tamponada con fosfato y normalmente el principio activo puede estar presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como aproximadamente del 0,0001 a aproximadamente el 5 % (p/p o p/v), preferentemente aproximadamente del 0,0001 a aproximadamente el 1 %, muy preferentemente aproximadamente del 0,0001 a aproximadamente el 0,05 % o aproximadamente del 0,001 a aproximadamente el 20 %, preferentemente aproximadamente del 0,01 a aproximadamente el 10 % y muy preferentemente aproximadamente del 0,05 a aproximadamente el 5 %.

30 Cuando se administra una composición terapéutica de la presente invención, esta puede formularse en general en una forma farmacéutica unitaria inyectable o trasplantable (por ejemplo, solución, suspensión, dispersión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones y dispersiones acuosas estériles. Como se usa en el presente documento, las soluciones o dispersiones incluyen un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células germinales adiposas permanezcan viables, tal como suero o medio de cultivo, por ejemplo, como se describe en el presente documento. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión farmacéuticamente aceptable que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, polioli (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

40 De forma adicional, pueden añadirse diversos aditivos que potencien la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, penicilina, estreptomycin y similares.

45 En muchos casos, será conveniente incluir agentes isotónicos para asegurar la viabilidad de las células, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La isotonicidad deseada de la composición de la presente invención puede lograrse utilizando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. Es preferente el cloruro de sodio, en particular para tampones que contienen iones de sodio.

50 Para aumentar potencialmente la supervivencia celular cuando se introducen las células progenitoras o germinales, o la progenie diferenciada de interés de las mismas, en un sujeto que lo necesite, puede incorporarse o incluir dichas células en un biomaterial, que comprenda preferentemente una matriz, que comprenda, por ejemplo, un biopolímero o un polímero sintético. Los ejemplos de biopolímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno, proteoglicanos, quitosano, alginato y ácido hialurónico. Un ejemplo de polímero sintético es el polietilenglicol. Esto podría elaborarse con o sin citocinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación o construcciones de expresión de ácido nucleico incluidos, etc. Tales polímeros podrían estar, por ejemplo, en suspensión o podrían formar un gel tridimensional con las células incluidas en el. Preferentemente, tales polímeros pueden ser biodegradables. Algunas realizaciones preferentes de la invención abarcan también combinaciones de distintos polímeros.

60 La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede efectuarse mediante el uso de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención cualquier vehículo, diluyente o aditivo utilizado tendría que ser compatible con las células progenitoras o germinales adiposas.

65 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando las células germinales adiposas utilizadas en

la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado, con diversas cantidades de los otros ingredientes, si se desea.

5 Tales composiciones pueden adicionalmente estar en combinación con un transportador, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, aditivos potenciadores de la gelificación o la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes, colores y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada.

10 Para preparar preparaciones adecuadas sin excesiva experimentación pueden consultarse textos de referencia, tales como "Remington's pharmaceutical science", 17ª edición, 1985.

15 La viscosidad de la composición de la invención, si se desea, puede mantenerse en el nivel seleccionado utilizando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. La metilcelulosa es preferente debido a que está disponible de forma fácil y económica, y es fácil trabajar con ella. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. La concentración preferente del espesante dependerá del agente seleccionado. El punto es utilizar una cantidad que logre la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas se preparan normalmente a partir de soluciones mediante la adición de tales agentes espesantes.

20 La presente invención también se refiere a un método para la prevención, mejoría o tratamiento de una enfermedad hepática aguda o crónica, que comprende administrar a un sujeto, en especial un ser humano, que lo necesite, células germinales adiposas humanas en su forma no diferenciada o en una forma diferenciada, o una progenitora de células germinales adiposas humanas, líneas celulares de las mismas o poblaciones celulares que comprenden  
25 tales células germinales adiposas humanas indiferenciadas o diferenciadas, opcionalmente genéticamente modificadas. Tal administración normalmente está en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en general una cantidad que proporciona un efecto o desempeño local o sistémico deseado. En otra realización preferente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células germinales adiposas humanas en su forma no diferenciada o en una forma diferenciada, o una progenitora de células germinales adiposas humanas,  
30 líneas celulares de las mismas o poblaciones celulares que comprenden tales células germinales adiposas humanas indiferenciadas o diferenciadas, de forma opcional genéticamente modificadas. Preferentemente, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento, mejoría o prevención de enfermedades hepáticas agudas o crónicas, como se define en el presente documento. La célula germinal adiposa como se define en el presente documento se administra mediante una infusión o inyección intraperitoneal. Preferentemente, las células germinales se administran sin encapsulación o unión a un microsoporte. Por lo tanto, las células germinales se administran preferentemente cuando están en solución. La administración puede, en otra realización preferente, sustentarse mediante técnicas de formación de imágenes tales como ecografía, tomografía por resonancia magnética o tomografía computarizada. Las células pueden proporcionarse como una suspensión celular en cualquier medio de conservación, preferentemente que contenga albúmina humana, tras el procedimiento de aislamiento o tras la descongelación  
40 después de crioconservación.

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

45 En otra realización preferente de la composición de la invención, la enfermedad hepática aguda o crónica se selecciona del grupo que consiste en: isquemia hepática, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, enfermedad hepática por alcohol, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, obstrucción de del conducto colédoco, insuficiencia hepática crónica, hepatitis crónica, cirrosis, enfermedad hepática colestásica, enfermedad quística del hígado, hepatomegalia, hígado graso, galactosemia, cálculos biliares, síndrome de Gilbert,  
50 hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, adenoma hepático, cáncer hepático, hemangioma hepático, nódulo hepático (hiperplasia nodular focal), hepatitis neonatal, enfermedad hepática no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, infección parasitaria, porfiria, trombosis de la vena porta, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, esteatohepatitis, hepatitis tóxica, tirosinemia, enfermedad del almacenamiento de glucógeno de tipo I, hepatitis vírica, enfermedad de Wilson, daño  
55 hepático inducido por medicamentos, daño hepático inducido por una toxina o cualquier combinación de las mismas. Además, la composición de la invención es particularmente adecuada para la mejoría o el tratamiento de trastornos hepáticos adquiridos debidos a infecciones víricas o a insuficiencia hepática debida a la pérdida de células o tejido hepático tal como la provocada, por ejemplo, por lesión o cirugía.

60 Por consiguiente, en otra realización preferente, las células germinales adiposas humanas, las progenitoras de células germinales adiposas humanas, las líneas celulares de las mismas o las poblaciones celulares que comprenden tales células germinales adiposas humanas indiferenciadas o diferenciadas, de forma opcional genéticamente modificadas, como se detalla en el presente documento, para su uso en terapia y/o el uso de las mismas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades hepáticas agudas o crónicas.  
65 Tales enfermedades pueden incluir trastornos que afectan al tejido hepático. Se contemplan de forma específica las enfermedades que afectan la viabilidad y/o función hepatocítica y pueden representar, por ejemplo, anomalías

congénitas, enfermedades hepáticas adquiridas, daño hepático inducido por terapia, el efecto de una enfermedad, el efecto de un traumatismo, efectos tóxicos o infecciones víricas. Se contemplan de forma específica las enfermedades hepáticas enumeradas en la presente memoria descriptiva. La administración de las células germinales adiposas humanas de acuerdo con la invención puede conducir a la reconstitución y/o regeneración del tejido hepático en el sujeto y/o el alivio de los síntomas de una enfermedad hepática, tal como una descrita en el presente documento. De forma más concreta, utilizando la composición de la invención que comprende las células germinales adiposas descritas en el presente documento, puede lograrse la regeneración del hígado, la cicatrización acelerada tras la resección parcial del hígado, la recuperación acelerada o aumentada de la función hepática en la insuficiencia hepática o un riesgo reducido de aparición de disfunciones hepáticas o de deterioro hepático, o un efecto reducido de las enfermedades metabólicas. Las células se administran de una manera que les permita injertarse y migrar al sitio tisular pretendido, y reconstituir o regenerar la zona del hígado funcionalmente deficiente.

En una realización preferente de la composición de la invención, la célula germinal adiposa se aísla de tejido adiposo humano o de cualquier otra fuente adecuada que comprenda células germinales adiposas.

El aislamiento de células germinales adiposas es bien conocido en la técnica y se especifica adicionalmente en otros lugares en el presente documento. Por ejemplo, las células germinales adiposas pueden aislarse a partir de tejido adiposo subcutáneo o peritoneal, o de otro tejido humano adecuado. Normalmente, las células germinales adiposas se aíslan mediante un tratamiento con colagenasa, de forma opcional en combinación con dispasa y/o tripsina.

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

El término célula germinal adiposa “autóloga” como se utiliza en el presente documento significa que la célula germinal adiposa procede del mismo individuo. En esta realización preferente, la presente invención contempla de forma ventajosa el uso de un tejido del propio paciente, tal como tejido adiposo u otro tejido adecuado, para aislar las células germinales adiposas humanas o las progenitoras de células germinales adiposas humanas. Tales células serían autólogas para el paciente y podrían administrarse fácilmente al paciente, sin suscitar una respuesta inmunitaria y/o sin correr el riesgo de transmitir un agente causal de una enfermedad tal como el VIH o el VHC. Además, si el paciente porta un defecto genético subyacente a una afección patológica particular, tal defecto podría evitarse mediante manipulación genética de las células germinales adiposas obtenidas. En otra realización preferente, las células germinales adiposas humanas o las progenitoras de células germinales adiposas humanas pueden aislarse de un tejido que no sea del propio paciente. En este caso, las células germinales adiposas son células germinales adiposas heterólogas.

