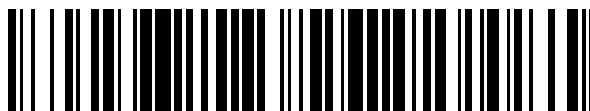


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 165**

51 Int. Cl.:
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04787313 .8**
96 Fecha de presentación: **06.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1663263**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Utilización de células procedentes del tejido adiposo para inducir a la formación de una red vascular funcional**

30 Prioridad:
05.09.2003 FR 0310504

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, RUE MICHEL-ANGE
75794 PARIS CEDEX 16, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM);
UNIVERSITE PAUL SABATIER (TOULOUSE III)
ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE
SCIENTIFIQUE, CULTUREL ET y
UNIVERSITE PARIS VII**

72 Inventor/es:
**CASTEILLA, Louis;
SILVESTRE, Jean-Sébastien;
PLANAT-BENARD, Valérie;
LEVY, Bernard;
PENICAUD, Luc y
TEDGUI, Alain**

74 Agente/Representante:
Durán Moya, Luis Alfonso

ES 2 378 165 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

Utilización de células procedentes del tejido adiposo para inducir a la formación de una red vascular funcional

5 La presente invención se refiere al uso de células procedentes del tejido adiposo blanco medular o extramedular y, en particular, de la fracción estromal vascular extra-medular (FSV), y/o de adipocitos maduros desdiferenciados sea cual sea su origen, para inducir a la formación de una vascularización funcional.

10 Existe una necesidad, en particular en las sociedades occidentales, de medios terapéuticos eficaces que estimulan la neovascularización, para limitar las complicaciones asociadas a las patologías isquémicas y/o favorecer la regeneración de los tejidos.

15 Hasta ahora, las estrategias terapéuticas propuestas para limitar los efectos nocivos de la isquemia recurren a la estimulación del crecimiento y de la remodelación de los vasos en el mismo sitio de la isquemia y/o al trasplante de células progenitoras endoteliales. Para la obtención de células endoteliales aptas para permitir efectivamente una revascularización de un sector isquémico, los métodos propuestos hasta ahora se basan esencialmente en la obtención de células endoteliales maduras a partir de células progenitoras endoteliales circulantes del adulto. Estas células mononucleadas humanas de origen hematopoyético, procedentes de la línea monocitos/macrófagos (CD45+, CD14+) son aisladas a partir de la médula ósea (BM-MNC por *bone marrow-mononuclear cells*) o de la sangre periférica, en presencia de factores de crecimiento angiogénicos (20; 21; 27; 38; 39).

20 Más particularmente, se ha demostrado que el trasplante de BM-MNC (*bone marrow-mononuclear cells*) estimulaba efectivamente la neovascularización en las isquemias experimentales y conllevaba una mejora significativa y una supervivencia a largo plazo de los tejidos lesionados (26; 27). Los ensayos efectuados en el ser humano muestran el potencial de tal terapia para limitar la progresión de la enfermedad (28-32).

25 Sin embargo, el bajo porcentaje y la dificultad de expansión *ex vivo* de estas células progenitoras endoteliales y el deterioro funcional de estas células, observado en condiciones patológicas, constituyen una limitación mayor para su uso en el tratamiento de la isquemia.

30 Como consecuencia, existe por lo tanto una necesidad real de disponer de una fuente de células que forman una población celular homogénea, capaz de diferenciarse en células endoteliales maduras, utilizables en particular en el ámbito de la reparación de tejidos dañados por isquemia, que sea sencilla de obtener y eficaz.

35 El tejido adiposo existe en diferentes formas en los mamíferos: el tejido adiposo blanco extramedular que representa el principal órgano de reserva del organismo, el tejido adiposo blanco medular cuyo papel exacto no se conoce y el tejido adiposo pardo termogénico.

40 Debido a su importante potencial de expansión que persiste a lo largo de la vida del individuo, el tejido adiposo blanco del adulto constituye una fuente de células abundantes y fáciles de obtener.

Este tejido adiposo blanco está constituido por dos fracciones celulares:

- 45
- una fracción adipocitaria que representa del 30% a 60% de las células del tejido adiposo, y está caracterizada por la acumulación de triglicéridos (fracción de células flotantes). Esta fracción está compuesta en su gran mayoría (99%) de adipocitos diferenciados y de algunos macrófagos contaminantes, ricos en gotitas lipídicas, y
 - una fracción no adipocitaria, denominada fracción del estroma vascular (FSV), que comprende algunas células sanguíneas, algunas células endoteliales maduras (células del endotelio microvascular: CD31⁺, CD144⁺), unos pericitos, unos fibroblastos y unas células madre pluripotentes.

