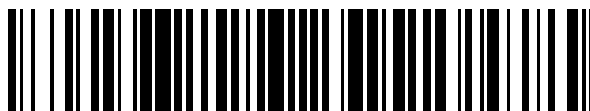


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 300**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)
A61L 27/36 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/30 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2009 PCT/FI2009/050715**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010 WO10026299**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2009 E 09811160 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2337568**

54 Título: **Métodos y medios para ingeniería de tejidos blandos**

30 Prioridad:

08.09.2008 FI 20085839
08.09.2008 US 95198 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2020

73 Titular/es:

EVERFILL OY (100.0%)
c/o S Yritysjuridiikka Oy, Fredrikinkatu 25 A 17
00120 Helsinki, FI

72 Inventor/es:

YLIKOMI, TIMO y
SARKANEN, JERTTA-RIINA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 790 300 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

Métodos y medios para ingeniería de tejidos blandos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la ingeniería de tejidos blandos. Más precisamente, la presente invención está dirigida a un extracto de tejido adiposo acelular, a un implante que comprende dicho extracto, a métodos para su preparación y a los usos del mismo.

Antecedentes de la invención

10 El tejido blando consiste en estructuras conectivas y de soporte del cuerpo, tal como músculos, tejidos conectivos, tejido adiposo y vasos sanguíneos. La ingeniería de tejidos blandos persigue la fabricación de partes de sustitución para defectos de tejidos blandos que son resultado de, p.ej., un trauma (quemaduras y cicatrices), resección quirúrgica o malformaciones congénitas. Adicionalmente, el uso cosmético, tal como el relleno de arrugas faciales, es una aplicación importante del tejido blando reconstituido.

15 En ingeniería de tejidos se han usado materiales aloplásticos, tal como silicona y colágeno bovino. Sin embargo, dichos materiales pueden producir reacciones de rechazo, tal como reacciones alérgicas. Por tanto, hoy día se prefiere el uso de materiales de trasplante naturales.

20 Para uso en la ingeniería de tejidos blandos, serían deseables los trasplantes autólogos. El trasplante de tejido adiposo autólogo es un procedimiento terapéutico antiguo, en el que adipocitos maduros o el propio tejido adiposo son trasplantados en la zona del defecto. El tejido adiposo es abundante, fácil de recolectar, y se puede obtener fácilmente para usos clínicos. Sin embargo, el uso de trasplantes de tejido adiposo autólogo todavía puede dar lugar a varios problemas, tal como resorción, formación excesiva de tejido conectivo (cicatrices), reacciones inflamatorias, así como endurecimiento y coagulación del trasplante. Adicionalmente, los resultados obtenidos a largo plazo en trasplantes de tejido adiposo son impredecibles y variables, dependiendo del método usado y de la habilidad del personal que ejecuta dicho método.

25 Se han usado células madre adiposas para ingeniería de tejidos blandos. Dichas células son capaces de proliferar y diferenciarse en tejido adiposo maduro. Sin embargo, como la matriz extracelular desempeña una función esencial en la proliferación y diferenciación celular, es improbable que sea posible una reparación de defectos grandes o profundos de tejido blando a partir tan solo de células. Para que sean regeneradas en tejido funcional, las células trasplantadas necesitan una matriz extracelular artificial, es decir, una estructura de biomaterial que ayude a la unión, proliferación y diferenciación de las células.

30 La formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, la neovascularización, es crucial para el suministro de nutrientes y la eliminación de residuos durante la regeneración de tejidos blandos. Hasta la fecha, se han usado factores de crecimiento individuales (p.ej., FGF-2 o VEGF) como sustancias bioactivas para este propósito, pero los resultados no han sido satisfactorios. Parece que existe la necesidad de un conjunto de diferentes factores de crecimiento/diferenciación en lugar de únicamente factores individuales. Sin embargo, se desconoce la combinación correcta de factores de diferenciación. El uso de un conjunto de factores de crecimiento biodiseñados en un único implante resultaría en costes muy elevados. El documento WO 2008/041909 describe una composición médica obtenida cultivando muestras celulares a partir de un tejido adiposo. La composición comprende algunos componentes nativos y factor de crecimiento de tipo insulina. Las células que forman parte del medio de cultivo son separadas de los componentes nativos.

40 Hasta la fecha, no se dispone de una estrategia adecuada para la reconstrucción de defectos de tejido blando. Por tanto, existe una necesidad reconocida en la técnica por desarrollar implantes que induzcan una rápida ganancia volumétrica para rellenar defectos, que mantengan el tejido trasplantado sin una pérdida volumétrica dependiente del tiempo, y que induzcan una rápida neovascularización.

Breve descripción de la invención

45 La adipogénesis *de novo* es una estrategia prometedora para la ingeniería de tejidos blandos. La presente invención se basa en estudios que intentan proporcionar un microentorno que es adecuado para la proliferación y la diferenciación celular, dando como resultado de este modo la formación de tejido adiposo sin trasplante exógeno de células. Un microentorno óptimo potencia la migración de células madre adiposas desde el tejido circundante e induce la diferenciación de las células en adipocitos maduros. Se requiere la neovascularización del tejido en desarrollo para evitar necrosis, formación de cicatrices y resorción del tejido trasplantado, así como para secretar varios factores de diferenciación.

50 La presente invención proporciona un extracto de tejido adiposo libre de células según la reivindicación 1.

El extracto puede usarse en la reparación o ingeniería de tejidos blandos y en la inducción de angiogénesis en ingeniería de tejidos, p.ej., en curación de heridas, en el tratamiento de lesiones de quemaduras, y para tratar afecciones isquémicas.

La presente invención proporciona además un implante que comprende un extracto de tejido adiposo libre de células según cualquier reivindicación de la invención y una matriz biocompatible. El extracto preferiblemente es alogénico, mientras que la matriz preferiblemente es un hidrogel y puede seleccionarse de un grupo que consiste en ácido hialurónico, quitosán, fibrina, colágeno, alginato, poliésteres basados en ácido poli láctico, ácido poli láctico glicólico, policaprolactona, y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el implante es inyectable. El implante puede usarse en la reparación o la ingeniería de tejidos blandos y en la inducción de angiogénesis en ingeniería de tejidos, p.ej., en curación de heridas, en el tratamiento de lesiones de quemaduras y para el tratamiento de afecciones isquémicas.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para preparar un extracto de tejido adiposo libre de células según la reivindicación 13.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para preparar un implante según cualquier realización de la invención. El método comprende mezclar el extracto de tejido adiposo, o absorberlo, en un material biocompatible.

Aún más adicionalmente, la presente invención proporciona un método para inducir la adipogénesis y un método para inducir la angiogénesis. Los métodos comprenden implantar en un sujeto que lo necesite un implante según cualquier realización apropiada de la invención. El alcance de la invención, sin embargo, queda definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia de la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Breve descripción de las figuras

A continuación, la invención se describirá con más detalle por medio de las realizaciones preferidas, y en referencia a las figuras acompañantes, en las que:

Figura 1: ilustra los contenidos de proteína total y de factor de crecimiento en extractos de tejido adiposo según la presente invención. La Figura 1A muestra la concentración total de proteínas en 20 extractos de tejido adiposo humano seleccionados aleatoriamente a diferentes tiempos. Las Figuras 1B, 1C y 1D muestran las concentraciones de IGF-1, FGF-2 y VEGF, respectivamente, en extractos de tejido adiposo (ATE, del inglés "adipose tissue extract") humano a diferentes tiempos. En cada figura se muestra la media en forma de barra.

Figura 2: ilustra la diferenciación adipogénica de células madre adiposas (hASCs). La Figura 2A muestra hASCs crecidas en un medio de control de crecimiento. La Figura 2B muestra hASCs creciendo en un medio ATE que contiene aproximadamente 350 µg/mL de proteína, 2C aproximadamente 700 µg/mL, y 2D aproximadamente 1200 µg/mL de proteína. Los tratamientos de ATE presentan un potencial dependiente de la dosis de inducción de adipogénesis.

Figura 3: demuestra la formación de conductos en un ensayo de angiogénesis. La Figura 3A representa un control negativo que no muestra formación de conductos. Las Figuras 3B y 3C representan células tratadas con 900 µg/mL (contenido de proteína) o 1300 µg/mL de ATE, respectivamente. La Figura 3D muestra células de control positivo, tratadas con factores de crecimiento angiogénicos conocidos, 10 ng/mL de VEGF y 1 ng/mL de FGF-2. La formación de conductos se puede observar claramente en 3B, 3C y 3D. Ambos tratamientos de ATE presentan un potencial igual pero dependiente de la dosis de la inducción de angiogénesis en comparación con el potencial angiogénico del control positivo 3D.

Figura 4: ilustra la vascularización y la formación de tejido adiposo *in vivo* en hipodermis de rata 2 semanas después de implantar un implante según las presentes realizaciones. Las Figuras 4A y 4B muestran una formación capilar extensiva en el área del implante. Las Figuras 4C y 4D muestran grandes estructuras de tipo arteriola, así como algún desarrollo de tejido adiposo. Mediante flechas se indican ejemplos de vasos.

Figura 5: ilustra una formación masiva de tejido adiposo a las 12 semanas (5A y 5B) y a las 20 semanas (5C y 5D) después de implantar el implante según las presentes realizaciones. El implante se indica mediante flechas en 5B y 5D.

Figura 6: ilustra un pre-ensayo clínico que muestra hipodermis humana y su formación de tejido adiposo y vascularización después de implantar el implante según las presentes realizaciones bajo un tejido de cicatriz antigua en una pierna. La Figura 6A muestra el tejido antes del implante. La Figura 6B muestra la hipodermis tres meses después del implante. La Figura 6C muestra la formación de vasos en la hipodermis superior a los seis meses. La Figura 6D muestra el tejido adiposo y la vascularización en la hipodermis justo por debajo de la dermis a los seis meses. La masa de tejido como mínimo se ha doblado a los seis meses, y se ha desarrollado tejido adiposo y grandes vasos.