El término “heterólogo” como se usa en el presente documento indica que la célula germinal adiposa procede de otro individuo. Cuando se contempla la administración de tales células a un paciente, puede ser preferible que el tejido sometido a un método para obtener la célula germinal adiposa o la progenitora se seleccione de forma que se maximice, al menos con límites que se pueden lograr, la compatibilidad de tejidos entre el paciente y las células administradas, reduciendo de este modo la probabilidad de rechazo de las células administradas por el sistema inmunitario del paciente. Si las células proceden de una fuente heteróloga, es decir una fuente no autóloga, normalmente puede administrarse una inmunosupresión de forma simultánea, por ejemplo utilizando agentes inmunosupresores tales como ciclosporina o FK506.

El término “xenóloga” como se usa en el presente documento indica que la célula germinal adiposa procede de una especie distinta a la del individuo al que se pretende administrar la célula germinal adiposa. Por ejemplo, una célula germinal adiposa puede aislarse a partir del cerdo y administrarse a un ser humano.

En una realización adicional preferente de la composición de la invención, la célula germinal adiposa es una célula germinal mesenquimática.

La expresión “célula germinal mesenquimática” como se usa en el presente documento significa células germinales multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en células mesenquimáticas, tales como adipocitos, osteoblastos y condrocitos, pero también miocitos, neuronas, células endoteliales, astrocitos y células epiteliales. Aunque se informaron primero en la médula ósea adulta normal, las células germinales mesenquimáticas también pueden obtenerse de otras fuentes, tales como sangre de cordón umbilical, de la dermis o de la pulpa dental, de médula ósea y de tejido adiposo. La definición de células germinales mesenquimáticas como se usa en el presente documento requiere criterios mínimos que incluyen, pero sin limitación, por ejemplo adherencia al plástico, múltiple potencial de diferenciación, expresión de marcadores de superficie celular tales como CD105 y falta de expresión de CD14, CD34 y CD45 (Pittenger *et al.* 1999, Science 284, 143).

En una realización preferente de la composición de la invención, la célula germinal mesenquimática es positiva para los marcadores de superficie celular CD13, CD29, CD49a, CD63, CD73, CD90, CD105 y/o CD166, y/o negativa para los marcadores de superficie celular CD31, CD34, CD44, CD45 y/o CD106 (véase la Figura 1). Como alternativa, la célula germinal mesenquimática es positiva para los marcadores de superficie celular CD13, CD44, CD49a, CD63, CD105 y/o CD166, y/o negativa para los marcadores de superficie celular CD31 y/o CD34.

También se ha observado que la célula germinal mesenquimática es positiva para CD73 y CD90, y/o negativa para CD45 (véase la Figura 6).

5 Como se expone con más detalle en otros lugares en el presente documento, las células germinales mesenquimáticas son células germinales multipotentes que pueden diferenciarse a una diversidad de tipos celulares. Las células germinales mesenquimáticas pueden aislarse fácilmente y/o no mostrar una fuerte tendencia a hacerse degeneradas. En esta realización, la célula germinal mesenquimática se caracteriza adicionalmente por un perfil de marcadores de superficie celular específico. La expresión "positiva para" como se usa en el presente documento con respecto a los marcadores de superficie celular significa que, en una población celular, más del 10 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o todas las células expresan dicho marcador. La expresión "negativa para", como se usa en el presente documento con respecto a los marcadores de superficie celular significa que, en una población celular, menos del 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o ninguna de las células expresa dicho marcador. La expresión de marcadores de superficie celular puede determinarse, por ejemplo, mediante citometría de flujo, inmunohistoquímica, ELISA, RT-PCR, transferencia de Northern o Western, para un marcador (o marcadores) de superficie celular específico, utilizando métodos convencionales descritos en la técnica.

20 En otra realización preferente de la composición de la invención, la célula germinal adiposa es una célula germinal mesenquimática indiferenciada, una célula germinal mesenquimática diferenciada o una célula germinal mesenquimática genéticamente modificada, siendo preferente una célula germinal mesenquimática indiferenciada (o no diferenciada).

25 De acuerdo con la presente invención, la célula germinal adiposa puede ser una célula germinal mesenquimática (CGM) indiferenciada, es decir, no diferenciada, una célula germinal mesenquimática (pre-)diferenciada o una célula germinal mesenquimática genéticamente modificada. La célula mesenquimática puede administrarse en la composición de la invención en un estado indiferenciado, por ejemplo, de forma directa después de su aislamiento de tejido adiposo. Se ha descubierto que la CGM indiferenciada es menos receptiva para el estrés oxidativo que los hepatocitos obtenidos de CGM y, por lo tanto, más es probable que sobreviva a la fase hipóxica inicial tras el trasplante (Kuo *et al.*, 2008, *Gastroenterology* 134, 2111). De forma adicional, el uso de células germinales adiposas 30 indiferenciadas es menos costoso, implementa menos etapas de manipulación y componentes de cultivo, teniendo menos riesgo de contaminaciones y significando menos tiempo invertido en el cultivo de células, teniendo la posibilidad de comenzar rápidamente una terapia que se necesita con urgencia.

35 En otra realización, la célula germinal mesenquimática aislada puede diferenciarse o prediferenciarse *in vitro*, antes de administrarse al paciente que tiene una enfermedad hepática. Utilizando las células germinales adiposas (pre-) diferenciadas, puede ser más eficaz la integración de dichas células germinales en el hígado afectado y/o el reemplazo de células hepáticas no funcionales. Por ejemplo, las células germinales adiposas pueden experimentar diferenciación adipogénica, osteogénica o hepatogénica, eligiendo condiciones apropiadas de cultivo celular, como se ejemplifica en los siguientes ejemplos; véase también Aurich *et al.*, citado anteriormente. Sin embargo, es preferente que la célula germinal mesenquimática sea indiferenciada.

45 Además, si es necesario las células germinales adiposas no diferenciadas o (pre-)diferenciadas pueden estar genéticamente modificadas para compensar, por ejemplo, un defecto genético en las células hepáticas de un paciente; véase, por ejemplo, el documento EP 2281875. Los métodos de transferencia génica para pacientes humanos se describen, por ejemplo, en Alaei *et al.* (2011) *Genetic vaccines and therapy*; 9: 4; Sellner *et al.* (2011) *Leukemia & lymphoma*;52(3): 483-90; Grez (2011) *Mol Ther*;19(1): 28-35.

50 Los términos "diferenciación", "que diferencia" o derivados de los mismos como se usa en el presente documento indican el proceso mediante el cual una célula no especializada o relativamente menos especializada se hace relativamente más especializada. En el contexto de la ontogenia celular, el adjetivo "diferenciada" es un término relativo. Por lo tanto, una "célula diferenciada" es una célula que ha progresado más en una determinada ruta del desarrollo que la célula con la que se la está comparando. Una célula diferenciada puede, por ejemplo, ser una célula diferenciada de forma terminal, es decir, una célula completamente especializada que asume funciones especializadas en diversos tejidos y órganos de un organismo, y que puede ser, pero no necesariamente, posmitótica. En otro ejemplo, una célula diferenciada también puede ser una célula progenitora dentro de un linaje de diferenciación, que puede proliferar y/o diferenciarse adicionalmente.

60 De forma similar, una célula que es "relativamente más especializada" si esta ha progresado hasta más en una determinada ruta de desarrollo que la célula con la que se la está comparando, en la que la última, por lo tanto, se considera "no especializada" o "relativamente menos especializada". Una célula relativamente más especializada puede diferir de la célula no especializada o relativamente menos especializada en una o más características fenotípicas demostrables, tales como, por ejemplo, la presencia, ausencia o el nivel de expresión de componentes o productos celulares particulares, por ejemplo, ARN, proteínas, marcadores celulares específicos u otras sustancias, la actividad de determinadas rutas metabólicas, el aspecto morfológico, la capacidad y/o cinética de proliferación, el potencial de diferenciación y/o la respuesta a señales de diferenciación, etc., en las que tales características 65 significan la progresión de la célula relativamente más especializada más allá a lo largo dicha ruta del desarrollo.