50 Se ha demostrado que la fracción estromal vascular, habitualmente utilizada para estudiar la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros, era una fuente de células madre pluripotentes que comprenden, además, unos progenitores adipocitarios (preadipocitos), únicamente unos progenitores hematopoyéticos y neurogénicos, así como unas células madre mesenquimatosas, capaces de diferenciarse en líneas osteogénicas, condrogénicas y miogénicas (10; 11; 12; 13; Solicitud internacional PCT WO 02/055678 y solicitud americana US 2003/0082152).

55 Estas dos fracciones celulares pueden ser separadas por su diferencia de densidad, según procedimientos tales como los descritos por Björntorp y otros (14).

60 El tejido adiposo blanco posee propiedades angiogénicas únicas que resultan del efecto sobre las células endoteliales vasculares diferenciadas, de factores pro-angiogénicos producidos por los adipocitos (Bouloumié y otros, *Ann. Endocrin.*, 2002, 63, 91-95; Wang y otros, *Horm. Metab. Res.*, 2003, 35, 211-216) y las células de la fracción estromal vascular (Rehman y otros, *Journal of the American College of Cardiology*, 2003, 41, 6 suplemento A, 308A). Estas propiedades angiogénicas, que desempeñan aparentemente un papel en la actividad metabólica y en la expansión del tejido adiposo, tienen unas aplicaciones en terapia celular autóloga, para favorecer la angiogénesis en un contexto post-traumático o patológico (post-isquémico). Así, la inyección de tejido adiposo

autólogo se practica habitualmente en cirugía, para favorecer la revascularización de los injertos y la reconstrucción de los tejidos blandos (Bouloumié y otros; Wang y otros, antes citados). Además, se preconizó, asimismo, administrar la fracción estromal vascular autóloga para favorecer la angiogénesis, en el tratamiento de la enfermedad coronaria (Rehman y otros, antes citado).

5 Sin embargo, la neovascularización no sólo resulta del efecto de factores pro-angiogénicos sobre las células endoteliales de los vasos preexistentes (angiogénesis), sino también de la producción y de la incorporación, en los vasos en formación, de células endoteliales diferenciadas, producidas a partir de células progenitoras endoteliales (vasculogénesis).

10 Tales células progenitoras endoteliales no se aislaron a partir del tejido adiposo y en particular de la fracción estromal vascular que contiene unas células pluripotentes.

15 En este contexto, los inventores han aislado una subpoblación homogénea de células de tejido adiposo blanco medular o extra-medular (fáciles de obtener (liposucción, por ejemplo), capaz de diferenciarse en células endoteliales maduras que permiten obtener una reconstrucción total o parcial de una red vascular funcional.

20 La presente invención tiene, por consiguiente, como objeto el uso de células del tejido adiposo blanco medular o extra-medular que forma subpoblaciones homogéneas, que expresan, al menos, los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC y CD34 (CD13⁺, HLA ABC⁺, CD34⁺) y que no expresan los antígenos de superficie CD14, CD45, CD31 y CD144, para la preparación de un medicamento destinado a la reconstrucción total o parcial de una red vascular funcional, en particular en el contexto de una isquemia.

25 Según un segundo modo de realización ventajoso de dicha utilización, dichas células del tejido adiposo están representadas por una subpoblación homogénea de células de la fracción estromal vascular extra-medular (denominadas a continuación FSV-CULT), susceptibles de ser obtenidas mediante expansión celular limitada en un cultivo.

30 Según una disposición ventajosa de este modo de realización, dicha subpoblación homogénea de células de fracción estromal vascular extra-medular es susceptible de ser obtenida mediante una expansión celular limitada por un número de pasos sucesivos inferior a 10 de dichas células.

35 Así, de manera sorprendente, una expansión celular limitada, debido al número de pasos sucesivos limitados a 10 como máximo, favorece la proliferación de una población homogénea de células que poseen unos antígenos de superficie que son característicos de las células de potencial pro-angiogénico, pero que no poseen ningún marcador de superficie característico de las células hematopoyéticas que incluyen las de la línea de monocitos/macrófagos o de células endoteliales diferenciadas.

40 Asimismo, de manera sorprendente, se obtienen tales células por cultivo en medio mínimo, tal como un medio DMEM que comprende 10% de suero de ternero fetal o de neonato, por ejemplo.

45 Unas condiciones particulares, que inducen más rápidamente unas características pro-angiogénicas, pueden asimismo ser aplicadas. Se especifican a continuación (véase el procedimiento de selección de células del tejido adiposo).

Según un tercer modo de realización ventajoso de dicha utilización, dichas células del tejido adiposo están representadas por una subpoblación homogénea de adipocitos maduros desdiferenciados (denominados a continuación DDAC).