Descripción detallada de la invención

El tejido adiposo comprende adipocitos de varios estados de diferenciación, células endoteliales, fibroblastos, pericitos, así como células madre adiposas y células madre mesenquimales que son capaces de diferenciarse en varios linajes celulares. La adipogénesis *de novo*, es decir, la formación de nuevo tejido adiposo, es una estrategia prometedora para la ingeniería de tejidos blandos. La presente invención se basa en estudios que pretenden proporcionar un microentorno adecuado para la proliferación y la diferenciación celular, dando como resultado de este modo la formación de vasos sanguíneos y tejido adiposo sin trasplante exógeno de células. Un microentorno óptimo potencia la migración de células madre adiposas desde el tejido circundante e induce la diferenciación de células precursoras endoteliales y de adipocitos, tejido conectivo suelto y células musculares, y células vasculares. La neovascularización en el tejido en desarrollo siempre es requerida para evitar necrosis y formación de cicatrices, es decir, para permitir que se desarrolle un tejido adiposo maduro funcional.

La presente invención se refiere a un extracto de tejido adiposo (ATE) libre de células que presenta potencial para inducir una formación rápida de tejido adiposo y vasculatura en la zona de implante sin la administración de células. El ATE es capaz de crear un microentorno óptimo para la adipogénesis *de novo* y la angiogénesis, y por tanto puede usarse en la reparación y/o ingeniería de tejidos blandos.

El término "extracto de tejido adiposo" (ATE) en la presente memoria se refiere a una mezcla de sustancias bioactivas, preferiblemente factores adipogénicos y angiogénicos, secretados por las células de tejido adiposo, es decir, adipocitos de diversos estados de diferenciación, células endoteliales, fibroblastos, pericitos, así como células madre adiposas. El extracto está libre de células o es acelular. El extracto de tejido adiposo difiere de un medio acondicionado tradicional, por ejemplo, en que el extracto es recolectado a partir de pequeños trozos de tejido o células viables. El proceso de preparación no incluye cultivo celular, el extracto resultante está mucho más concentrado que un medio acondicionado, y el tiempo de incubación es corto, oscilando entre varios minutos y un par de días.

El extracto de tejido adiposo puede prepararse a partir de una muestra de grasa o de tejido adiposo obtenida, p.ej., mediante liposucción. Si es necesario, la muestra de tejido se corta en trozos pequeños, de tal modo que las células permanezcan sustancialmente viables. El material de la liposucción puede usarse directamente. En otras palabras, el procesamiento de la muestra de tejido no implica una homogeneización. Los factores bioactivos son extraídos incubando células en una disolución salina estéril, en salino tamponado con fosfato o en otras disoluciones tamponadas acuosas isotónicas adecuadas en las que las células o los trozos de tejido liberen factores bioactivos a la fase líquida durante la incubación. A continuación se recoge el ATE, es decir, la fase líquida sin células. El ATE también puede ser filtrado antes de su uso para esterilizar el extracto y para crear líquido acelular. El ATE resultante es una mezcla de proteínas libre de células con citoquinas y otras sustancias bioactivas.

Se puede usar tejido adiposo no solo autólogo, sino también alogénico como fuente de un ATE, y procesarse para dicho fin tal como se ha descrito anteriormente. Dichos extractos alogénicos podrían ser absorbidos y usados, p.ej., en estructuras de tejido blando estándar secadas por congelación. Un ejemplo de un producto de este tipo se prepara a partir de ácido hialurónico reticulado (p.ej., Restylane) y ATE alogénico. Dado que el extracto es acelular, las respuestas inmunes y alérgicas son improbables, incluso en un uso alogénico en el que mismo extracto e implante es válido para varios pacientes. Esto se ve apoyado por los estudios con animales descritos con más detalle en el Ejemplo 5, donde ATE humano implantado en ratas (xenoinjerto) no provocó ninguna reacción de inflamación u otras complicaciones.

El ATE es una mezcla de citoquinas óptima de factores adipogénicos y angiogénicos expresados por células de tejido adiposo. Las sustancias bioactivas del ATE se pueden medir mediante métodos rutinarios conocidos en la técnica (p.ej., ELISA). En la presente memoria se midió la expresión de 120 citoquinas en varios ATEs (ver el Ejemplo 1). Un tiempo de incubación prolongado, tal como 24 horas o más, dio lugar a un extracto más angiogénico, mientras que tiempos de incubación tanto cortos como largos produjeron una mezcla adipogénica.

Un ATE puede diseñarse para comprender las cantidades deseadas, o predeterminadas, de factores adipogénicos y angiogénicos, que incluyen factor de crecimiento celular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2) y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1). La composición deseada puede depender del uso pretendido. Según el conocimiento actual y soportado por la presente invención, VEGF y FGF-2 son considerados factores importantes para estimular la angiogénesis, mientras que FGF-2 e IGF son importantes para estimular la adipogénesis. De este modo, en una realización el ATE comprende al menos 1 pg de VEGF, al menos 70 pg de FGF-2, y al menos 50 pg de IGF-1 por 1 mg de proteína total. Dicho ATE es particularmente adecuado para estimular la adipogénesis, p.ej., en la reparación e ingeniería de tejidos blandos. En otra realización, el ATE comprende al menos 7 pg de VEGF, al menos 70 pg de FGF-2 y al menos 50 pg de IGF-1 por 1 mg de proteína total. Este tipo de ATE es particularmente útil para estimular la angiogénesis, p.ej., para inducir la curación de heridas y para tratar afecciones isquémicas y lesiones de quemaduras. Diferentes ATEs diseñados a medida pueden contener diferentes cantidades de otros diversos tipos de citoquinas, aunque pueden no ser cruciales siempre para la aplicación específica (véase Tabla 1). En general, el ATE debería contener de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2 de IGF-1 y FGF-2, y de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:10 de VEGF y FGF-2.

El contenido de un extracto de tejido adiposo puede diseñarse a medida usando diferentes tiempos y temperaturas de incubación en la preparación del ATE. Típicamente, el tiempo de incubación oscila entre 45 minutos y dos horas. Por ejemplo, un tiempo de incubación de aproximadamente 1 hora típicamente da como resultado un contenido total de proteína de aproximadamente 1,7 mg/mL a aproximadamente 2,5 mg/mL, un contenido de IGF-1 de aproximadamente 200 pg/mL a aproximadamente 1300 pg/mL, un contenido de FGF-2 de aproximadamente 200 pg/mL a aproximadamente 1400 pg/mL, y un contenido de VEGF de aproximadamente 2 pg/mL a aproximadamente 25 pg/mL. En otras palabras, un tiempo de incubación de 1 hora da como resultado típicamente un contenido de IGF-1 de aproximadamente 150 pg a aproximadamente 550 pg por 1 mg de proteína total, un contenido de FGF-2 de aproximadamente 100 pg a aproximadamente 500 pg por 1 mg de proteína total, y un contenido de VEGF de aproximadamente 3 pg a aproximadamente 20 pg por 1 mg de proteína total. Este tipo de extracto es tanto adipogénico como angiogénico. Sin embargo, si en el extracto es deseable una concentración de VEGF especialmente elevada (de aproximadamente 200 pg/mL a aproximadamente 1400 pg/mL, es decir, de aproximadamente 25 pg a aproximadamente 500 pg de VEGF por 1 mg de proteína), p.ej., especialmente la inducción de angiogénesis en el tejido diana deseado, el tiempo de incubación debería extenderse p.ej. hasta aproximadamente 24 horas (aunque esto no forma parte de la invención). Un tiempo de incubación de 24 horas típicamente da como resultado un contenido de IGF-1 de aproximadamente 60 pg a aproximadamente 200 pg por 1 mg de proteína total, un contenido de FGF-2 de aproximadamente 130 pg a aproximadamente 500 pg por 1 mg de proteína total, y un contenido de VEGF de aproximadamente 25 pg a aproximadamente 500 pg por 1 mg de proteína total. Adicionalmente, se pueden usar varias temperaturas de incubación, típicamente en el rango entre temperatura ambiente y aproximadamente 37°C, para modificar el extracto de tejido adiposo. Sin embargo, en algunas realizaciones se pueden usar temperaturas más bajas, tal como 4°C. En otras realizaciones adicionales se pueden usar temperaturas más altas, siempre que las proteínas no se desnaturalicen.

De forma más general, la concentración de VEGF en el extracto puede variar entre aproximadamente 1 pg/mL y aproximadamente 1400 pg/mL, y preferiblemente entre aproximadamente 10 pg/mL y aproximadamente 1000 pg/mL, más preferiblemente entre aproximadamente 7 pg/mL y aproximadamente 700 pg/mL, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 10 pg/mL y aproximadamente 100 pg/mL. La concentración de FGF-2 en el extracto puede variar entre aproximadamente 20 pg/mL y aproximadamente 1500 pg/mL, preferiblemente entre aproximadamente 100 pg/mL y aproximadamente 1300 pg/mL, más preferiblemente entre aproximadamente 150 pg/mL y aproximadamente 1000 pg/mL, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 200 pg/mL y aproximadamente 800 pg/mL. La concentración de IGF-1 puede variar entre aproximadamente 100 pg/mL y aproximadamente 1500 pg/mL, y preferiblemente entre aproximadamente 150 pg/mL y aproximadamente 800 pg/mL, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 200 pg/mL y aproximadamente 500 pg/mL. Por otra parte, la concentración de proteína total del extracto puede variar entre aproximadamente 0,75 mg/mL y aproximadamente 3,5 mg/mL. Preferiblemente la concentración de proteína total es de aproximadamente 1,4 mg/mL a aproximadamente 2,7 mg/mL, más preferiblemente de aproximadamente 1,8 mg/mL a aproximadamente 2,7 mg/mL, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 mg/mL a aproximadamente 2,7 mg/mL, y lo más preferiblemente de aproximadamente 2,1 mg/mL a aproximadamente 2,5 mg/mL.