- Los ejemplos no limitativos de diferenciación pueden incluir, por ejemplo, el cambio de una célula germinal pluripotente a un dado tipo de célula progenitora o germinal multipotente, el cambio de una célula progenitora o germinal multipotente a un dado tipo de célula progenitora o germinal unipotente, o el cambio de una célula progenitora o germinal unipotente a tipos celulares más especializados o a células especializadas de forma terminal dentro de un dado linaje celular. La diferenciación de una célula no especializada o menos especializada a una célula más especializada puede proceder a través de la aparición de células con un grado intermedio de especialización. Por ejemplo, la célula germinal mesenquimática aislada puede diferenciarse *in vitro* a adipocitos, hepatocitos u osteoblastos, utilizando factores de crecimiento y diferenciación y componentes de cultivo celular apropiados ("Adipose-Derived Stem Cells - Methods and Protocols" Jeffrey M. Gimble and Bruce A Bunnell (Editors), Methods in Molecular Biology 702, Springer Protocols 2011; Lee *et al.* (2004) Hepatology 40(6): 1275-84). Por ejemplo, la diferenciación adipogénica de las células germinales adiposas puede inducirse mediante el uso alternado de un medio basal tal como DMEM/SFT al 5 % complementado con IDI-mix, es decir, 3-isobutil-1-metilxantina 500 µM, dexametasona 1 µM, indometacina 1 µM, durante 2 días seguido de medio basal más insulina 10 µg/ml durante 1 día, como se describe en los siguientes ejemplos. El ciclo de inducción se repite 3 veces. La diferenciación adipogénica puede analizarse utilizando cuantificación por rojo aceite. La inducción osteogénica puede iniciarse cambiando el medio a DMEM que contiene SFT al 5 %, complementado con L-ascorbato-2-fosfato 50 µM, dexametasona 0,1 µM y β-glicerofosfato disódico 10 mM. El depósito de calcio puede demostrarse de forma histoquímica mediante tinción con rojo alizarina como se describe en los ejemplos adjuntos.
- La inducción de diferenciación en hepatocitos o de células de tipo hepatocito puede llevarse a cabo cultivando células germinales adiposas durante aproximadamente dos semanas en placas recubiertas con colágeno tipo I y el tratamiento con Activina A 20 ng/ml y factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4) 20 ng/ml durante tres días, seguido del tratamiento con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 150 ng/ml, FGF1 100 ng/ml, oncostatina M 30 ng/ml, dexametasona  $2 \times 10^{-5}$  mol/l, insulina-transferrina-selenio (ITS) 1 x, dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,1 % y nicotinamida 0,05 mmol/l durante diez días, y el mantenimiento en medio de cultivo de hepatocitos solo o, de forma opcional, con dexametasona  $10^{-8}$  mol/l y nicotinamida 0,05 mmol/l, como se detalla, por ejemplo, en Aurich *et al.* 2009, Gut 58, 570; Banas *et al.* 2008, J Gastroenterology and Hepatology 24, 70.
- Por consiguiente, en una realización preferente adicional de la composición de la invención, la célula germinal mesenquimática diferenciada es una célula germinal mesenquimática diferenciada de forma adipogénica, osteogénica o hepatogénica. La diferenciación adipogénica se logra preferentemente en ausencia de tiazolidinediona. En una realización preferente, la célula germinal mesenquimática se diferencia de forma adipogénica y osteogénica. La diferenciación hepatogénica se realiza preferentemente en un medio que contiene suero.
- La diferenciación de células germinales adiposas en células diferenciadas de forma adipogénica u osteogénica puede inducirse mediante condiciones de cultivo celular definidas, como se expone anteriormente y se demuestra en los siguientes ejemplos. Además está abarcada por la composición de la invención la diferenciación de células germinales adiposas en células diferenciadas de forma hepatogénica, es decir, hepatocitos o células de tipo hepatocito, como se describe, por ejemplo, en Aurich *et al.* (Gut 2009, 58, 570). Las células germinales adiposas pueden, en una realización, diferenciarse *in vitro* antes de administrarse a un sujeto que tenga una enfermedad hepática aguda o crónica. Preferentemente, la célula germinal adiposa como se denomina en el presente documento se diferencia en una célula diferenciada de forma adipogénica, tal como un adipocito, o en una célula diferenciada de forma osteogénica, tal como un osteoblasto, o en una célula diferenciada de forma hepatogénica, tal como un hepatocito, como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento y en Aurich *et al.*, citado anteriormente. Es preferente que dicha célula germinal adiposa diferenciada en una célula diferenciada de forma adipogénica se caracterice por la acumulación de triacilglicerinas y/o gotitas de lípidos intracelulares, y/o la expresión de al menos un gen específico de adipocitos, tal como -sin limitación- lipoproteína lipasa o el receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ2 (PPARG2) o GAPDH. También es preferente que dicha célula germinal adiposa diferenciada en una célula diferenciada de forma osteogénica se caracterice por deposiciones de fosfato de calcio extracelulares y/o la expresión de al menos un gen específico de osteoblastos, tal como -sin limitación- osteonectina u osteocalcina. Preferentemente, dicha célula germinal adiposa diferenciada en un hepatocito presenta al menos un marcador específico de hepatocito, tal como -sin limitación- albúmina, CD26, CD29, HepPar1, carbamoilfosfato sintasa, triptófano 2,3-dioxigenasa, P450 tipo 3A4 (CYP3A4), FOXA2 o el receptor de asialoglucoproteína (AGPR), y/o al menos una función específica de hepatocito, tal como -sin limitación-, por ejemplo, la formación de urea, el metabolismo de las purinas, la actividad enzimática del citocromo P450, la síntesis y almacenamiento de proteínas, la transformación de hidratos de carbono, la síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos, la destoxificación, modificación y excreción de sustancias exógenas y endógenas, la formación y secreción de bilis, la captación de lipoproteína de baja densidad o la síntesis y almacenamiento de glucógeno. Dichas células germinales adiposas diferenciadas a hepatocitos son preferentemente negativas para los marcadores de células progenitoras de hepatocitos, tales como CK7 o CX43. Son bien conocidos en la técnica otros marcadores y funciones específicos de hepatocitos (Sato *et al.* (2005) Blood 106 (2) 756-63; Lee *et al.* (2004) Hepatology 40 (6): 1275-84.
- En otra realización preferente de la composición de la invención, la composición comprende adicionalmente una matriz en la que las células están incluidas. No obstante, como se describe anteriormente en el presente documento,

es una opción más preferente que la composición no comprenda adicionalmente una matriz en la que estén incluidas las células.

5 De acuerdo con la presente realización, las células germinales adiposas como se define en el presente documento están incluidas en una matriz que comprende, por ejemplo, un biopolímero o polímero sintético, para aumentar potencialmente la supervivencia celular cuando se introducen las células germinales en un sujeto que lo necesite, por ejemplo proporcionando una estructura tridimensional a las células germinales adiposas. Los biopolímeros adecuados incluyen, sin limitación, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos. Como polímero sintético, por ejemplo puede utilizarse polietilenglicol. En algunas realizaciones la matriz puede comprender 10 adicionalmente de las células germinales adiposas, citocinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación o construcciones de expresión de ácido nucleico y componentes de la matriz extracelular, etc. Tales polímeros pueden estar, por ejemplo, en suspensión o pueden formar un gel tridimensional con las células incluidas en el. Preferentemente, tales polímeros pueden ser biodegradables. Algunas realizaciones preferentes de la invención también abarcan combinaciones de distintos polímeros. En otra realización, la matriz comprende un hidrogel.

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

En aún otra realización preferente de la composición de la invención, la composición comprende adicionalmente un biomaterial, sobre el que las células están recubiertas.

20 Preferentemente, el biomaterial es fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno, proteoglicanos, quitosano, alginato y ácido hialurónico alginato, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol o cualquier otro material como se describe en el presente documento.

25 En aún otra realización de la composición de la invención, la composición comprende adicionalmente suero u otros componentes sanguíneos, tales como plasma.

30 El plasma o el suero a menudo contienen factores y componentes celulares que son necesarios para la viabilidad y expansión celular. Habitualmente el plasma se obtiene a partir de una muestra de sangre entera, a la cual se le proporciona o se pone en contacto con un anticoagulante, tal como heparina, citrato o EDTA, al extraer la muestra de sangre, o poco después, para evitar la coagulación. Posteriormente, los componentes celulares de la muestra de sangre se separan del componente líquido (plasma) mediante centrifugación. El suero puede obtenerse a partir del plasma, eliminando el anticoagulante y la fibrina.

35 Preferentemente, el suero es un suero humano o un suero humano procedente de plasma desplaquetado.

En aún otra realización preferente de la composición de la invención, las células germinales adiposas se administran (o se deben administrar) (i) de forma directa después del aislamiento, (ii) después del cultivo y/o la proliferación en el cultivo celular o (iii) después de la crioconservación.

40 De acuerdo con la presente realización, la célula germinal adiposa puede utilizarse para la administración al paciente que tenga una enfermedad hepática de forma directa después del aislamiento. Las células germinales también pueden mantenerse en cultivo celular y/o propagarse en condiciones que permitan el crecimiento y duplicación de dichas células sin diferenciación. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, las utilizadas para obtener las células germinales. Un experto en la materia que tenga la capacidad de evaluar la presencia o ausencia de diferenciación 45 celular puede establecer fácilmente las condiciones adicionales. Esto puede aumentar el número de células germinales disponible para su uso posterior. Los presentes inventores se han dado cuenta de que las células germinales adiposas primarias, o cualquier pasaje posterior, pueden crioconservarse para el uso posterior, como se sabe generalmente en las técnicas para células de mamífero. Los presentes inventores han encontrado que 50 después de la congelación y la descongelación las células germinales adiposas aisladas conservan sustancialmente su capacidad de proliferación. Dichas células pueden conservarse como una suspensión celular concentrada congelada, descongelarse, como se hace generalmente en la técnica y sembrarse en placas en las mismas condiciones que se describen, por ejemplo, en los siguientes ejemplos. En otra realización, las células germinales adiposas aisladas pueden diferenciarse en tipos celulares más especializados, utilizando condiciones de cultivo de 55 células apropiadas, como se describe en otras partes en el presente documento.