50 Los adipocitos desdiferenciados se obtienen en particular en las condiciones descritas en Negrel R. y otros (17) o en Shigematsu M. y otros (19).

55 Así, mediante la expansión limitada de la fracción estromal vascular extra-medular o mediante desdiferenciación de adipocitos maduros, se obtienen unas subpoblaciones de células que expresan, al menos, los antígenos de superficie antes citados, a saber: CD 13, HLA ABC (CD13⁺, HLA ABC⁺). El antígeno de superficie CD34, presente en las células recientemente aisladas, puede desaparecer progresivamente durante los pasos sucesivos en el cultivo. Estas células, por el contrario, no expresan en particular los antígenos de superficie siguientes: CD45, CD 14, CD31 y CD144 (CD45⁻, CD 14⁻, CD31⁻ y CD144⁻). Las subpoblaciones de células que expresan al menos los antígenos de superficie antes citados son capaces de diferenciarse en células endoteliales funcionales que expresan los antígenos de superficie CD31 y CD144.

60 Según un cuarto modo de realización ventajoso de dicha utilización, dichas células del tejido adiposo que forman unas subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie, tales como en la reivindicación 1, están asociadas a un soporte polimérico sólido o semi-sólido.

65 Según una disposición ventajosa de este modo de realización, dicho soporte polimérico sólido es preferiblemente

5 una matriz membranaria basal reconstituida que comprende al menos uno de los elementos siguientes: colágeno, laminina y proteoglicanos o una matriz extracelular reconstituida que comprende uno de los elementos siguientes: fibronectina, colágeno, laminina y trombospondina. Dicho soporte puede comprender además unas enzimas de degradación de dichas matrices, así como inhibidores enzimáticos y factores de crecimiento. Se pueden citar, a título de ejemplo, como matrices particularmente apropiadas, las matrices Matrigel® (Becton Dickinson; 40).

Según otra disposición ventajosa de este modo de realización, dicho soporte polimérico semi-sólido es preferentemente un derivado celulósico y, en particular, metilcelulosa.

10 Según la invención, dichas células pueden, además, ser genéticamente modificadas. Así:

- pueden comprender al menos una mutación de un gen autólogo, o
- pueden contener al menos una copia de un gen heterólogo.

15 Dichas células genéticamente modificadas son, preferentemente, de origen humano.

20 La presente invención tiene, asimismo, por objeto el uso de una composición que contiene células del tejido adiposo blanco, medular o extra-medular, que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie siguientes: CD13⁺, CD34⁺, HLA ABC⁺, tales como se han definido anteriormente, y al menos un vehículo y/o un soporte apropiado para una administración parenteral o en el sitio (*in situ* a nivel del órgano dañado), para la preparación de un medicamento destinado a la reconstrucción total o parcial de una red vascular funcional.

25 La presente invención tiene, asimismo, por objeto una composición farmacéutica que contiene unas células del tejido adiposo blanco, medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC, tales como se han definido anteriormente, estando dichas células asociadas a un soporte polimérico sólido o semi-sólido, tal como se ha definido anteriormente, y al menos un vehículo y/o un soporte apropiado para una administración parenteral o en el sitio.

30 Las células, tales como se definen en la presente invención, son útiles para el tratamiento de cualquier patología isquémica, en particular las patologías cardiovasculares, tales como la aterosclerosis. En efecto, el factor desencadenante de la isquemia en un paciente artrítico es la ruptura de una placa de ateroma y la formación de un trombo.

35 Estas células son activas sea cual sea la naturaleza del tejido isquémico y pueden ser utilizadas para el tratamiento de una isquemia que afecta a un tejido tal como, en particular, el cerebro, el páncreas, el hígado, el músculo y el corazón.

40 Estas células son activas sea cual sea la vía de administración; se puede administrar, en particular, por vía general (intramuscular, intraperitoneal o intravenosa) o directamente a nivel del tejido dañado.

La presente invención tiene, además, por objeto un procedimiento de cultivo de células del tejido adiposo blanco medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan, al menos, los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC, procedimiento que se caracteriza porque comprende al menos las etapas siguientes:

- 45 - expansión celular limitada de células de dicho tejido adiposo (células de la fracción estromal vascular extra-medular o adipocitos maduros desdiferenciados), por un número de pasos sucesivos inferiores a 10 de dichas células sobre un soporte de cultivo sólido adecuado, en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento apto para estimular la formación de células endoteliales y eventualmente al menos una citoquina adecuada;
- 50 - modificación, de manera continua o transitoria, del entorno de oxígeno del cultivo, y
- modificación, de manera continua o transitoria, del equilibrio redox de dichas células, o de la producción de especies activas del oxígeno por dichas células, mediante la adición de moléculas pro- o antioxidantes en el medio extra o intracelular.