Las concentraciones de las sustancias bioactivas en el extracto también pueden definirse en relación a la concentración de proteína total. Por consiguiente, la cantidad de VEGF en un extracto que contiene 1 mg de proteína total (contenido de factor de crecimiento por 1 mg de proteína) puede variar entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 800 pg, y preferiblemente entre aproximadamente 3,5 pg y aproximadamente 500 pg, más preferiblemente entre aproximadamente 7 pg y aproximadamente 300 pg, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 20 pg y aproximadamente 100 pg. La cantidad de FGF-2 en un extracto que contiene aproximadamente 1 mg de proteína total (contenido de factor de crecimiento por 1 mg de proteína) puede variar entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 1200 pg, preferiblemente entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 600 pg, más preferiblemente entre aproximadamente 70 pg y aproximadamente 500 pg, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 110 pg y aproximadamente 450 pg, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 250 pg y aproximadamente 350 pg. La cantidad de IGF-1 (contenido de factor de crecimiento por 1 mg de proteína) puede variar entre aproximadamente 50 pg y aproximadamente 700 pg, y preferiblemente entre aproximadamente 100 pg y aproximadamente 500 pg, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 100 pg y aproximadamente 300 pg, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 110 pg y aproximadamente 230 pg.

Un ATE puede comprender además otros varios factores adipogénicos y angiogénicos (presentados en la Tabla I) tal como factores de crecimiento, interleuquinas, productos de sistema de complemento, glucocorticoides, prostaglandinas, lipoproteínas y ácidos grasos libres, así como componentes de la matriz extracelular, p.ej., colágeno I, colágeno IV y colágeno VI, proteoglicanos, elastina y hialuronano, tanto de forma natural como añadidos al mismo para ajustar adicionalmente el ATE. Además, el ATE puede suplementarse, por ejemplo, con cualesquier fármacos o medicamentos deseados antes de su uso.

Por otro lado, un ATE se puede modificar adicionalmente eliminando sustancias, tal como factores de crecimiento individuales o citoquinas, antes de su uso. Por ejemplo, se puede eliminar inhibidores de angiogénesis, tal como TIMP-1 y TIMP-2, y factores principalmente adipogénicos tales como IGF-I, adiponectina y/o leptina, si el ATE se va a usar para inducir fundamentalmente angiogénesis, p.ej., en el tratamiento de afecciones isquémicas. Los métodos para

eliminar o aislar las sustancias deseadas se encuentran fácilmente disponibles en la técnica, e incluyen el aislamiento de factores de crecimiento mediante inmuoabsorción.

El diseño de un ATE puede incluir además concentrar (p.ej., mediante centrifugación) o diluir (p.ej., con un medio de cultivo, disolución salina fisiológica estéril o cualquier otra disolución isotónica tamponada) para alcanzar un ATE adecuado para un uso particular.

El potencial adipogénico del extracto de tejido adiposo se evaluó en estudios de cultivo celular, donde se cultivaron células madre derivadas de adiposas humanas (hASC) en presencia o ausencia del extracto según las presentes realizaciones. Tal como se demuestra en la Figura 2, y como se describe más detalladamente en el Ejemplo 2, el extracto claramente indujo una diferenciación adipogénica de la mayoría de las células madre, como evidencia el aumento de acumulación de color oil-red-O (formación de triglicérido).

Adicionalmente, el potencial angiogénico del extracto según las presentes realizaciones fue evaluado en un ensayo de formación de túbulos *in vitro*. Se cultivaron células endoteliales humanas encima de un cultivo de fibroblastos en presencia o ausencia del extracto de tejido adiposo, o VEGF y FGF-2. En todos los casos, se observó claramente la angiogénesis, es decir, la formación de conductos, como se demuestra en la Figura 3 y se describe más detalladamente en el Ejemplo 3. Sin embargo, el potencial angiogénico del ATE fue claramente dependiente de la dosis.

En algunas realizaciones, se puede usar un ATE según la presente invención como medio de cultivo celular o como suplemento de medio de cultivo celular para estudiar la adipogénesis o la angiogénesis *in vitro*. El ATE da como resultado una distribución uniforme de las células adiposas diferenciadas en un cultivo celular y, por tanto, proporciona un modelo celular excelente para adipogénesis que refleja las condiciones *in vivo* en humanos. Hasta la fecha, no existe un modelo celular adecuado para la diferenciación adipogénica.

Existe un objetivo general para reemplazar suero xenogénico en el cultivo celular, especialmente para aplicaciones clínicas. El suero humano es extremadamente caro y por tanto no es una solución óptima. En algunas realizaciones de la presente invención, se puede usar un ATE como componente de cultivo celular o como sustituto de suero en un medio de cultivo celular. Esto no solo es económico, sino también útil para generar construcciones de tejido humano diseñadas, especialmente cuando no son adecuados componentes derivados de animales.

La presente invención se refiere además a un implante que comprende un extracto de tejido adiposo libre de células autólogo o alogénico, y una matriz biocompatible. La reparación de defectos de tejido blando grandes o profundos es difícil solo con el extracto de tejido adiposo, pero el implante proporcionado es adecuado para rellenar el defecto de tejido blando, soporta la carga mecánica, y también permite que se regenere nuevo tejido. Adicionalmente, el implante proporciona resultados estables a largo plazo, tiene un tacto y una apariencia de tejido natural, es fácil de usar, no tóxico e inerte, pero, por otra parte, permite una difusión adecuada de nutrientes y metabolitos. La matriz biocompatible debe ser no tóxica para humanos, suficientemente inerte en un tejido, capaz de unirse y liberar moléculas pequeñas (p.ej., factores de crecimiento), y degradable en un tejido.

Las matrices biocompatibles usadas en el implante según la presente invención son preferiblemente hidrogeles. El término "hidrogel" tal como se usa en la presente memoria significa un material altamente hidratado que consiste en cadenas poliméricas hidrofílicas, que es capaz de absorber agua en su estructura, se hincha en un porcentaje de cientos o miles respecto a su volumen original, y sigue manteniendo su estructura. Los hidrogeles poliméricos naturales presentan varias propiedades prometedoras. Son degradables, pueden procesarse en condiciones suaves y son componentes de la matriz extracelular (ECM) o presentan similitudes estructurales con la misma. Los polímeros naturales a menudo son no tóxicos e interaccionan bien con el tejido circundante *in vivo*. Se pueden modificar la rigidez o robustez del hidrogel, la velocidad de degradación, y la velocidad de unión a sustancia bioactiva o de liberación de sustancia, dependiendo de los requisitos de un implante específico. En la técnica se dispone fácilmente de métodos para dichas modificaciones.

Un material hidrogel adecuado es el ácido hialurónico, o hialuronano, que es un polisacárido natural ampliamente distribuido que conforma la matriz extracelular de tejidos conectivos. Consiste en grupos de ácido D-glucurónico enlazados a cadenas de N-acetilglucosamina. El ácido hialurónico se un biomaterial natural utilizado habitualmente, ya que es no inmunogénico y ha sido usado con seguridad durante varias décadas en el campo. El ácido hialurónico reticulado se encuentra disponible comercialmente, p.ej., bajo los nombres comerciales de Restylane® (Q-Med, Suecia), Eleveess® (Anika Therapeutics, EE.UU.), Juvederm® (L.E.A. Derm, Francia), Rey-oungel® (Bioha laboratories, China), Puragen® (Genzyme, EE.UU.), Prevelle Silk® (Genzyme, EE.UU.), Teosyal® (Teoxane laboratories, Suiza), Boletero® (Merz Aesthetik, Alemania), Revanesse® (Auragenix Biopharma, Países Bajos) and Rofilan Hylan Gel® (Cairo Tech, Egipto). Varios de estos ácidos hialurónicos reticulados (p.ej., Restylane) han sido aprobados por la FDA como sustancias de relleno de tejidos blandos en aplicaciones clínicas.

Otro hidrogel adecuado para uso en la presente invención es el chitosán, que es un polisacárido natural que contiene polímeros de glucosamina y N-acetilglucosamina. Al ser un biomaterial lentamente biodegradable y no tóxico para humanos, el chitosán se ha usado ampliamente como agente farmacéutico tanto en industria como en investigación. Previamente, se ha usado chitosán modificado como sistema de administración de liberación controlada para

hormonas, fármacos o proteínas, donde la liberación se produce tanto por difusión como por degradación del biomaterial.

Otros materiales formadores de hidrogel naturales adecuados para uso en la presente invención se encuentra fácilmente al alcance del especialista en la técnica, e incluyen, p.ej., colágeno, alginato, gelatina, fibrina y agarosa.

5 También se pueden usar hidrogeles sintéticos tales como poliésteres basados en ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico glicólico PLGA, policaprolactona (PCL) como hidrogeles en los implantes según las realizaciones de la presente invención.

10 Dependiendo del material, puede ser posible alcanzar más adipogénesis o angiogénesis. Seleccionando diferentes materiales de estructura o mediante modificaciones del material (p.ej., reticulación de hialuronano), puede ser posible mejorar el efecto adipogénico o angiogénico del implante y enfocar el efecto hacia un potencial más angiogénico o más adipogénico.

Un implante según las presentes realizaciones también puede comprender una mezcla de hidrogeles, tal como una mezcla de chitosán y ácido hialurónico. Los hidrogeles se pueden combinar mediante mezclado, copolimerización o funcionalización.

15 En algunas realizaciones, la matriz biocompatible puede comprender nano o micropartículas. Por ejemplo, se pueden preparar micropartículas a partir de chitosán, p.ej., mediante un método de congelación, o se pueden producir micropartículas sintéticas de PLA, PLGA o PCL mediante el método de agua-aceite-agua, y mezclarse dentro de un segundo material de hidrogel, p.ej., ácido hialurónico. De esta manera, se puede proporcionar el extracto de tejido adiposo tanto en nanopartículas como micropartículas, y en el hidrogel que rodea dichas partículas en un implante.
20 En general, el ATE se puede combinar con cualquier dispositivo de liberación de fármacos degradable.

La cantidad de matriz biocompatible en relación a la cantidad de extracto de tejido adiposo en el implante típicamente está entre aproximadamente 37% y aproximadamente 50% de matriz biocompatible y entre aproximadamente 50% y aproximadamente 63% de extracto. Cuando la matriz biocompatible es un hidrogel, tal como ácido hialurónico, una gota del contenido de hidrogel en el implante conduce a una estructura de gel más débil, dando como resultado una mayor velocidad de degradación en el cuerpo. En una realización específica, el implante comprende aproximadamente 25 45,5% de ácido hialurónico y aproximadamente 54,5% de extracto de tejido adiposo. Dicho implante tiene una resistencia de gel suficientemente débil para permitir la inyección directamente en el tejido receptor.