En una realización adicional preferente de la composición de la invención, la célula germinal adiposa se administra (o debe administrarse) mediante una infusión/inyección intraperitoneal (sustentado mediante técnicas de formación de imágenes tales como ecografía, tomografía por resonancia magnética o tomografía computarizada). En una 60 realización preferente, la administración de células germinales puede realizarse antes de una cirugía, tal como resección (en parte) del hígado, durante la cirugía y/o después de la cirugía o traumatismo que daña el hígado. Antes de la cirugía significa que las células germinales se administran al hígado con un tiempo de antelación a la cirugía suficiente, de forma que las células germinales puedan, por ejemplo, depositarse en el hígado y/o preferentemente comenzar su diferenciación. Sin embargo, sin ligarse a teoría alguna, se asume que la 65 administración de células germinales antes de la cirugía, durante la cirugía y/o después de la cirugía también ayuda a la proporción de, por ejemplo, factores de crecimiento y/o de citocinas que permiten sustentar o potenciar el

crecimiento y/o la regeneración de células hepáticas.

De acuerdo con la divulgación, el nivel de proteínas total y/o el nivel de albúmina en el suero está aumentado, en comparación con un sujeto no tratado.

5 El nivel de proteínas totales y/o el nivel de albúmina en el suero pueden determinarse por métodos descritos en la técnica, por ejemplo a partir de sangre o suero.

10 De acuerdo con la divulgación, el nivel de hierro en el suero está disminuido, en comparación con un sujeto no tratado.

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

15 Las pruebas de la función hepática son grupos de análisis de sangre de laboratorio de bioquímica clínica diseñados para proporcionar información acerca del estado del hígado del paciente. Los parámetros medidos incluyen albúmina, proteínas totales, hierro, colinesterasa, lactato deshidrogenasa, transaminasa glutámico oxalacética, transaminasa glutámico pirúvica, fosfatasa alcalina, bilirrubina (directa e indirecta) y otros. Las transaminasas hepáticas (aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT, incluyendo GPT y AST) no son pruebas de la función hepática, pero son biomarcadores del lesión hepática en un paciente con algún grado de función hepática intacta. La mayoría de las enfermedades hepáticas provocan de forma inicial solo síntomas leves, pero es vital que estas enfermedades se detecten precozmente. Este análisis se realiza en una muestra de suero o plasma de un paciente obtenida mediante flebotomía. Algunas pruebas se asocian con funcionalidad (por ejemplo, albúmina), algunas con integridad celular (por ejemplo, transaminasas) y algunas con afecciones vinculadas con el tracto biliar (gamma-glutamil transferasa y fosfatasa alcalina). Como sabe un experto en la materia, en la evaluación y el tratamiento de pacientes con disfunción hepática son útiles varias pruebas bioquímicas. Estas pruebas pueden utilizarse para (1) detectar la presencia de una enfermedad hepática, (2) distinguir entre distintos tipos de trastornos hepáticos, (3) evaluar el grado del daño hepático conocido y (4) seguir la respuesta al tratamiento.

30 Las mediciones de proteínas totales pueden utilizarse para explorar y ayudar a diagnosticar enfermedades hepáticas. Los niveles bajos de proteínas totales pueden sugerir un trastorno hepático. Un nivel más alto de proteínas totales en el suero de un paciente que tiene una enfermedad hepática tratado con células germinales adiposas es indicativo del restablecimiento de la función hepática, en comparación con el nivel de proteínas totales en el suero de un paciente no tratado que tenga el mismo trastorno hepático.

35 La albúmina es una proteína fabricada de forma específica por el hígado y que puede medirse de forma barata y fácil. Es el componente principal de las proteínas totales; la fracción restante se denomina globulina, que incluye a las inmunoglobulinas. Los niveles de albúmina están disminuidos en las enfermedades hepáticas crónicas, tal como la cirrosis. Un nivel más alto de albúmina en el suero de un paciente que tiene una enfermedad hepática tratado con células germinales adiposas indica el restablecimiento de la función hepática, en comparación con el nivel de albúmina en el suero de un paciente no tratado que tenga la misma enfermedad hepática.

45 Utilizando un modelo animal, los inventores pudieron demostrar en los siguientes ejemplos que la inyección de células germinales adiposas en el hígado dañado después de una hepatectomía de 2/3, conduce a un restablecimiento significativamente más elevado y más temprano de la función hepática, en comparación con el grupo de control no tratado con células. Esto podría demostrarse por los niveles más altos de albúmina y de proteínas totales.

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

55 Los niveles de hierro más bajos en animales tratados con células 3 semanas poscirugía pueden interpretarse como una regeneración más rápida debida a las células germinales adiposas inyectadas, como puede deducirse de los ejemplos adjuntos.

60 La alanina transaminasa o la alanina aminotransferasa (ALT), también llamada glutámico pirúvico transaminasa sérica (SGPT por sus siglas en inglés), es una enzima presente en los hepatocitos y utilizada como marcador de lesión hepática. Cuando una célula está dañada, filtra esta enzima a la sangre, donde se la mide. La ALT aumenta espectacularmente en el daño hepático agudo, tal como en la hepatitis vírica o la sobredosis de paracetamol. Los aumentos se miden a menudo en múltiplos del límite superior de la normalidad (LSN).

65 La aspartato transaminasa o aspartato aminotransferasa (AST), también llamada transaminasa glutámico oxalacética sérica (SGOT), es similar a la ALT en que es otra enzima asociada con las células parenquimáticas hepáticas. Se utiliza como un marcador de lesión hepática dado que se eleva en el daño hepático agudo. No

obstante, dicha enzima también está presente en los glóbulos rojos y en el músculo cardíaco y esquelético, y, por lo tanto, no es específica del hígado. La proporción de AST con respecto a ALT se utiliza en ocasiones en la diferenciación entre las causas de daño hepático.

5 Se prevé que la ALT, la AST, la lactato deshidrogenasa y/o el amoníaco disminuyan después de la administración de células germinales adiposas al paciente humano que tiene una enfermedad hepática como se define en el presente documento.

10 La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima de las células que recubren los conductos biliares del hígado. Los niveles de ALP en plasma se elevarán al haber una gran obstrucción del conducto biliar, en la colestasis intrahepática o en enfermedades infiltrantes del hígado. Sin embargo, la ALP también está presente en los tejidos óseo y placentario.

15 La bilirrubina es un producto de la degradación del hemo. El hígado es responsable de eliminar de la sangre la bilirrubina. La bilirrubina se absorbe en los hepatocitos, se conjuga y se secreta en la bilis, la cual se excreta en el intestino. La bilirrubina total aumentada provoca ictericia y puede ser signo de problemas hepáticos, los cuales se reflejan como deficiencias del metabolismo de la bilirrubina, por ejemplo, una captación reducida en los hepatocitos, la conjugación alterada de bilirrubina y la secreción reducida de bilirrubina en los hepatocitos. Los ejemplos son la cirrosis y la hepatitis vírica.

20 Aunque es razonablemente específica para el hígado y un marcador más sensible de daño colestásico que la ALP, la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) puede estar elevada incluso con niveles menores subclínicos de disfunción hepática. Por ejemplo, la GGT se eleva en la toxicidad por alcohol crónica. También puede ser útil en la identificación de la causa de una elevación aislada de la ALP.

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

30 De acuerdo con la divulgación, las células germinales pueden detectarse durante al menos 4, 6 o preferentemente 8 semanas, más preferentemente durante más de 8 semanas tras la infusión o el trasplante.

35 Como demuestran los siguientes ejemplos, las células germinales adiposas inyectadas migran desde un emplazamiento dentro del lóbulo inicialmente central hacia su periferia y pudieron encontrarse hasta 8 semanas después de la inyección.

40 La invención también se refiere a una matriz implantable en la cual las células germinales adiposas humanas están incluidas, para el uso en la prevención, mejoría o tratamiento de las enfermedades hepáticas agudas o crónicas.

Las definiciones y ventajas expuestas en el presente documento para la composición de la invención se aplican con los cambios debido a la matriz implantable. La matriz puede contener polietilenglicol, colágeno, fibrina o una combinación de los mismos, de forma opcional con un tampón fisiológicamente aceptable.

45 La invención concierne adicionalmente a una composición en un tampón fisiológicamente compatible, que comprende: células germinales adiposas humanas y al menos una de (i) una sustancia semisólida o (ii) una sustancia biodegradable, o (iii) suero humano, preferentemente suero de plasma desplaquetado, para su uso en la prevención, mejoría o tratamiento de enfermedades hepáticas agudas o crónicas.

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

### Figuras

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

60 La **Figura 2** muestra la tinción con rojo aceite para la acumulación de triacilglicerinas intracelulares en células germinales adiposas humanas diferenciadas de forma adipogénica. Las células germinales inducidas de forma adipogénica mostraron en todos los donantes una concentración superior estadísticamente significativa de rojo aceite que los controles no inducidos.