55 Conforme a la invención:

- dichas células del tejido adiposo blanco medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC, están constituidas de la fracción estromal vascular extra-medular o de adipocitos desdiferenciados, y

60 dicho medio de cultivo es preferentemente un medio de cultivo lipídico.

65 Según un modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento, el factor de crecimiento apto para estimular la formación de células endoteliales es, en particular, el VEGF, preferentemente a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml.

Según otro modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento, el entorno de oxígeno del cultivo está al 1%; desde algunas horas hasta algunos días.

Las moléculas pro- o antioxidantes están en particular seleccionadas del grupo constituido por:

- los inhibidores y/o activadores de la función mitocondrial, y en particular la antimicina, preferentemente a una concentración comprendida entre 1 y 1000 nM, preferentemente entre 1 y 100 nM, la rotenona a una concentración comprendida entre 1 y 100 nM, la oligomicina a una concentración comprendida entre algunos ng y algunos µg/ml, la coenzima Q, unos nucleótidos, o cualquier otra molécula equivalente, y el carbonil cianido m-clorofenilhidrazona), y
- antioxidantes seleccionados del grupo constituido por el trolox, el ditiocarbamato de pirrolidina, la N-acetilcisteína, el manganeso (III) tetrakis (4-ácido benzoico) porfirina o cualquier otra molécula equivalente.

La presente invención tiene, asimismo, por objeto un procedimiento de cribado de moléculas activas sobre las células endoteliales diferenciadas, caracterizándose dicho procedimiento porque comprende al menos las etapas siguientes:

- el cultivo de las células del tejido adiposo blanco medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC, tales como se han definido anteriormente, en un medio de cultivo polimérico semi-sólido,
- la puesta en contacto de las células endoteliales diferenciadas así, obtenidas con un banco de moléculas a ensayar,
- la identificación y la selección de las moléculas activas sobre dichas células.

El procedimiento según la invención es tan útil para cribar nuevas moléculas químicas como el producto de nuevos genes potencialmente activos sobre las células endoteliales diferenciadas.

Según un modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento de cribado, la etapa de cultivo en medio sólido está precedida de un precultivo en las condiciones que permiten aumentar el potencial pro-angiogénico de dichas células, tales como se han definido anteriormente.

Según otro modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento de cribado, la etapa de cultivo en medio semi-sólido se realiza en condiciones que permiten aumentar el potencial pro-angiogénico de dichas células, tales como se han definido anteriormente.

Además de las disposiciones anteriores, la invención comprende también otras disposiciones, que se desprenderán de la descripción siguiente, que se refiere a ejemplos de realización del procedimiento objeto de la presente invención, así como a los dibujos anexos, en los que:

- la figura 1 ilustra las propiedades angiogénicas de las células de ratones de la fracción estromal vascular extramedular (SVF por *Stromal-Vascular Fraction*), cultivada en las condiciones de la invención, después de su inyección en el miembro inferior isquémico, en comparación con las células mononucleadas de la médula ósea (BM-MNC por *Bone-Marrow Mononuclear cells*); para más claridad, las células obtenidas por cultivo de esta fracción, en las condiciones de la invención, se denominan células FCV-CULT, a continuación en los ejemplos.

- a) análisis de la densidad en vasos por microangiografía. Panel de la izquierda: microangiografía representativa de un miembro inferior derecho isquémico (Isch) y de un miembro inferior izquierdo no isquémico (N-Isch), 15 días después de la oclusión femoral. Las flechas indican los extremos ligados de la arteria femoral. Panel de la derecha: resultado angiográfico en el miembro isquémico tratado, con respecto al miembro no isquémico.
- b) análisis *in vivo* del flujo sanguíneo en el miembro inferior mediante imagen de perfusión por láser de efecto Doppler, 15 días después de la oclusión de la arteria femoral. Panel de la izquierda: imagen del flujo sanguíneo que indica una perfusión normal (representada en negro), en el miembro no isquémico y el miembro isquémico tratado por las células FSV-CULT, así como una clara reducción del flujo sanguíneo en el miembro inferior isquémico tratado por PBS. Panel de la derecha: medición del flujo sanguíneo en el miembro isquémico tratado, con respecto al miembro no isquémico.
- c) análisis de la densidad capilar mediante inmunomarcado de la fibronectina total. Panel de la derecha: fotomicrografías representativas de secciones de músculo isquémico, 15 días después de la oclusión femoral. Los capilares, indicados por flechas aparecen en blanco y los micocitos en negro. Panel de la derecha: medición de la densidad capilar en el miembro isquémico tratado, con respecto al miembro no isquémico. PBS: Ratones tratados con PBS. SVF: Ratones tratados con las células FSV-CULT- BM-MNC: ratones tratados con células de la médula ósea. Los valores representan la media ± desviación estándar, n=6 por grupo; ** P<0,01;