30 El hidrogel, o combinaciones del mismo, también puede modificarse mediante reticulación, secado por congelación, mezclado y/o copolimerización, y se pueden usar diferentes concentraciones de combinaciones de hidrogel. El tamaño del implante también puede variar desde muy pequeño (unos pocos microlitros) hasta varias decenas de mililitros. Típicamente, p.ej. para fines de reconstrucción facial, se usan de 1 a 5 mililitros del implante.

El contenido de extracto de tejido adiposo del implante puede variar. Típicamente, el implante comprende entre aproximadamente 300 µg/mL y aproximadamente 1,2 mg/mL de proteína, preferiblemente entre 600 µg/mL y 1 mg/mL, e incluso más preferiblemente cerca de 800 a 900 µg/mL.

35 El implante según la presente invención puede ser implantado mediante cualquier medio adecuado. La inyección ofrece un método factible para implantar. En la técnica se conocen formas alternativas de implantación, tal como una estructura, una película o una membrana.

40 El potencial adipogénico y angiogénico de un implante según la presente invención fue verificado en experimentos con animales. Los implantes fueron implantados *in vivo* bajo la piel de ratas, y se monitorizó la formación de tejido adiposo y de vasos sanguíneos en la zona del implante (Ejemplo 4, Figura 4 y Figura 5). Ya a las dos semanas, se observó la acumulación de tejido adiposo, así como la formación de vasos. Entre cuatro y seis semanas, se observó una formación extensiva de vasos y estructuras de tipo arterial en contacto íntimo con el implante, así como la formación de algo de tejido adiposo. Entre 12 y 20 semanas, se detectó una capa densa, gruesa, altamente vascularizada de tejido adiposo maduro en contacto íntimo con el implante. A las 40 semanas, el implante se había degradado; sin embargo, el tejido adiposo maduro desarrollado seguía presente, sustanciando los resultados a largo 45 plazo que se pueden obtener con los implantes de las presentes realizaciones. De esta manera, estos resultados demuestran que el implante según las presentes realizaciones puede usarse de hecho para la ingeniería y reparación de tejidos blandos *in vivo*.

50 Por tanto, la presente invención proporciona un implante que induce la formación y angiogénesis de tejido adiposo *de novo* y que proporciona un sistema de administración a largo plazo de factores adipogénicos y/o angiogénicos que han sido capturados e inmovilizados en una estructura de hidrogel. El implante bioactivo de la presente invención ayuda a la inducción de la infiltración en células hospedantes y permite una regeneración de tejido más eficiente. Los efectos de los implantes son locales y específicos de sitio, lo que reduce las dosis generales de factores adipogénicos y angiogénicos requeridas para un determinado efecto. Esto no solo es económico sino también un modo de evitar 55 efectos sistémicos perjudiciales.

La presente invención proporciona además un método para preparar un implante según la presente invención. El método comprende mezclar un extracto de tejido adiposo, o absorber el mismo, en una matriz biocompatible. El mezclamiento típicamente se lleva a cabo cuidadosamente, evitando la formación de burbujas de aire, a temperatura ambiente en jeringas estériles hasta que el ATE y el material de hidrogel están completamente mezclados. El extracto es capturado y absorbido inmediatamente por el material de hidrogel, y queda listo para ser usado en un implante.

Además, la presente invención proporciona el uso de un extracto de tejido adiposo y un implante según la presente invención en la reparación o ingeniería de tejidos blandos. Por consiguiente, el extracto y el implante pueden usarse en un método para reparar o diseñar tejidos blandos para alcanzar el desarrollo de tejido adiposo maduro y una vascularización adecuada. En una realización específica, el implante se administra mediante inyección.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un extracto de tejido adiposo y un implante según la presente invención en la inducción de angiogénesis y/o la reparación de tejido isquémico. Por consiguiente, el extracto y el implante pueden usarse en un método para reparar o diseñar capilares para alcanzar el desarrollo de una vascularización adecuada. En una realización específica, el implante se administra mediante inyección. En relación con la presente invención, se ha demostrado que para la adipogénesis normalmente es ventajosa la presencia de células grasas o de células madre de tejido adiposo existentes en un tejido. Si el implante, p.ej., se administra en un tejido sin células adiposas, el efecto del implante puede ser más, o principalmente, angiogénico en lugar de adipogénico.

Una ventaja de la presente invención es que la preparación de ATE es fácil y su diseño es rápido debido a un periodo de incubación corto y un tiempo de mezclamiento corto. De esta manera, el proceso completo de derivar un tejido adiposo, procesarlo en un ATE y después en un implante, así como la implantación, puede completarse durante una única operación.

Será obvio para el especialista en la técnica que, según avance la tecnología, el concepto inventivo puede implementarse de varias formas. La invención y sus realizaciones no están limitadas por los ejemplos descritos a continuación, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Preparación de extractos de tejido adiposo para cultivo celular y estudios con animales

Especímenes de tejido adiposo humano obtenidos de liposucciones y como tejido subcutáneo de operaciones quirúrgicas (no forma parte de la invención), así como especímenes de tejido adiposo de rata obtenidos de ratas sacrificadas, fueron picados en pequeños trozos cuando fue necesario. Los trozos de tejido o el material de liposucción se transfirieron a tubos de 50 mL (Nunc). Se añadió a los tubos disolución salina estéril (para estudios animales) o medio DMEM/F12 (para estudios de cultivo celular, que no forma parte de la invención) sin ningún suplemento, y se incubó durante al menos 45 minutos. Los tubos fueron agitados suavemente unas pocas veces durante la incubación. Se tomaron muestras de extracto de tejido adiposo (ATE) a diferentes tiempos (para cada punto de toma de muestra, se eliminó completamente el medio o la disolución salina y se reemplazó con un líquido fresco), se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y se esterilizó por filtración antes de su uso en cultivo celular o en experimentos con animales. Se evaluó la viabilidad de las células aislando las células y cultivándolas adicionalmente después de 24 horas de producción de ATE. Las células de la fracción vascular estromal eran morfológicamente normales y retuvieron su actividad biológica, y proliferaron de forma normal.

Se analizaron ochenta muestras de ATE humano derivadas de diferentes pacientes y/o tomadas a diferentes tiempos (1h, 2h o 24h) para determinar la concentración total de proteína mediante un ensayo BCA de proteínas (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.). La concentración total de proteína fue siempre máxima a los tiempos de 1 h (alícuota 1) y 2 h (alícuota 2), y la concentración de proteína disminuyó con el tiempo (Fig. 1A). Típicamente, la concentración total de proteína fue de aproximadamente 1,8 mg/mL a aproximadamente 2,5 mg/mL en la primera alícuota (1 h), de aproximadamente 1,5 mg/mL en la segunda alícuota (2 h), y de aproximadamente 1 mg/mL en la tercera alícuota (24 h). Los extractos incubados en una disolución salina estéril o en un medio de cultivo celular presentaron contenidos de proteína total correspondientes. La producción óptima de proteína se obtuvo cuando se usaron para la extracción volúmenes iguales de una disolución de incubación (medio o disolución salina estéril) y un tejido adiposo triturado. Dichas condiciones dieron como resultado concentraciones de proteína cercanas a 2 mg/mL, lo que se encuentra en un rango apropiado para los estudios de cultivo celular. Sin embargo, concentraciones más fuertes puede ser necesario, a menudo lo es, diluirlas hasta un rango apropiado. Cualquier exceso de disolución de incubación dio como resultado bajas concentraciones de proteína que requirieron una modificación adicional para concentrar en columnas de giro.

Adicionalmente, se midió la concentración de un factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) o factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) en de 31 a 40 muestras de extracto de tejido adiposo tomadas a diferentes tiempos (1 h, 2 h y 24 h) mediante Ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzima (ELISA, inmunoensayo de VEGF humano de Quantikine, inmunoensayo básico de FGF humano de Quantikine o inmunoensayo de IGF-I humano de Quantikine, respectivamente, R&D Systems, Abingdon, R.U.). El ELISA se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Todos los patrones y las muestras fueron medidos por duplicado.

Según los resultados, la concentración de IGF-1 alcanzó su nivel máximo después de 1 hora de incubación (Fig. 1B), mientras que la concentración de FGF-2 fue bastante alta a lo largo de toda la incubación (Fig. 1C). Parece que el VEGF aumentó drásticamente después de 24 horas de cultivo (Fig. 1D). Aunque la concentración de VEGF era adecuada a 1 hora y 2 horas para la inducción de adipogénesis o angiogénesis, según se evaluó, el VEGF alcanzó niveles muy altos solo después de 24 horas de incubación.

Adicionalmente, se evaluaron juntos todos los 120 factores y citoquinas de dos muestras de extracto diferentes a dos tiempos diferentes (1 h y 24 h) con RayBio® Human Cytokine Antibody Array C Series 1000 (RayBioTech, Inc., Norcross, GA, EE.UU.). El sistema se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se midieron por duplicado y los resultados obtenidos fueron semicuantitativos. Los factores que se muestran como (-) en la Tabla 1 no fueron expresados, o su expresión fue baja y por tanto indetectable en el sistema.

Según las medidas de citoquinas, el perfil de citoquinas del ATE dentro de los límites de detección del sistema fue el que se indica a continuación: las muestras de ATE de 1 h expresaron cantidades elevadas de angiogenina, adiponectina, TIMP-1 y TIMP-2, MIF, IGFBP-6, NAP-2, leptina, PDGF-BB, GRO y pequeñas cantidades de otros varios factores, mostrados en la Tabla I. Las muestras de ATE de 24 h expresaron cantidades grandes de angiogenina, IL-6, NAP-2, MCP-1, adiponectina, GRO, TIMP-1, TIMP-2 y pequeñas cantidades de otros varios factores, mostrados en la Tabla I. A las 24 horas, sobre todo, se expresaron más citoquinas que a 1 hora (véase la Tabla I). Las expresiones de leptina, PDGF-BB, MIF e IGFBP-6 fueron elevadas a 1 hora, mientras que a 24 horas fueron bajas. A las 24 horas, la expresión de MCP-1, IL-6, CCL5 y VEGF fue elevada, pero a 1 hora solo se detectó en baja cantidad.

Por tanto, variando el tiempo de incubación y ajustando las concentraciones de factores de crecimiento, es posible preparar y ajustar a medida el ATE para diferentes usos.