65 La **Figura 3** muestra la tinción con rojo alizarina para el depósito de calcio extracelular en células germinales adiposas humanas (CGADh) diferenciadas de forma osteogénica. Las CGADh diferenciadas de forma osteogénica

mostraron un alto depósito de calcio extracelular, analizado con tinción con rojo alizarina. Las células no inducidas no mostraron depósito extracelular de calcio.

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

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

La **Figura 6** muestra los resultados de FACS de células germinales adiposas humanas (CGADh) utilizando los marcadores de superficie celular indicados. Las células germinales fueron positivas para CD13, CD44, CD49a, CD63, CD73, CD90, CD105 y/o CD166, y/o negativas para CD31 y/o CD34.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y una descripción de cómo efectuar y utilizar las realizaciones, y no están destinados a limitar el ámbito de lo que los inventores consideran su invención, ni están destinados a expresar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso y la temperatura está en grados Celsius. Se utilizan abreviaturas convencionales.

#### Ejemplo 1: Células

##### Aislamiento de células germinales mesenquimáticas procedentes de tejido adiposo

Después de obtener el consentimiento informado se aislaron células de estroma mesenquimático a partir de tejido adiposo subcutáneo recién extirpado de seis adultos (mujeres en el intervalo de 34-59, con una edad media de 39,5 años) sometidos a cirugía plástica programada utilizando un procedimiento modificado de Hauner *et al.* (1989). Brevemente, después de retirar el tejido fibroso, el tejido adiposo se lavó dos veces en PBS/BSA al 1 %, se trituró y digirió enzimáticamente con colagenasa (colagenasa CLS; 220 U/mg, Biochrom AG, Berlín, Alemania, 1,5 mg/ml, en Solución de Ringer-Krebs/BSA al 1 %) durante 45 minutos en agitación constante a 37 °C. Se separaron mediante centrifugación los adipocitos maduros y el tejido conectivo (700 x g, 7 min, TA). Las células sedimentadas se resuspendieron, se pasaron a través de un filtro de malla de 100  $\mu$ m (Neolab, Heidelberg, Alemania) y se lavaron dos veces con PBS/BSA al 1 %. Después de la lisis de los eritrocitos (3 minutos, cloruro de amonio 155 mM, bicarbonato de potasio 10 mM; EDTA 0,1 mM), las células se lavaron otra vez dos veces y se sembraron en placa a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio de expansión. Después de 12 horas, el medio se cambió para retirar las células no adheridas. El medio de expansión se reemplazó cada dos días.

Las células se cultivaron en medio de expansión (DMEM al 60 % (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania)), MCDB-201 al 40 % (Sigma), insulina-transferrina-selenio 1 x (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania), dexametasona  $10^{-8}$  M, ácido ascórbico-2-fosfato 0,1 mM, suero fetal de ternera al 2 % (Biochrom, Berlín, Alemania), penicilina 100 U/ml (Biochrom), estreptomycin 0,1 mg/ml (Biochrom), EGFhr 10 ng/ml (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) y PDGF-BBhr 10 ng/ml (CellSystems, St. Katharinen, Alemania). El medio se cambió cada dos días. Una vez que las células alcanzaron el 70 % de confluencia, se desprendieron con tripsina-EDTA al 0,25 % (Biochrom, Berlín, Alemania) y se volvieron a sembrar en placa a  $3,5 \times 10^3$  células por cm<sup>2</sup>. Los cultivos se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %.

#### Ejemplo 2: Diferenciación adipogénica y osteogénica

##### Diferenciación adipogénica

Las células se sembraron en medio de expansión a una densidad de 24.000 células/cm<sup>2</sup>. Después de alcanzar el 90 % de confluencia, se indujo la adipogénesis mediante el uso alternado de medio basal (DMEM/SFT al 5 %) complementado con IDI-mix (3-isobutil-1-metilxantina 500  $\mu$ M; dexametasona 1  $\mu$ M; indometacina 1  $\mu$ M) durante 2 días seguido de medio basal más insulina 10  $\mu$ g/ml durante 1 día. El ciclo de inducción se repitió 3 veces. La diferenciación adipogénica se analizó utilizando cuantificación con rojo aceite como se ha descrito anteriormente [Ramirez-Zacarias *et al.* 1992, Histochemistry 97, 493].

Diferenciación osteogénica

Después de sembrarlas a una densidad de 24.000 células/cm<sup>2</sup>, las células se cultivaron en medio de expansión hasta el 90 % de confluencia. La inducción osteogénica se inició cambiando el medio a DMEM que contenía SFT al 5 %, complementado con L-ascorbato-2-fosfato 50 µM, dexametasona 0,1 µM y β-glicerofosfato disódico 10 mM. El depósito de calcio se demostró de forma histoquímica mediante tinción con rojo alizarina como se ha descrito anteriormente (Landoff (1948) Acta Orthop Scand. 1948; 17(3-4):270-302; Wise *et al.* (1979) J. Biol. Chem. 54(2): 273-5). El siguiente es un protocolo típico para la cuantificación de calcio a partir de CGM diferenciadas de forma osteogénica: las células se analizaron a los 14, 21, 35 y 42 días después de la inducción de la diferenciación. Las capas celulares de las CGM diferenciadas de forma osteogénica se lavaron dos veces con PBS sin Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. El Ca<sup>2+</sup> extracelular depositado se extrajo con HCl 0,6 M mediante la incubación de las células en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 2 horas. Los extractos se centrifugaron durante 5 minutos a 15.700 x g y se cuantificó el contenido de Ca<sup>2+</sup> en los sobrenadantes mediante el método del complejo de O-cresoltaleína (Fluitest Ca-CPC, Biocon, Vbhl-Marienhagen, Alemania). Posteriormente las células extraídas se lavaron tres veces con PBS sin Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, se rasparon con un rascador de caucho en NaOH 0,1 M/SDS al 1 % y se sometieron a tratamiento con ultrasonido como se describió anteriormente. Tras centrifugación a 4 °C y 8.000 x g durante 5 minutos, se determinó el contenido en proteínas de los sobrenadantes con el kit BCA (Pierce, Rockford, EE. UU.).

Es el siguiente un protocolo típico de tinción con alizarina: las monocapas de CGM mineralizadas se lavaron dos veces con un exceso de PBS y se fijaron con etanol al 70 % preenfriado durante 1 hora a -20 °C. Después de una etapa corta de lavado con H<sub>2</sub>O la capa de células se incubó con rojo alizarina 40 mM (pH 4,2) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después de la aspiración del colorante no incorporado las células se lavaron dos veces más con un exceso de H<sub>2</sub>O y una vez con PBS antes del análisis microscópico

**Ejemplo 3: Citometría de flujo**

Se examinó la expresión de marcadores de superficie utilizando citometría de flujo en las células germinales adiposas humanas (CGADh) expandidas hasta el pasaje cuatro. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (Acm) conjugados con fluorocromos: anti CD13-APC, anti CD29-PE, anti CD31-FITC, anti CD34-FITC, anti CD44-APC, anti CD45-FITC, anti CD49a-PE, anti CD63-FITC, anti CD73-PE, anti CD90-APC, anti CD105-FITC, anti CD166-PE (todos de Becton Dickinson). Se incluyeron anticuerpos para isotipo para los cuatro fluorocromos.

Las células se desprendieron con tripsina-EDTA al 0,25 %, se incubaron con los Acm conjugados de forma directa en tampón de FACS (SFT al 1 %, NaN<sub>3</sub> al 0,1 %, en PBS) durante 30 min en hielo, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se fijaron con PBS/paraformaldehído al 1 %. Las células se analizaron utilizando el sistema de citometría de flujo FACSCanto (Becton Dickinson). La recogida de datos y el análisis se realizaron con el programa informático Diva (Becton Dickinson).

**Ejemplo 4: Marcaje con SPIO**

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

**Ejemplo 5: Animales**

Todos los estudios se realizaron con los protocolos aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Ruprecht Karls de Heidelberg, Alemania, y se hicieron en conformidad con las directrices de los Institutos Nacionales de Salud.

Se adquirieron en los Laboratorios Charles River ratas Sprague Dawley hembra que pesaban 140-200 g. Se mantuvieron en un ciclo automático de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron con pienso normal para ratas y agua a demanda.

Aplicación de agentes tóxicos

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

30 días después de la segunda inyección, los animales recibieron 10 inyecciones repetidas de alialcohol cada tres días, cada una de 0,31-0,372 mmol/kg de peso corporal. 3 días después de la última inyección de alialcohol, se sometieron todos los animales a una hepatectomía parcial de dos tercios; véase el procedimiento operatorio.

Procedimiento operatorio

3 días después de la última inyección de alialcohol, se sometieron todos los animales a una hepatectomía parcial de dos tercios (véase, por ejemplo, Gordon *et al.* (2000) American journal of pathology 156 (2): 607-19; Laconi *et al.* 2008; 17 (12): 1415-21).

Se extirparon los lóbulos hepáticos medios derecho e izquierdo y el lóbulo hepático lateral izquierdo, los otros lóbulos se dejaron *in situ*. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos. El grupo 1 recibió 2 x 10<sup>6</sup> CG en 200 µl de DMEM inyectados de forma directa en el lóbulo hepático lateral derecho restante, el grupo 2 recibió en cambio 200 µl de DMEM. La perforación de entrada se cerró mediante un impulso eléctrico bipolar corto. Después de un aclarado minucioso para eliminar los coágulos de sangre restantes se implantó una bomba osmótica (ALZET) en la cavidad abdominal para la liberación continua de ciclosporina. La pared abdominal se cerró en 3 etapas solo mediante suturas. Los lóbulos hepáticos extraídos se fijaron en formalina para el establecimiento de las fases y el análisis histológicos. El cuidado posoperatorio consistió en la administración de buprenorfina y carprofeno cada 12 h, si era necesario.