- la figura 2 muestra que la expansión de una población heterogénea de células humanas de la fracción estromal vascular (preparación extemporánea obtenida antes del cultivo, denominada a continuación FSV-EXT) en las condiciones de la invención, favorece efectivamente la aparición de una población celular homogénea (FSV-

CULT);

- 5 a) y b): diagramas de dispersión de las células FSV-EXT y de las células FSV-CULT; estos diagramas constan, en las abscisas, de una estimación del tamaño de las células (FSC *height*: *forward scatter height*), y en las ordenadas, de la granulosidad de las células (SSC *height*: *side scatter height*).
- 10 c) y d): identificación de los antígenos CD45, CD14 y CD144, características respectivamente de las células hematopoyéticas (CD45), de los monocitos/macrófagos (CD14) y de las células endoteliales maduras (CD144) en una población heterogénea de células FSV-EXT (columnas blancas) en comparación con unas células FSV-CULT (columnas negras);
- 15 - la figura 3 muestra que las células humanas FSV-CULT poseen las propiedades funcionales y antigénicas de precursores de células endoteliales, después de su inyección en el miembro inferior isquémico:
- 20 a) y b) la inyección de células humanas FSV-CULT aumenta de manera significativa el resultado angiográfico y el flujo sanguíneo medido *in vivo* mediante imágenes de perfusión por láser de efecto Doppler, en el miembro inferior derecho isquémico injertado, cuando se compara con el miembro inferior izquierdo no isquémico no injertado (grupo PBS) (*P < 0,05);
- 25 c) 15 días después de la inyección de células FSV-CULT humanas, el anticuerpo dirigido específicamente contra una isoforma del marcador CD31 humano, marca numerosas células CD31 positivas (indicadas mediante flechas negras) que bordean unos vasos funcionales que contiene eritrocitos (indicados mediante una flecha gris en el interior de un vaso)(x 1000);
- 30 - la figura 4 ilustra la diferenciación de las células FSV-CULT en células endoteliales en condiciones *in vitro* o en una matriz de Matrigel[®] injertada *in vivo*:
- 35 a) diferenciación de las células FSV-CULT en adipocitos en un medio adipogénico (x 200);
- b) formación de alineaciones ramificadas y de estructuras de tipo tubular, de manera espontánea cuando las células FSV-CULT están sembradas en un medio que contiene metilcelulosa (x 200);
- 40 c) y d) marcado de las células FSV-CULT sembradas en un medio que contiene metilcelulosa por unos anticuerpos dirigidos, respectivamente, contra una isoforma del marcador CD31 humano y contra el marcador vWF (factor von Willebrand); se observa la formación de alineaciones ramificadas (x 600);
- 45 e) y f) formación en una matriz de Matrigel[®] que contiene las células FSV-CULT e injertada *in vivo* de estructuras de tipo tubular (indicadas por flechas negras); se observan igualmente unos eritrocitos en las estructuras de tipo tubular (indicados por flechas grises);
- 50 g) y h) marcado de las células FSV-CULT que bordean las estructuras de tipo tubular de la inclusión de Matrigel[®], por un anticuerpo anti-isoforma del marcador CD31 humano (x 400 y 1000);
- 55 - la figura 5 ilustra la desdiferenciación de los adipocitos maduros en células progenitoras o precursores de doble potencial proliferativo, que tienen la capacidad de adquirir un fenotipo de células endoteliales:
- 60 a) las células hDDAC (*human dedifferentiated adipose cells* o células adiposas humanas desdiferenciadas) pueden proliferar y diferenciarse nuevamente en adipocitos cuando están cultivadas en un medio adipogénico (x 400);
- 65 b) las células hDDAC forman unas alineaciones ramificadas y unas estructuras de tipo tubular (flechas negras), cuando estas se cultivan en un medio que comprende metilcelulosa (x 400);
- c) las alineaciones ramificadas y las estructuras de tipo tubular, formadas mediante desdiferenciación de los adipocitos maduros en un medio de cultivo que contiene metilcelulosa están marcados mediante un anticuerpo anti vWF (x 400);
- 70 d) y e) estas figuras ilustran las propiedades pro-angiogénicas de las células hDDAC después de su injerto en el miembro inferior isquémico; las células hDDAC son tan eficaces como las células FSV-CULT para restaurar el resultado angiográfico y el flujo sanguíneo cutáneo en el miembro inferior isquémico. Los valores representan la media ± desviación estándar, n=6 por grupo; *P<0,05. PBS: ratones tratados con PBS. SVF: ratones tratados con las células FSV-CULT. hDDAC: ratones tratados con adipocitos humanos desdiferenciados;
- 75 f) marcado de numerosas células C31 positivas que cubren los vasos nuevamente formados (indicados mediante flechas negras), por un anticuerpo dirigido contra la isoforma del marcador CD31 humano (x 1000);
- 80 - la figura 6 ilustra la plasticidad de las células de la línea adipocitaria, para la obtención de células endoteliales. Las células progenitoras adipocitarias tienen la capacidad de diferenciarse en adipocitos y de adquirir un fenotipo endotelial funcional. Los adipocitos maduros pueden desdiferenciarse en células progenitoras de doble potencial proliferativo.