Tabla 1. Expresión de varias citoquinas

Citoquina	1 hora	24 horas	Citoquina	1 hora	24 horas
control	++++	++++	VEGF	+	+++
FGF-2	+	+	IGF-I	+	+
angiogenina	+++++	+++++	MIF	++	+
adiponectina (Acrp30)	+++++	++++	IGFBP-6	+++	-
TIMP-1	+++	+++	NAP-2	++	++++
TIMP-2	+++	+++	leptina	++	+
CCL5 (RANTES)	+	++	PDGF-BB	++++	-
MCP-1	+	++++	GRO	++	+++
IL-8	-	++	IL-6	+	++++
IL-5	-	++	AgRP	-	+
Fas/TNFRSF6	-	+	angiotensina-2	-	+
MIP-1 α	+	+	anfibirregulina	-	+
IGF-1 SR	+	+	Axl	-	+
osteoprotegerina	+	+	GITR	-	+
MIP-1 β	+	+	GITR-ligando	-	+
MIP-3 β	-	+	FGF-9	+	+
FGF-4	+	+	ENA-78	+	+
FGF-6	+	-	EGF-R	-	+
GCSF	+	+	Dtk	-	+
IL-1 R4/ST2	+	+	CTACK	-	+
IL-1 RI	+	+	ICAM-1	-	+
IL-4	-	+			
IL-11	+	+	ICAM-3	-	+
IL-12 p70	+	+	IGFBP-3	-	+
IL-12 p40	-	+	PIGF	-	+
IL-17	-	+	oncostatina M	-	+
TRAIL R3	+	-	NT-4	-	+
TRAIL R4	-	+	SCF	+	+
uPAR	+	-	MSP- α	-	+
VEGF-D	+	-	linfotactina	-	+
MCP-2	-	+	I-TAC	-	+
MCP-3	-	+	trombopoietina	-	+

eotaxina-2	+	-	LIGHT	+	+
eotaxina-3	+	-	IL-1 α	+	-

Abreviaturas: AgRP, proteína relacionada con agutí; Axl, AXL tirosina quinasa de receptor; CCL5 (RANTES), quimiocina (estructura C-C) ligando 5; CTACK, quimiocina atractora de células T cutáneas; Dtk, tirosina quinasa de receptor de crecimiento; EGF-R, receptor de factor de crecimiento epidérmico; ENA-78, péptido 78 activante de neutrófilos epiteliales; EGF-R, factor R de crecimiento epidérmico; FGF-2, factor 2 de crecimiento de fibroblastos; FGF-4, factor 4 de crecimiento de fibroblastos; FGF-6, factor 6 de crecimiento de fibroblastos; FGF-9, factor 2 de crecimiento de fibroblastos; GCSF, factor estimulante de colonia de granulocitos; GTR, receptor de factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides; GTR-ligando, ligando de receptor de factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides; GRO, oncogén relacionado con crecimiento de quimioattractor 1 de neutrófilos inducidos por citoquinas; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; ICAM-3, molécula de adhesión intercelular 3; IGF-1, factor 1 de crecimiento de tipo insulina; IGF-1 SR, receptor soluble de factor 1 de crecimiento de tipo insulina; IGFBP-3, proteína de unión 3 de factor de crecimiento de tipo insulina; IGFBP-6, proteína de unión 6 de factor de crecimiento de tipo insulina; IL-1 R4/ST2, interleuquina 1 Receptor 4; IL-1 R1, interleuquina 1 Receptor 1; IL-5, interleuquina 5; IL-6, interleuquina 6; IL-8, interleuquina 8; IL-11, interleuquina 11; IL-12 p70, interleuquina 12 p70; IL-12 p40, interleuquina 12 p40; IL-17, interleuquina 17; I-TAC, quimioattractor alfa de célula T inducible por interferón; LIGHT, homólogo a linfotoxina, exhibe expresión inducible y compite con glicoproteína D de HSV para mediador de entrada de virus del herpes, un receptor expresado por linfocitos T; MCP-1, proteína quimiotáctica 1 de monocitos; MCP-2, proteína quimiotáctica 2 de monocitos; MCP-3, proteína quimiotáctica 3 de monocitos; MIF, factor inhibidor de migración de macrófagos; MIP-1 α , proteína 1 α inflamatoria de macrófagos; MIP-1 β , proteína 1 β inflamatoria de macrófagos; MIP-3 β , proteína 3 β inflamatoria de macrófagos; MSP- α , proteína α estimuladora de macrófagos; NAP-2, proteína 2 activante de neutrófilos humanos; NT-4, neurotrofina 4; PIGF, factor de crecimiento placentario; TIMP-1, inhibidor de tejido de metaloproteínasa 1 de matriz; TIMP-2, inhibidor de tejido de metaloproteínasa 2 de matriz; TRAIL R3, receptor 3 de ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral; TRAIL R4, receptor 4 de ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral; uPAR, activador de plasminógeno de tipo uroquinasa; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; VEGF-D, factor D de crecimiento endotelial vascular.

Ejemplo 2. Potencial adipogénico de los extractos de tejido adiposo (no forma parte de la invención)

Se aislaron células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC) según un protocolo modificado de Zuk PA et al. (Mol Biol Cell. 2002 dic; 13(12): 4279-95). Resumidamente, se tomaron especímenes de tejido adiposo humano obtenidos de operaciones quirúrgicas o de liposucciones y se cortaron en trozos pequeños, si era necesario, y se sometieron a digestión enzimática en medio DMEM/F12 suplementado con un 0,05% de colagenasa I durante 60 a 90 minutos a 37°C en un agitador. Para facilitar la digestión, el tejido fue aspirado ocasionalmente durante el periodo de incubación. A fin de separar una fracción vascular estromal y una población de células madre, el tejido digerido se centrifugó a 600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El tejido digerido fue filtrado en primer lugar a través de un filtro con un tamaño de poro de 100 μ m y después a través de un filtro con un tamaño de poro de 40 μ m. La población de células madre humanas obtenidas se cultivó en DMEM/F12 suplementado con un 15% de suero humano (HS, Cambrex), L-glutamina 1 mM y 1% de mezcla antibióticos-antimicóticos (Gibco). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de aire con un 5% en CO₂ con una humedad constante. Se permitió que las células se unieran durante una noche. Al día siguiente las células fueron lavadas varias veces y se cambió el medio para eliminar los residuos.

Se cultivaron hASCs como se ha indicado antes y el medio se cambió cada dos o tres días. Se tripsinizaron los cultivos de células madre de pasajes tempranos (p1 a p5) derivados de dos o tres pacientes diferentes, se agruparon y se llevaron a placa en un medio de cultivo con una densidad de 10000 células/cm². Al siguiente día, se aplicaron seis condiciones de cultivo diferentes:

- 1) Medio de cultivo normal suplementado con suero humano: DMEM/F12, 15% de suero humano, 1% de mezcla antibiótica-antimicótica, L-glutamina 1 mM.
- 2) Medio de cultivo normal suplementado con ATE: DMEM/F12, 15% de suero humano, 1% de mezcla antibiótica-antimicótica, L-glutamina 1 mM; y 300 μ g/mL (concentración de proteína) de ATE (aproximadamente 25% del volumen de cultivo).
- 3) Medio de cultivo normal suplementado con ATE: DMEM/F12, 15% de suero humano, 1% de mezcla antibiótica-antimicótica, L-glutamina 1 mM; y 600 μ g/mL (concentración de proteína) de ATE (aproximadamente 50% del volumen de cultivo).
- 4) Medio de cultivo normal suplementado con ATE: DMEM/F12, 15% de suero humano, 1% de mezcla antibiótica-antimicótica, L-glutamina 1 mM; y 950 μ g/mL (concentración de proteína) de ATE (aproximadamente 75% del volumen de cultivo).
- 5) ATE (1200 μ g/mL de concentración de proteína; 83% del volumen final de cultivo) suplementado con 15% de suero humano, 1% de mezcla antibiótica-antimicótica; L-glutamina 1 mM.
- 6) Medio adipogénico: DMEM/F12, 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de mezcla antibiótica-antimicótica, 1% de L-glutamina, biotina 33 M, pantotenato 17 M, insulina 100 nM, dexametasona 1 M (Sigma), e isobutil-

metilxantina 0,25 mM (IBMX, Sigma). La IBMX se dejó en el medio de cultivo adipogénico solo durante las primeras 24 horas.

El medio se cambió cada dos a tres días. A los tiempos definidos (de 2 a 3 semanas y 5 semanas) se evaluó la diferenciación adipogénica mediante una tinción de los cultivos celulares con Oil-red-O (Sigma). Los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Gibco a menos que se indique lo contrario.

La diferenciación adipogénica en las diferentes condiciones de cultivo se evaluó en base a la acumulación de triglicéridos en las células detectada mediante tinción con Oil-red-O. Resumidamente, se preparó una disolución de 0,5% de Oil-red-O disolviendo Oil-red-O en isopropanol al 100%. La disolución se mezcló con agua destilada en una proporción de 2:3 y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La disolución resultante se filtró usando un papel de filtro estándar. Antes de la tinción, el medio de cultivo celular fue aspirado de los pocillos y los pocillos fueron lavados suavemente con PBS de dos a tres veces. Las células fueron fijadas con una disolución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. A continuación los pocillos fueron lavados con agua destilada. Las células fueron incubadas en una disolución de isopropanol al 60% durante 2-5 minutos, después de lo cual se añadió la disolución preparada previamente de Oil-red-O y se incubó durante 5 minutos. Los pocillos fueron lavados con agua destilada hasta que el agua fue transparente. Se tomaron micrografías de contraste de fase de las células teñidas con un Nikon TS-100 conectado a una unidad de cámara CCD (Nikon, Tokio, Japón). Se midió la cantidad de diferenciación adipogénica evaluando la extensión de área teñida de rojo dentro de las células.

En cada población de células madre, se demostró que el extracto de tejido adiposo induce una conversión adipogénica homogénea dependiente de la dosis a una mayoría de las células del cultivo después de 1 a 3 semanas en cultivo (Fig. 2). El efecto adipogénico se observó cuando se usó al menos 200 µg/mL de ATE, y el efecto adipogénico fue más extendido cuando se evaluaron concentraciones mayores de ATE, de hasta 2 mg/mL. El ATE usado en el experimento se preparó como se describe en el Ejemplo 1, y contenía 1,8 mg/mL de proteína, 143 pg/mL de IGF-I, 123 pg/mL de FGF-2 y 3,6 pg/mL de VEGF.