Niveles en sangre

Se extrajo sangre cada 7 días a través de la vena de la cola, comenzando desde el día 3 postoperatorio, para determinar los niveles de colinesterasa, proteínas totales, albúmina, GOT, GPT, hierro y lactato deshidrogenasa.

**Ejemplo 6: Resultados****Ejemplo 6.1: Citometría de flujo**

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

**Ejemplo 6.2: Aislamiento y cultivo de células**Diferenciación adipogénica

Las células inducidas de forma adipogénica mostraron una concentración de rojo aceite más alta de forma estadísticamente significativa, que no indujeron los controles de ningún donante; véase la Figura 2.

Diferenciación osteogénica

Las CGADh diferenciadas de forma osteogénica mostraron un alto depósito de calcio extracelular, analizado con tinción de rojo alizarina; véase la Figura 3. Las células no inducidas no mostraron depósito de calcio extracelular.

**Ejemplo 6.3: Parámetros de laboratorio**

Antes de la primera aplicación de retrorsina, todos los niveles en sangre tomados de los animales del experimento fueron coherentes con los niveles basales publicados en la bibliografía.

**Ejemplo 6.4: Niveles en sangre postoperatorios**

Los datos se expresaron como media ± ET. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student y la prueba de suma de rangos de Mann Whitney cuando la prueba de normalidad fallaba.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo; véase la Figura 4.

Albúmina

Los niveles postoperatorios de albúmina estaban sistemáticamente por debajo de los valores estándar. En la semana uno y dos poscirugía hubo niveles de albúmina de forma estadísticamente significativa más altos en los animales tratados que en los animales de control no tratados con células ( $p = 0,016-0,017$ ). La albúmina actúa como un buen marcador de síntesis hepática.

Proteínas totales

Las proteínas totales fueron más altas en los animales tratados con células durante todo el período de análisis. Los valores estándar se alcanzaron después de la tercera semana poscirugía en los animales tratados con células y después de la 6ª semana en los animales de control. En la semana uno y dos poscirugía los niveles de proteínas totales eran más elevados de forma estadísticamente significativa en el grupo tratado con células en comparación

con el grupo de control ( $p = 0,015-0,031$ ).

Colinesterasa (CHE)

5 Los niveles postoperatorios de CHE estaban claramente debajo de los valores estándar, como un marcador específico hepático de una función y síntesis hepáticas significativamente reducidas, inicialmente entre el 30 y el 50 %. El valor estándar no se alcanzó dentro del período de investigación. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con células y los no tratados con células. El grupo de control no tratado tuvo niveles de CHE más altos que el grupo tratado con células. En ambos grupos los niveles de CHE comenzaron lentamente a elevarse a las 6 semanas poscirugía, hasta el 75 % del valor estándar en la semana 10 poscirugía.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

15 Los niveles posoperatorios de LDH en los animales de control permanecieron sistemáticamente debajo de los valores estándar. En los animales tratados con células hubo un máximo de LDH en la semana 2 poscirugía. En las semanas 2, 4 y 5, la LDH fue de forma estadísticamente significativa más alta en el grupo tratado con células ( $p = 0,003-0,04$ ).

Transaminasa glutámico oxalacética (GOT)

20 La GOT se mantuvo más alta en los animales tratados con células que en los animales no tratados con células desde la primera hasta la octava semana poscirugía, en la semana 1 y en la semana 8 de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,001-0,014$ ).

25 Transaminasa glutámico pirúvica (GPT)

30 La administración de alcohol y retrorsina condujo a un aumento de los niveles de GPT antes de la cirugía, en comparación con los niveles estándar. Los niveles postoperatorios de GPT fueron más altos en el grupo de control no tratado con células, con un máximo al cabo de la segunda semana poscirugía. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con células y los no tratados con células. Se considera que la GPT es específica de hígado.

Fosfatasa alcalina {AP}

35 En la poscirugía la fosfatasa alcalina estuvo claramente aumentada hasta la semana 6, en comparación con los niveles estándar. Después de la semana 6, los niveles de fosfatasa alcalina eran más altos en los animales tratados con células en comparación con los animales de control. No hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

40 Hierro

Los niveles posoperatorios de hierro estaban claramente por debajo de los niveles estándar. A partir de la semana 3, los animales postoperatorios tratados con células mostraron niveles de hierro inferiores que los animales de control. No hubo una diferencia estadísticamente significativa en ambos grupos ( $p > 0,05$ ).

45

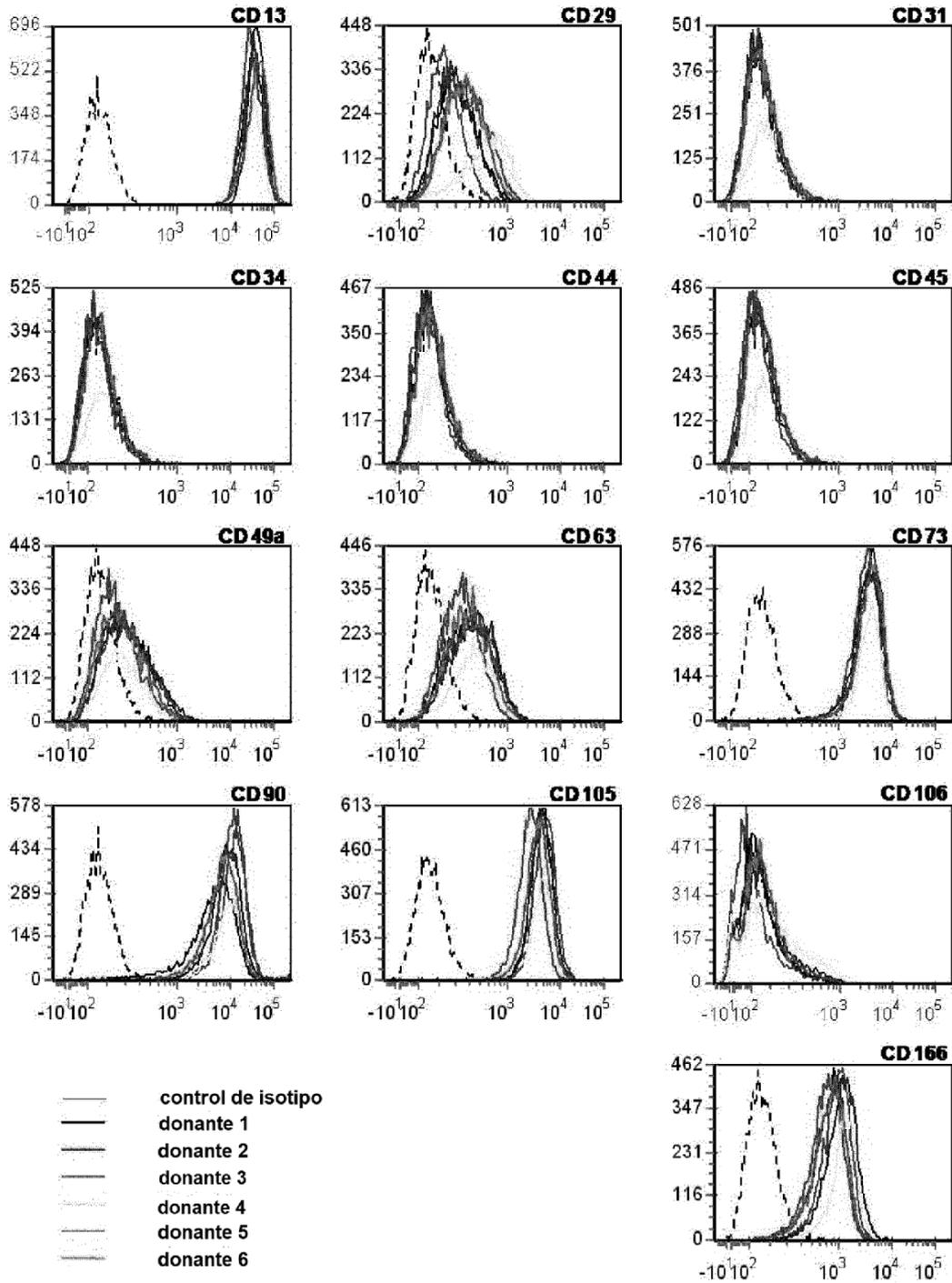
**Ejemplo 6.5: Histología**

50 Las células migraron después de la inyección desde el centro del lóbulo a la periferia. Las células marcadas con SPIO se tiñeron con el colorante azul de Prusia. No se encontraron partículas de SPIO en macrófagos. Debido a la alta intensidad del hierro en el hígado, las partículas de SPIO no pudieron detectarse mediante MRI. Pudo observarse una alta variabilidad del grado de necrosis de rata a rata, de lóbulo a lóbulo y de corte a corte. No se observó formación tumoral durante todo el período de seguimiento de 16 semanas.