Por supuesto, se debe de entender, sin embargo, que estos ejemplos son dados únicamente a título ilustrativo del objeto de la invención, y no constituyen de ninguna manera una limitación.

EJEMPLO 1: Inducción de una neovascularización en un músculo isquémico de ratón con la ayuda de células FSV-CUTL de ratón.**1.1 Material y métodos**1.1.1 Animales y muestras de tejido

Se crían en un entorno controlado unos ratones macho C57B1/6 o nu/nu (Harlan, Francia) de 7 semanas de edad (ciclos de 12 horas de luz y de 12 horas de oscuridad a 21°C) con libre acceso al agua y a la ración alimenticia estándar. Al final de los experimentos, se sacrifican los ratones mediante dislocación cervical bajo anestesia con CO₂. El tejido adiposo inguinal y el músculo son rápidamente extraídos y tratados para los análisis ulteriores.

1.1.2 Modelo de ratón con un miembro inferior isquémico

Se anestesian los ratones mediante inhalación de isoflurano. Se realiza una ligadura en la arteria femoral derecha. Después, se les inyectan 10⁶ células FSV-CULT por vía intramuscular en el miembro isquémico.

1.1.3 Aislamiento de las células de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo y de las células de la médula ósea

- Células de la médula ósea:

Las células de médula ósea se obtienen mediante lavado de las tibias y los fémures, y después el aislamiento de las células mononucleadas de baja densidad, mediante centrifugación sobre gradiente de densidad de Ficoll (34).

- Células de la fracción estromal vascular del tejido adiposo extra-medular

Las células de la fracción estromal vascular son aisladas a partir de tejidos adiposos según el protocolo de Bjöntorp y otros (14) con modificaciones menores. Brevemente, el tejido adiposo inguinal de ratones se somete a una digestión mediante 2 mg/ml de colagenasa (Sigma) en un tampón fosfato PBS que contiene 0,2% de BSA a 37°C durante 45 minutos. Después de la eliminación de los fragmentos no hidrolizados por filtración sobre membrana de nylon de 100 µm, los adipocitos maduros son separados de los residuos de células FSV-EXT mediante centrifugación (600 g, durante 10 minutos).

Las células FSV-EXT se siembran con una densidad de 30.000 células/cm² en un medio DMEM F12 suplementado por 10% de suero de ternero fetal neonato (SVN) Después de 6 horas de cultivo, las células no adherentes son eliminadas mediante lavado, después, las células (adherentes) se cultivan durante algunos días (1 a 3) antes de ser utilizadas; se obtienen así unas células FSV-CULT.

1.1.4 Cuantificación de la neovascularización

La densidad en vasos se evalúa mediante micro-angiografía de alta definición al final del periodo de tratamiento (36). El resultado angiográfico se expresa mediante el porcentaje de píxeles por imagen ocupados por vasos, en un área de cuantificación.

El análisis micro-angiográfico se completa por la evaluación de la densidad capilar gracias a un anticuerpo dirigido contra la fibronectina total (36). La densidad capilar se calcula entonces en campos aleatorios de un área definida, utilizando el programa Optilab/Pro.

La funcionalidad de la red vascular después de la isquemia se analiza mediante imagen de perfusión por láser de efecto Doppler, realizada en el ratón tal como se ha descrito en Silvestre JS y otros (36).

1.2 Resultados

En un primer momento, el potencial angiogénico del tejido adiposo se evaluó con células FSV-CULT de ratones, por comparación con células mononucleadas de la médula ósea.