Ejemplo 3. Potencial angiogénico de los extractos de tejido adiposo (no forma parte de la invención)

Se cultivaron fibroblastos BJ (CRL-2522; American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) en MEM (Gibco) suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 1% de mezcla antibiótica-antimicótica (Gibco). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de aire con un 5% de CO₂ y una humedad constante. El medio se cambió cada dos a tres días y las células confluentes se dividieron 1:4.

Se aislaron células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) de un espécimen de cordón umbilical y se cultivaron en medio de crecimiento endotelial (EGM-2, Lonza) hasta el pasaje 7. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de aire con un 5% de CO₂ y una humedad constante. El medio se cambió cada dos a tres días y las células confluentes se dividieron 1:4.

Para estudiar el potencial angiogénico del extracto de tejido adiposo según la presente invención, los fibroblastos BJ fueron llevados a placa con una densidad de 20000 células/cm² en placas de 48 pocillos y se cultivaron hasta confluencia (3 a 4 días). A continuación, se llevaron a placa las HUVECs encima de cultivos de fibroblastos confluentes con una densidad de 4000 células/cm². Tras llevar a placa las HUVECs, el medio de cultivo se cambió a medio EGM-2 (del kit bala EGM-2, Lonza). Al día siguiente, co-cultivos paralelos fueron tratados de forma diferente:

- 1) Control negativo: medio basal de células endoteliales (EBM-2, del kit bala EGM-2);
- 2) Control positivo A: EBM-2 suplementado con 10 ng/mL de VEGF (R&D Systems) y 1 ng/mL de FGF-2 (Sigma);
- 3) Control positivo B: EBM-2 suplementado con 50 ng/mL de VEGF (R&D Systems) y 5 ng/mL de FGF-2 (Sigma);
- 4) EBM-2 suplementado con 440 µg/mL (concentración de proteína; aproximadamente el 25% del volumen total del medio de cultivo celular) de ATE;
- 5) EBM-2 suplementado con 880 µg/mL (concentración de proteína; aproximadamente el 50% del volumen total del medio de cultivo celular) de ATE;
- 6) EBM-2 suplementado con 1320 µg/mL (concentración de proteína; aproximadamente el 75% del volumen total del medio de cultivo celular) de ATE.

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con un 2% de FBS, 1% de L-glutamina, 0,1% de GA-1000 (disolución de sulfato de gentamicina y anfotericina B del kit bala de EGM-2). El ATE usado en el experimento se preparó como se describe en el Ejemplo 1 y contenía 1,76 mg/mL de proteína, 143,4 pg/mL de IGF-I, 123,1 pg/mL de FGF-2 y 3,56 pg/mL de VEGF.

Las células fueron cultivadas durante siete días antes de la tinción inmunocitoquímica con un anticuerpo específico de célula endotelial (anti-factor von Willebrand). Los medios se cambiaron una vez durante el cultivo.

La tinción inmunocitoquímica se llevó a cabo como se indica a continuación: las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con etanol al 70% enfriado en hielo durante 20 minutos, se permeabilizaron con 0,5% de Triton X-100

(JT Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.) durante 15 minutos, y se bloquearon para tinción inespecífica con 10% de BSA (Gibco) durante 30 minutos. Después del bloqueo, las células fueron incubadas con un anticuerpo primario de Factor de von Willebrand (anti-vWF producido en conejo, Sigma, 1:500) a 4°C durante una noche. Al siguiente día, las células fueron lavadas tres veces con PBS, incubadas durante 30 minutos con un anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal para IgG de conejo FITC, Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Alemania, 1:500), y se lavaron tres veces con PBS. Tras la tinción, se dejaron 500 µL de PBS en los pocillos del cultivo celular y los pocillos se sellaron con parafilm. La fluorescencia se visualizó mediante un microscopio Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón) equipado con una Unidad de control de cámara DS L-1, y las imágenes se procesaron con el software Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, EE.UU.).

El extracto de tejido adiposo indujo una formación de estructuras de tipo tubular en los co-cultivos desde el día 4 o 5. Después de siete días, se observó una clara formación de conductos en los controles positivos A y B (Figuras 3E y 3F, respectivamente) y en las células tratadas con 880 µg/mL (Figura 3C) o 1320 µg/mL (Figura 3D) de ATE. El tratamiento con factor de crecimiento en el control positivo A claramente estimuló la formación de estructuras de tipo capilar típicas, largas, delgadas y ramificadas. Cualquier cantidad en exceso de factores de crecimiento en el control positivo B, no obstante, dio como resultado estructuras tubulares algo desorganizadas o agrupadas. El tratamiento con factor de crecimiento en el control positivo A representó una situación *in vivo* en un tejido. Los resultados obtenidos con 1320 µg/mL de ATE, e incluso con 880 µg/mL de ATE, fueron muy similares a los resultados obtenidos con factores de crecimiento angiogénico conocidos (control positivo A). El extracto de tejido adiposo produjo un efecto dependiente de la dosis en las células HUVEC y produjo una red de capilares.

Ejemplo 4. Preparación de implantes inyectables

Se formularon dos implantes inyectables diferentes según la presente invención para estudios con animales: 1) un implante que comprendía 54,5% de ATE de rata (concentración de proteína total 1,3 mg/mL) y 45,5 % de ácido hialurónico; y 2) un implante que comprendía 54,5% de ATE humano (concentración de proteína total 2,5 mg/mL) y 45,5% de ácido hialurónico. En estas formulaciones, el ácido hialurónico usado fue un ácido hialurónico estabilizado no derivado de animal (NASHA) 20 mg/mL, Restylane (Q-Med, Uppsala, Suecia). También se pueden usar diferentes formas de productos hialurónicos reticulados (p.ej., Restylane Perlane o Restylane Touch o Macrolane), dependiendo del tipo de efecto.

Se prepararon implantes mezclando 1 mL de Restylane cuidadosamente con 1,2 mL de ATE (preparado como se describe en el Ejemplo 1). El volumen de implante final colocado bajo la hipodermis de ratas fue siempre de 100 µL y consistió en 45,5 µL de ácido hialurónico y 54,5 µL de líquido incorporado. Dichos implantes son suficientemente viscosos para evitar una resorción inmediata en un tejido o la pérdida por fugas en la zona de inyección, pero contienen una cantidad elevada del extracto.

Se prepararon implantes de control que contenían 54,5% de salino tamponado con fosfato (PBS) y 45,5% de ácido hialurónico como se ha descrito anteriormente.

Para estudiar la liberación de proteínas desde los implantes, se inyectaron 120 µL de cada implante en un inserto de tira de placa de 96 pocillos con un tamaño de poro de 0,2 µm (Nunc). Los insertos fueron colocados en placas de cultivo celular de 96 pocillos y se incubaron en 150 µL de PBS a 37°C durante varias semanas. Se cambió el PBS cada tres días. Se recogieron alícuotas y se almacenaron a -20°C para determinar de proteína total y para el análisis ELISA. Los implantes de control no liberaron proteína, mientras que los implantes que contenían ATE liberaron un máximo de 350 µg/mL de proteína por tres días y un mínimo de 100 µg/mL de proteína por tres días durante un periodo de dos semanas. Este experimento de liberación demostró que la proteína es liberada desde el implante y, por lo tanto, que los implantes son funcionales.

Ejemplo 5. Actividad adipogénica y angiogénica de implantes in vivo (estudios en animales)

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según las leyes de protección animal y fueron aprobados por el Departamento de Bienestar Social y Servicios de Sanidad de la Oficina Provincial Estatal de Finlandia Occidental.

Se anestesiaron veintisiete ratas Sprague-Dawley macho (peso medio 300 g) con una mezcla de Domitor (1 mg/mL; 0,5 mg/kg) y Ketalar (10 mg/mL; 75 mg/kg). Los implantes y los controles preparados como se describe en el Ejemplo 4 fueron inyectados bajo la hipodermis dorsal de las ratas con una jeringa de 1 mL y una aguja de calibre 27 en un volumen final de 100 µL. Los implantes se dejaron bajo la hipodermis durante 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 o 20 semanas y durante 9 meses, tras lo cual los animales fueron sacrificados con dióxido de carbono. Se tomaron muestras de tejido de las zonas de implante y se procesaron para análisis histológico. El ATE humano usado en el experimento se preparó como se describe en el Ejemplo 1 y contenía 2,5 mg/mL de proteína, 200 pg/mL de IGF-1, 863 pg/mL de FGF-2 y 61 pg/mL de VEGF. El ATE de rata usado en el experimento se preparó como se describe en el Ejemplo 1 y contenía 1,3 mg/mL de proteína.

Las muestras de tejido se fijaron en paraformaldehído al 4% durante una noche, se deshidrataron con una serie de etanol graduado y se embebieron en parafina. Se cortaron especímenes en láminas de 5 µm de espesor con un micrótopo (Microm HM 430, Microm GmbH, Waldorf, Alemania) y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para

análisis histológico. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Nikon Microphot FXA (Nikon, Tokio, Japón) y se procesaron usando Corel Draw 10 y Adobe Photoshop 7.0.

La tinción con hematoxilina-eosina de los especímenes histológicos reveló una neovascularización y una formación de tejido adiposo en el área del implante (Fig. 4 y Fig. 5). Se detectaron numerosos vasos pequeños y algunos vasos grandes maduros con eritrocitos presentes en las muestras tomadas después de 2 semanas de la implantación. Solo se detectó una pequeña, o nula, formación de tejido adiposo. En las muestras tomadas 4 semanas después de la implantación, se detectaron algunos depósitos de tejido adiposo redondos blancos en contacto íntimo con el implante remanente y con las estructuras de vasos formadas. El pequeño tamaño de los depósitos de tejido adiposo detectados indicó que eran de formación reciente. En las muestras tomadas 4 o 6 semanas después de la implantación, la vascularización había progresado, y se podía observar un número masivo de pequeños vasos y estructuras similares a arteriolas y vénulas, así como algo de formación de tejido adiposo. Los vasos formados eran más grandes en número y en diámetro, en comparación con los controles. A las 12 a 20 semanas, se detectó una capa densa, gruesa y altamente vascularizada de tejido adiposo maduro en contacto íntimo con el implante.