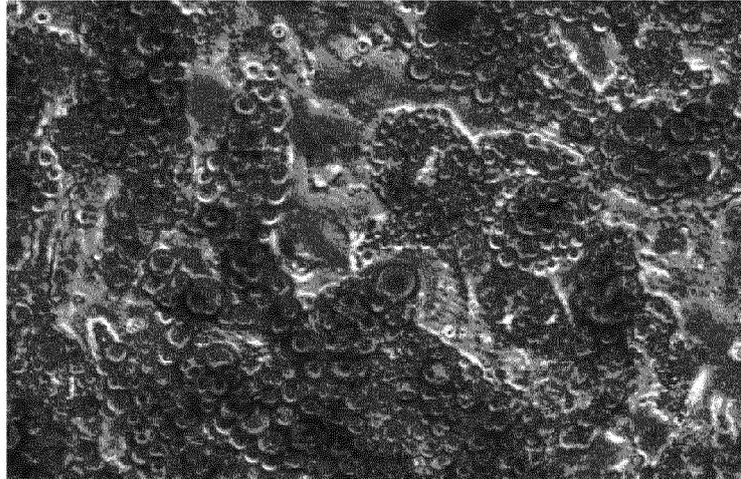
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende células germinales adiposas humanas para su uso en la regeneración del hígado, en la que la composición se administra mediante una infusión o inyección intraperitoneal de dichas células germinales.
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la vía de administración se sustenta mediante técnicas de formación de imágenes tales como ecografía, tomografía por resonancia magnética o tomografía computarizada.
- 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, para la prevención, mejoría o tratamiento de una enfermedad hepática aguda o crónica, en la que la enfermedad hepática aguda o crónica podría seleccionarse de pérdida de función hepática, isquemia, cirrosis por fibrosis, resección hepática y/o traumatismo hepático.
- 20 4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en la que la enfermedad hepática se selecciona del grupo que consiste en: isquemia hepática, fibrosis hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, enfermedad hepática por alcohol, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, cirrosis, enfermedad hepática colestásica, enfermedad quística del hígado, hígado graso, galactosemia, cálculos biliares, síndrome de Gilbert, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, cáncer hepático, hepatitis neonatal, enfermedad hepática no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, porfiria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, esteatohepatitis, tirosinemia, enfermedad del almacenamiento de glucógeno de tipo I, hepatitis vírica, enfermedad de Wilson o cualquier combinación de las mismas.
- 25 5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula germinal adiposa se aísla de tejido adiposo humano y/o en la que la célula germinal adiposa es una célula germinal adiposa autóloga, heteróloga o xenóloga, y/o en la que la célula germinal adiposa es una célula germinal mesenquimática.
- 30 6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula germinal mesenquimática es positiva para los marcadores de superficie celular CD73 y CD90, y/o negativa para el marcador de superficie celular CD45 y/o en la que la célula germinal mesenquimática es positiva para los marcadores de superficie celular CD13, CD44, CD49a, CD63, CD105 y/o CD166, y/o negativa para los marcadores de superficie celular CD31 y/o CD34.
- 35 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula germinal adiposa es una célula germinal mesenquimática indiferenciada, una célula germinal mesenquimática diferenciada o una célula germinal mesenquimática genéticamente modificada.
- 40 8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula germinal mesenquimática diferenciada es una célula germinal mesenquimática diferenciada de forma adipogénica, de forma osteogénica o de forma hepatogénica.
- 45 9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente una matriz en la cual las células están incluidas, en la que la matriz podría comprender polietilenglicol, colágeno, fibrina o una combinación de los mismos.
- 50 10. La composición para el uso de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un biomaterial, sobre el que las células están recubiertas, en el que el biomaterial podría ser fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno, proteoglicanos, quitosano, alginato y ácido hialurónico alginato, quitosano, ácido hialurónico o polietilenglicol, o combinaciones de los mismos.
- 55 11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente suero o plasma, en la que el suero podría ser suero humano o suero humano procedente de plasma desplaquetado.
12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula germinal adiposa se administra (i) de forma directa después del aislamiento, (ii) después del cultivo y/o la proliferación en un cultivo celular o (iii) después de la crioconservación.

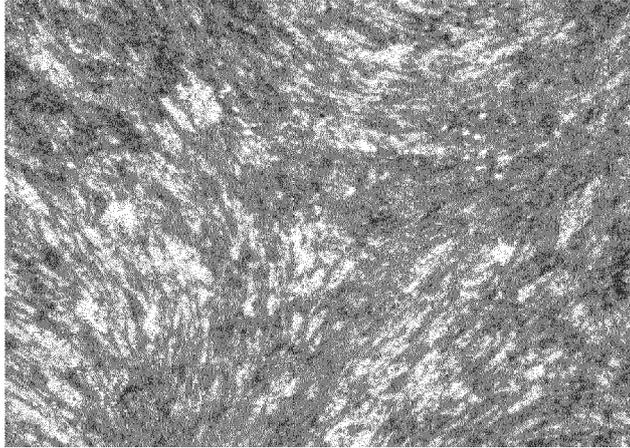
Figura 1



**Figura 2**

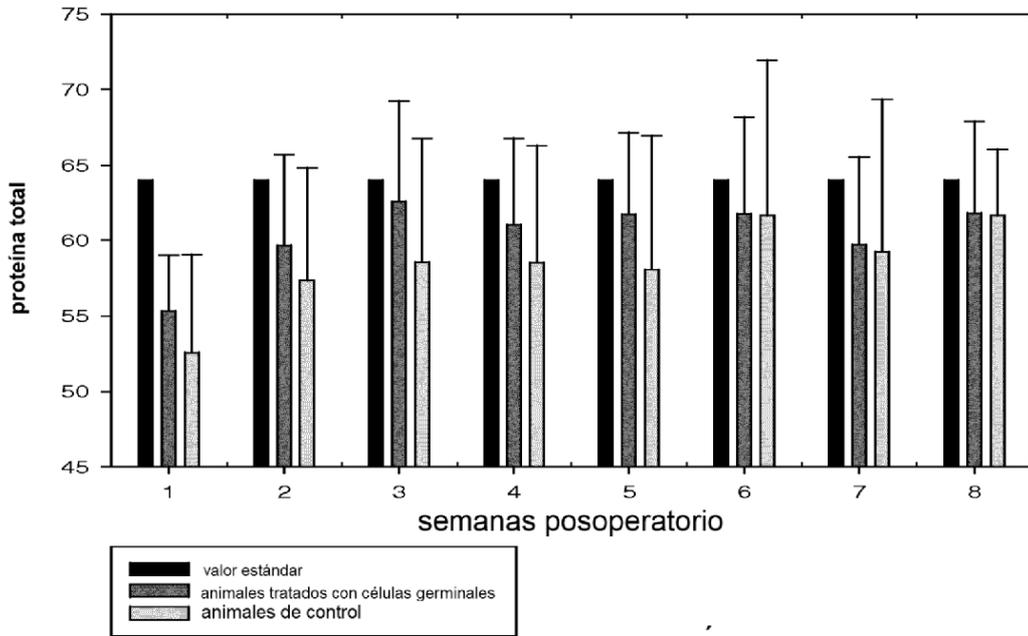


**Figura 3**



**Figura 4**

proteína total  
-posoperatorio-



albúmina  
-posoperatorio-

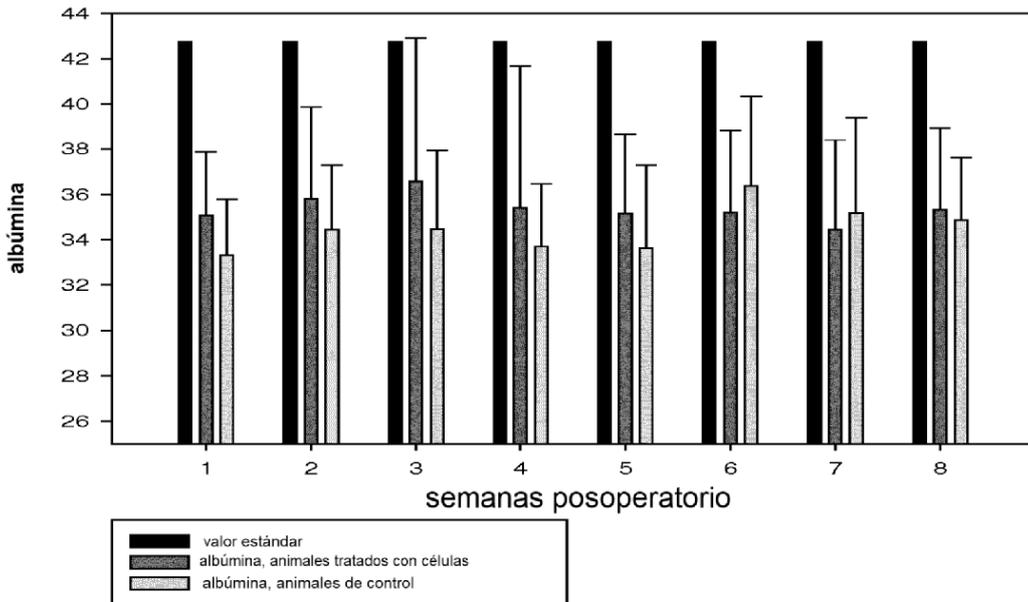
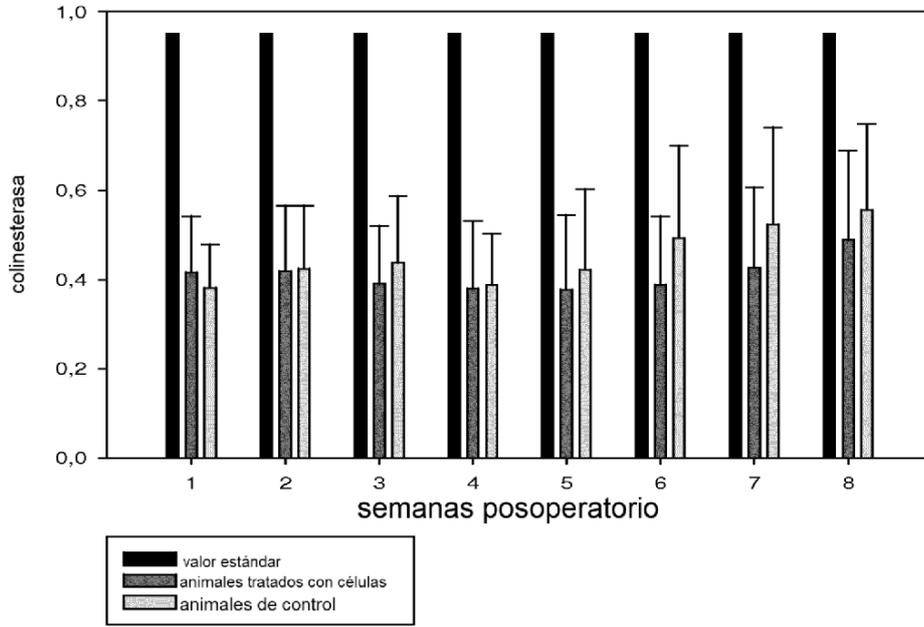