Estas células se preparan a partir de tejido adiposo inguinal y se cultivan para obtener una expansión limitada durante 1-3 días (número de pasos sucesivos limitado a menos de 10). El injerto de 1 X 10⁶ células FSV-CULT mejora claramente la neovascularización del tejido en los miembros inferiores isquémicos, tal como lo muestra el aumento de un factor 2,6 del resultado angiográfico (figura 1a, P < 0,01), el aumento de un factor 2,3 del resultado de perfusión del tejido por Doppler (figura 1 b, P < 0,001) y el aumento de un factor 1,6 de la densidad capilar (figura 1c, P < 0,01). El grado de neovascularización observado después de la inyección de 1 X 10⁶ células FSV-CUTL es comparable con aquel observado después de la inyección de 1 X 10⁶ células mononucleadas de la médula ósea (figuras 1 a-c). El proceso de cultivo, según la invención, mejora el potencial angiogénico de las células FSV-CUTL de manera muy significativa, tal como lo muestra la muy baja neovascularización observada después de la inyección

directa de células FSV-EXT (sin cultivo con expansión limitada como en la invención). Además, se han revelado infructuosos experimentos con las células del estroma vascular que provienen del tejido adiposo pardo, conocido por ser más vascularizado que el tejido blanco.

5 **EJEMPLO 2: Caracterización fenotípica de las células FSV-EXT y de las células FSV-CULT.**

2.1 Material y métodos

10 2.1.1 Preparación de células FSV-EXT y FSV-CULT

Las células FSV-EXT y FSV-CULT de ratones se preparan tal como se precisa en el ejemplo 1.

Las células humanas correspondientes son preparadas de manera similar, a partir de muestras de dermolipectomía abdominal o de nefrectomía que contiene tejido subcutáneo abdominal humano, obtenidos con el consentimiento de los pacientes.

15 2.1.2 Análisis fenotípico de las células

20 Las células son marcadas en tampón salino de fosfato que contiene 0,2% de suero de ternero fetal; se incuban con anticuerpos monoclonales anti-ratón o anti-humano (mAb) acoplados al isotiocianato de fluoresceína (FITC), a la ficoeritrina (PE) o a la proteína de clorofila peridina (PerCP) durante 30 minutos a 4°C. Después del lavado, las células son analizadas en citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson). Los datos obtenidos se analizan entonces utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Todos los anticuerpos provienen de BD Biosciences, excepto CD144 que proviene de Serotec.

25 2.1.4 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizan mediante una prueba t no emparejada utilizando el programa PrismTM (GrapPad software).

30 **2.2 Resultados**

El análisis comparativo del genotipo de las células FSV-EXT y FSV-CULT (humanas o murinas) se realizaron en citometría de flujo. Siendo los resultados obtenidos con las células humanas y murinas comparables, sólo se presentan los resultados relativos a las células humanas.

35 Las células FSV-EXT obtenidas a partir del tejido adiposo humano subcutáneo son heterogéneas, tal como lo muestra el diagrama de dispersión de la figura 2a. El cultivo de estas células durante 1-3 días en las condiciones de la invención conduce a una homogeneización de la población celular, tal como lo muestra la obtención de una sola población celular, denominada FSV-CULT (figura 2b).

40 El fenotipo antigénico confirma el diagrama de dispersión. Las células FSV-EXT son heterogéneas y comprenden diferentes poblaciones, en particular unas células hematopoyéticas (células positivas para el marcador CD45) y una población de células no hematopoyéticas (negativa para el marcador CD45), y que expresan los marcadores CD34, CD13 y HLA ABC (figura 2c).

45 La fracción estromal vascular no contiene proporción significativa de células endoteliales maduras, tal como lo muestra la ausencia de marcado con los anticuerpos dirigidos contra la VE-cadherina (CD144) y el marcador CD31 (figura 2c). En la población FSV-CULT (condiciones de la invención), la población está compuesta en su mayoría de células indiferenciadas con 90 ± 3% de células que expresan el marcador CD34 y 99 ± 0,2% de células positivas para los marcadores CD13 y HLA ABC. Por lo contrario, estas células FSV-CULT no expresan ni los marcadores característicos de las células hematopoyéticas (CD45) o de los monocitos/macrófagos (CD14), ni los marcadores CD144 y CD31, característicos de las células endoteliales diferenciadas (figura 2c). Estos resultados muestran que la expansión celular durante 1-3 días *in vitro* (o *ex vivo*) favorece la proliferación de una población homogénea de células (células FSV-CULT), que poseen algunos antígenos de superficie característicos de las células con potencial pro-angiogénico pero ningún marcador de superficie característico de células diferenciadas.

50 **EJEMPLO 3: Inducción de la neovascularización en el músculo isquémico de ratones, mediante células FSV-CULT, y diferenciación de esta población en células endoteliales.**

60 **3.1. Material y métodos**

Se crían unos ratones machos nu/nu (Harlan, Francia) de 7 semanas de edad, en las mismas condiciones que las expuestas en el ejemplo 1.