En el experimento, las reacciones de inflamación, la velocidad de degradación del implante, la adipogénesis y la angiogénesis fueron seguidas durante 9 meses. No se produjeron complicaciones debidas al procedimiento de inyección del implante o a la recuperación post-operatorio de la anestesia. No se detectó inflamación o formación de cápsulas. Todos los implantes y los controles indujeron alguna pequeña formación de vasos, posiblemente debida a una leve reacción causada por el material de ácido hialurónico extraño. Sin embargo, la formación de vasos solo fue extensiva en las ratas inyectadas con implantes que contenían ATE de rata o humano. El ATE humano produjo más vascularización que el ATE de rata, pero ambos parecían inducir bien la adipogénesis.

Ejemplo 6. Pre-ensayo clínico.

El extracto de tejido adiposo se preparó a partir de una muestra de liposucción mediante succión directa en una jeringa estéril. Para maximizar la extracción de proteína, se fijaron 2,5 mL de la grasa liposucionada con 1,5 mL de disolución salina isotónica estéril en una jeringa estéril y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. La jeringa se agitó varias veces durante la incubación. La concentración total de proteína del extracto resultante fue de 2,5 mg/mL, y las concentraciones de factor de crecimiento fueron de 17 pg/mL de VEGF y de 177 pg/mL de FGF-2.

Tras la incubación, el extracto se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 μ m (filtro de jeringa Acrodisc, Pall Gelman Laboratory, An Arbor, EE.UU.) en una segunda jeringa estéril conectada a través de un adaptador a la primera jeringa. La segunda jeringa que contenía ahora el extracto se conectó con un adaptador a una tercera jeringa que contenía una cantidad adecuada de Restylane. El extracto de tejido adiposo estéril resultante se mezcló con Restylane, siendo la proporción de 0,9 mL (45,5%) de Restylane y 1,2 mL (54,5%) del extracto de tejido adiposo. Las fases líquida y gel se mezclaron inyectando el material de ida y vuelta entre la segunda y tercera jeringas. El material del implante se consideró suficientemente homogéneo cuando el color rosa pálido del extracto de tejido adiposo se distribuyó uniformemente por el material. El implante final contenía 1,2 mg/mL de proteína.

El implante obtenido se inyectó inmediatamente con una aguja 30 G subcutáneamente en dos sitios diferentes en una pierna de un voluntario sano. El primer sitio comprendía un tejido de cicatriz viejo existente, y se inyectó en él 450 μ L del implante. El segundo sitio de la pierna fue provisto de dos defectos mediante eliminación de tejido graso subcutáneo, de tal modo que los sitios de defecto redondo resultantes en el tejido tenían aproximadamente 1 cm de diámetro. Un defecto se dejó intacto, como control, mientras que el otro defecto se rellenó con 900 μ L del implante.

No se observaron reacciones alérgicas u otras complicaciones después del implante o durante el tiempo de seguimiento. Se tomaron biopsias de los sitios de implante, así como del tejido de control, 3 meses (12 semanas) y 6 meses (28 semanas) después del inicio del pre-ensayo. No se pudieron observar reacciones de inflamación, y después de tres meses todavía había presente una cantidad grande de material de implante. Se observó un aumento de la formación de vasos sanguíneos en el tejido cicatrizado después del implante. Sin embargo, todavía no había presente un exceso de formación de tejido adiposo. A los seis meses (Figura 6C), el volumen de tejido en la dermis se había expandido enormemente en comparación con el control, y se podía observar un tejido conectivo suelto altamente vascularizado normal. En el control (Figura 6A), se podía observar muy pocos vasos sanguíneos. A los 6 meses, en la parte inferior de la dermis, se observó una formación de exceso de vasos sanguíneos (vasos de tipo arteriola) (b=vasos sanguíneos), y también había presente tejido graso recién formado (a=tejido adiposo) (Figura 6C). Según el estudio clínico piloto, el material es tolerado extremadamente bien, induce la formación de tejido adiposo y de vasos sanguíneos, y el tejido nuevo formado también está presente incluso después de que el propio implante se haya degradado.

Por tanto, la presente invención proporciona un implante que induce la formación de tejido adiposo *de novo* y la angiogénesis, y proporciona un sistema de administración a largo plazo de factores adipogénicos y angiogénicos que han sido capturados e inmovilizados en una estructura de hidrogel. El implante bioactivo de la presente invención ayuda en la inducción de la infiltración de células hospedantes y permite una regeneración de tejido más eficiente. Los efectos de los implantes son locales y específicos de sitio, reduciendo las dosis globales de factores adipogénicos y angiogénicos requeridas para un efecto determinado. No solo es económico sino también un modo de evitar efectos sistémicos perjudiciales.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de tejido adiposo, que comprende VEGF, FGF-2 e IGF-1, y que ha sido preparado a partir de tejido adiposo obtenido por liposucción, tejido adiposo que comprende células viables, incubando las células en una disolución salina estéril, salino tamponado con fosfato o una disolución acuosa tamponada isotónica durante un periodo de tiempo que oscila entre 45 minutos y 2 horas, y recolectar el extracto sin células, donde el extracto comprende entre 1 pg/mL y 1400 pg/mL de VEGF, entre 20 pg/mL y 1500 pg/mL de FGF-2 y entre 100 pg/mL y 1500 pg/mL de IGF-1.
2. El extracto según la reivindicación 1, donde el contenido de factor de crecimiento por 1 mg de proteína total es al menos de 1 pg de VEGF, al menos 70 pg de FGF-2, y al menos 50 pg de IGF-1.
3. El extracto según la reivindicación 2, donde el contenido de VEGF por 1 mg de proteína total es al menos de 7 pg.
4. El extracto según la reivindicación 2, que además comprende angiogenina, adiponectina, TIMP-1 y TIMP-2, MIF, IGFBP-6, NAP-2, leptina, PDGF-BB y GRO.
5. El extracto según la reivindicación 2 o 3, que además comprende angiogenina, IL-5, IL-6, IL-8, CCL5, NAP-2, MCP-1, adiponectina, GRO, TIMP-1, TIMP-2.
6. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en la reparación o ingeniería de tejidos blandos, en la curación de heridas, el tratamiento de lesiones de quemadura o para tratar afecciones isquémicas.
7. Un implante que comprende un extracto de tejido adiposo libre de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una matriz biocompatible.
8. El implante según la reivindicación 7, donde la matriz biocompatible es un hidrogel.
9. El implante según la reivindicación 8, donde el hidrogel se selecciona de un grupo que consiste en ácido hialurónico, chitosán, fibrina, colágeno, alginato, poliésteres basados en ácido poli-láctico, ácido poli-láctico glicólico, policaprolactona, y mezclas de los mismos.
10. El implante según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que es inyectable.
11. El implante según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el extracto es alogénico.
12. El implante según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, para uso en la reparación o ingeniería de tejidos blandos, en la curación de heridas, el tratamiento de lesiones de quemadura, para tratar afecciones isquémicas, o para inducir adipogénesis o angiogénesis.
13. Un método para preparar un extracto de tejido adiposo libre de células que comprende VEGF, FGF-2 e IGF-1, consistiendo el método en las siguientes etapas:
 - a) proporcionar una muestra de tejido adiposo obtenida de liposucción, comprendiendo la muestra células viables,
 - b) incubar dicha muestra un tiempo predeterminado en una disolución salina estéril, salino tamponado con fosfato o una disolución acuosa tamponada isotónica durante un periodo de tiempo que oscila entre 45 minutos y 2 horas, y
 - c) recolectar el extracto.
14. Un método para preparar un implante según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que comprende mezclar dicho extracto de tejido adiposo con dicho material biocompatible, o absorberlo en el mismo.

Fig. 1A

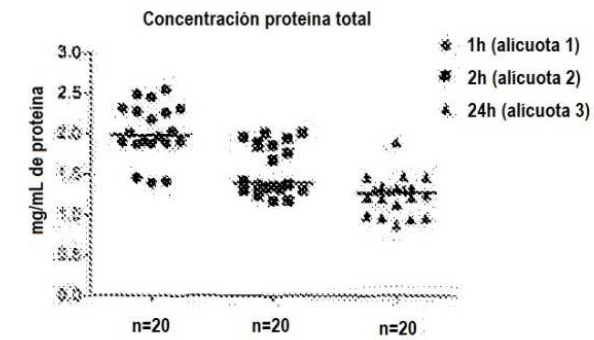


Fig. 1B

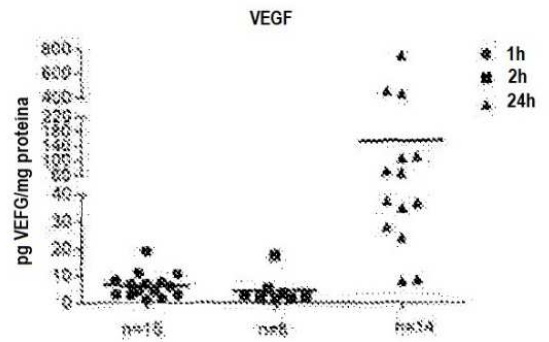
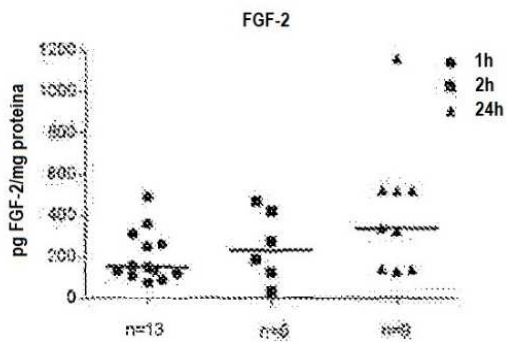
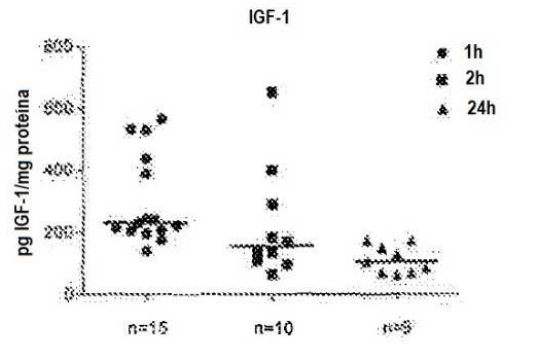