Figura 4 (cont.)

colinesterasa  
-posoperatorio-



transaminasa glutámico oxalacética  
-posoperatorio-

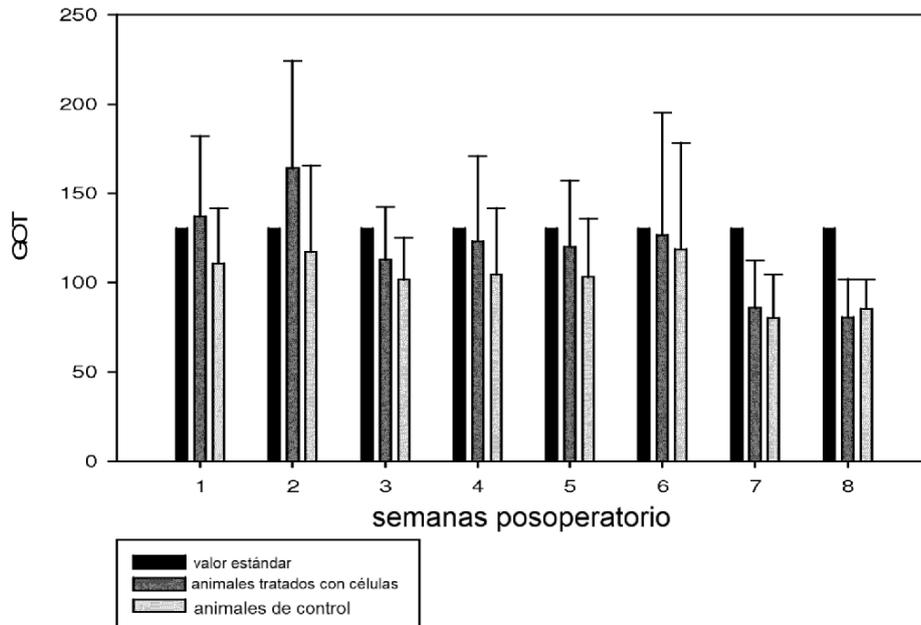
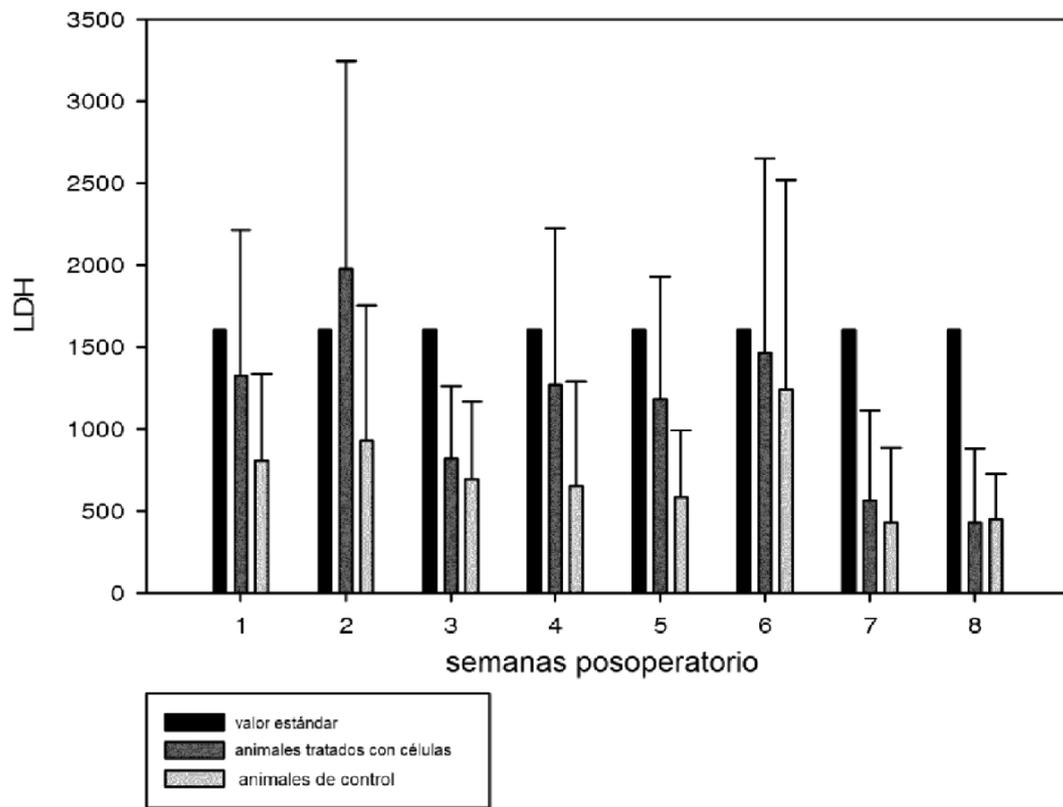


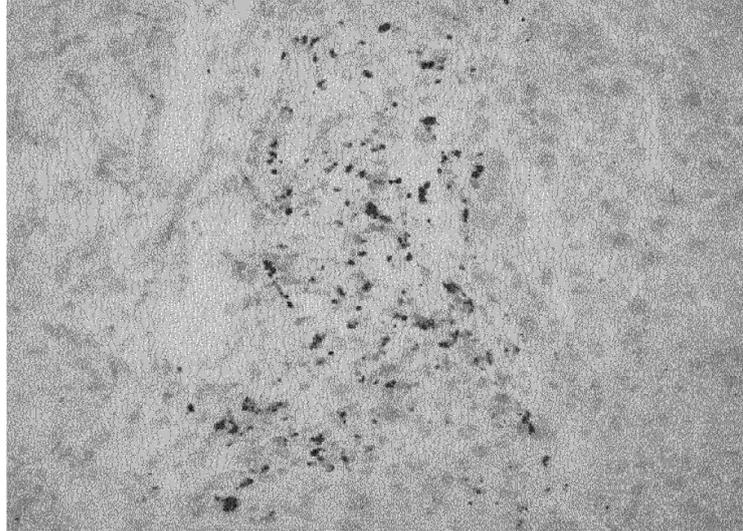
Figura 4 (cont.)

lactato deshidrogenasa  
-posoperatorio-



**Figura 5**

**A)**



**B)**

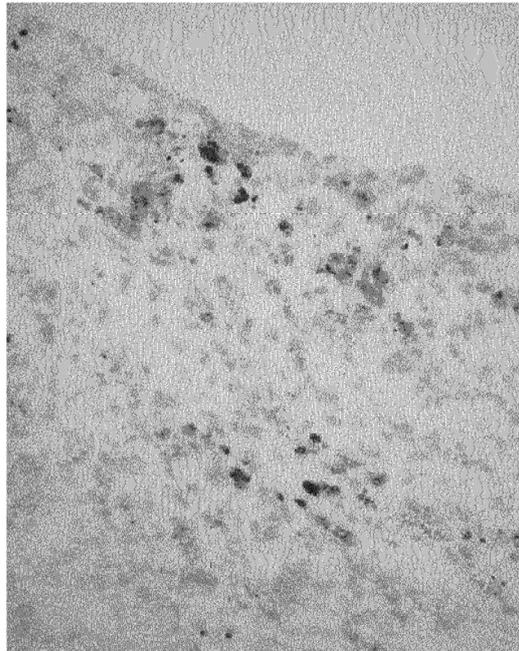


Figura 6