Fig. 1C

Fig. 1D

Fig. 2A

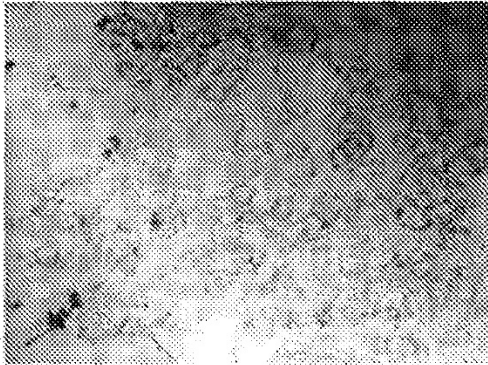


Fig. 2B

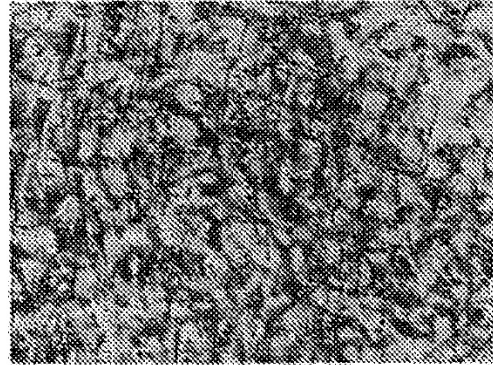


Fig. 2C

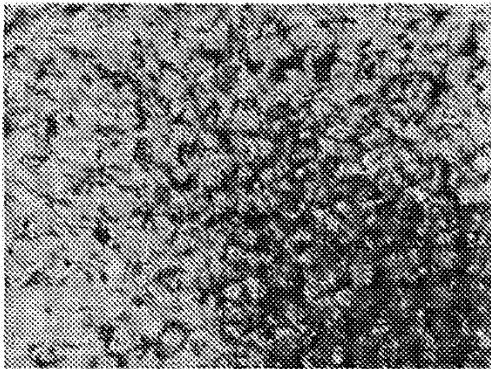


Fig. 2D

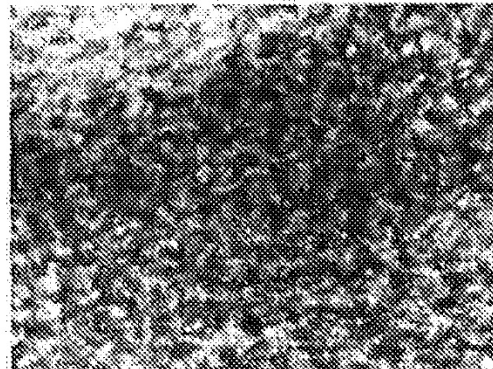


Fig. 3A

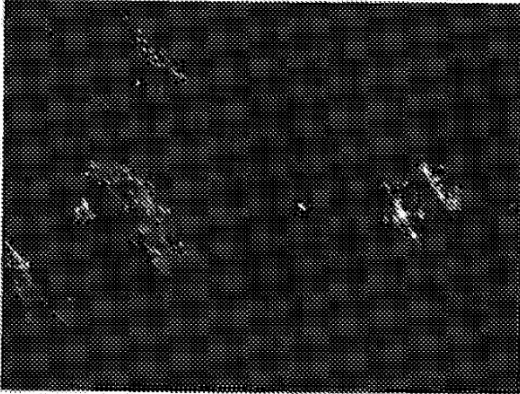


Fig. 3B



Fig. 3C

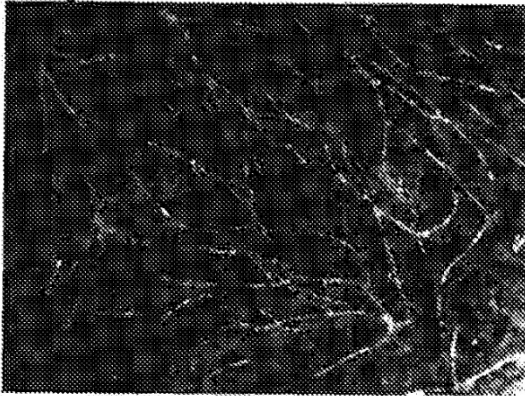


Fig. 3D

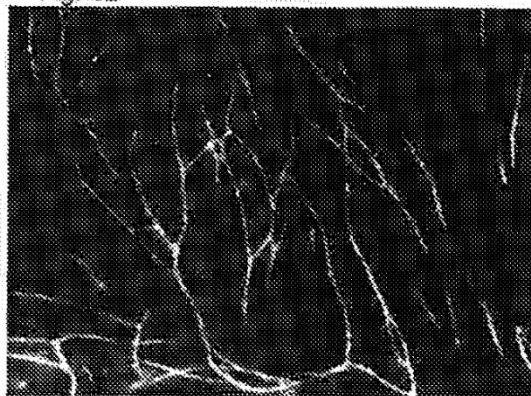


Fig. 4A

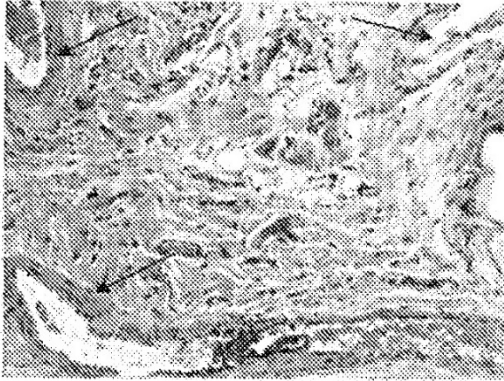


Fig. 4B

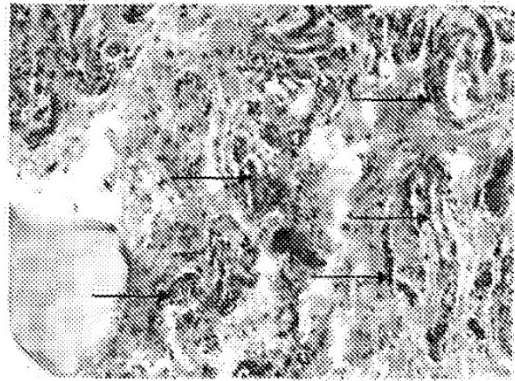


Fig. 4C

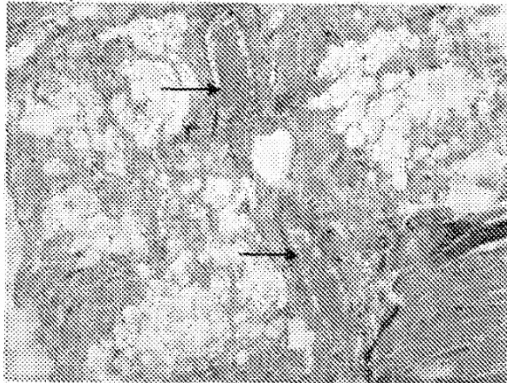


Fig. 4D

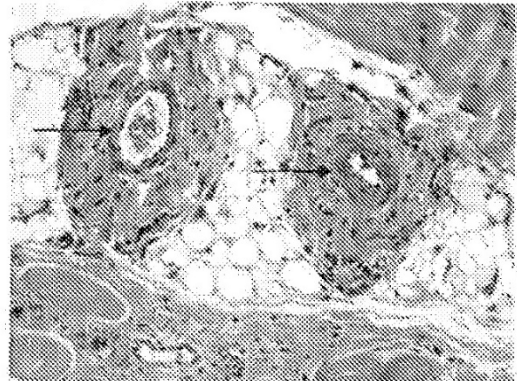


Fig. 5A



Fig. 5B

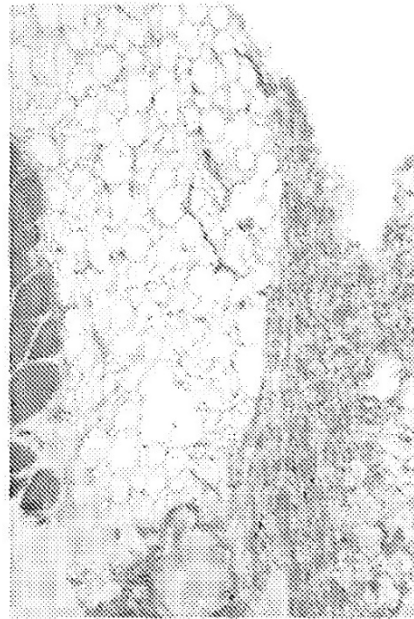


Fig. 5C



Fig. 5D



Fig. 6A

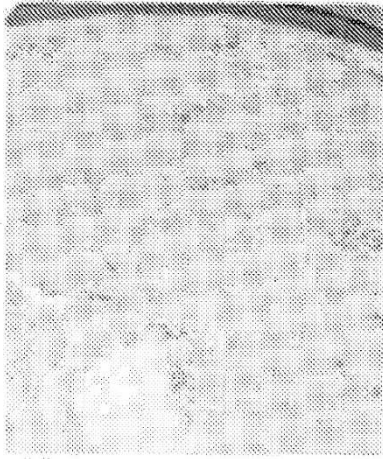


Fig. 6B

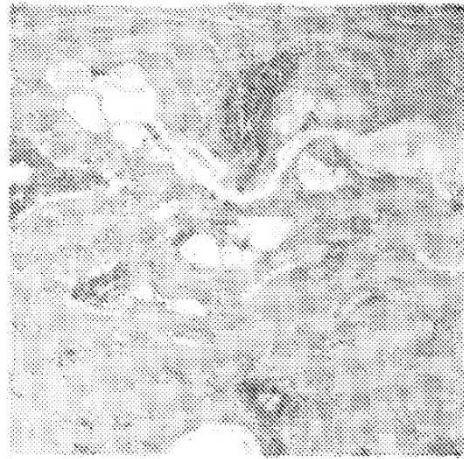


Fig. 6C



Fig. 6D