65 Las muestras de tejido adiposo humano son idénticas a las utilizadas en el ejemplo 2.

Las células humanas y de ratones FSV-CULT son aisladas, tal como se precisa en los ejemplos 1 y 2.

5 La cuantificación de la neovascularización y el análisis fenotípico se realizan tal como se precisa, respectivamente, en los ejemplos 1 y 2.

3.2. Resultados

10 El efecto de la inyección (o injerto) de las células FSV-CULT humanas sobre la revascularización se evalúa en ratones inmunodeficientes *Nude*. Como para las células FSV-CULT de ratones, la inyección de 1×10^6 células FSV-CULT humanas después de 15 días de isquemia de los miembros inferiores, permite obtener un aumento significativo del resultado angiográfico, así como del flujo sanguíneo cutáneo (factor, respectivamente, de 1,6 y 1,5, cuando se compara con los ratones *Nude* isquémicos no tratados, $P < 0,01$) (figuras 3a y 3b). Dos mecanismos posibles, que no se excluyen entre sí, pueden explicar los efectos pro-angiogénicos: la liberación de factores de crecimiento angiogénicos por las células FSV-CULT o una contribución directa de las células inyectadas mediante incorporación (o injerto) de estas en los vasos regenerados. En efecto, el VEGF se detecta como que es un factor angiogénico potencial (31 ± 8 ng/ml).

20 Así, a fin de evaluar la capacidad de las células FSV-CULT para ser incorporadas en nuevos vasos sanguíneos, se realizaron unos experimentos inmunoquímicos utilizando un anticuerpo específico del marcador CD31 humano, que no reacciona con un tejido de ratón. Numerosas células positivas para el marcador CD31 que cubren los vasos regenerados son puestas en evidencia en el miembro inferior tratado (figura 3c). Ninguna célula positiva para el marcador CD31 es detectada en el otro miembro inferior no tratado. La detección de células CD31+ humanas sugiere fuertemente que, en unas condiciones *in vivo*, las células FSV-CULT se diferencien en células endoteliales y contribuyan directamente a la regeneración de los vasos.

EJEMPLO 4: Diferenciación espontánea de las células FSV-CULT humanas en adipocitos o en células endoteliales, *in vitro* e *in vivo* en la matriz de Matrigel®.

30 4.1. Material y métodos

Las células humanas de la fracción estromal vascular extra-medular (FSV) son preparadas y cultivadas tal como en el ejemplo 2.

35 Para testar su potencial de diferenciación *in vitro* a nivel clonal preservando al mismo tiempo la función celular, las células FSV-CULT son cultivadas en un medio semi-sólido (metilcelulosa; 15). Un cultivo primario de células FSV-CULT se tripsina, y después se siembra a una concentración de 7×10^3 células/ml en 1,5 ml de Methocult MG3534, MG, H4534 (StemCell Technologies) o cualquier otro medio equivalente. Las células son cultivadas durante 10 días para estimular su desarrollo en células que tienen una morfología de tipo endotelial, después analizadas mediante inmunomarcado. Las colonias de cultivos en presencia de metilcelulosa se lavan con un tampón PBS y se fijan en una mezcla de metanol/acetona durante 20 minutos a -20°C . Las preparaciones son entonces bloqueadas en PBS que contiene 1% de BSA, e incubadas durante 1 hora con unos anticuerpos anti-CD3 humanos (Dako, referencia MO823) o con unos anticuerpos anti-factor vWF humano o de ratón.

45 El ensayo de angiogénesis, *in vivo*, con la ayuda de la matriz de Matrigel® se realiza de la siguiente manera. Los ratones reciben una inyección, por vía subcutánea, de un volumen de 0,5 ml de matriz de Matrigel® que contiene 10^6 de células FSV-CULT aisladas a partir de tejido de ratón, o de tejido humano. Al día 14, los ratones son sacrificados y se analiza la angiogénesis tal como se describe en Tamarat R y otros (37). Para el inmunomarcado, las matrices de Matrigel® son tratadas tal como se describe en Nibbelink M. y otros (35). Se tiñen unas secciones de $5 \mu\text{m}$ de grosor mediante fosfatasa alcalina (BCIP/NBT) después de incubarlas con un anticuerpo de Jackson acoplado con fosfatasa alcalina, o se tiñen mediante diaminobencidina (DAB) después de incubarlas con un anticuerpo primario y después mediante un anticuerpo secundario biotinilado (Dako Carpintería, CA); el anticuerpo anti-complejo IV OxPhos humano proviene de Molecular Probes (Eugene, Oregón, USA).

55 A título comparativo, se cultivan unas células FSV-CULT en un medio adipogénico (Björntorp y otros, antes citado).

4.2 Resultados

60 La diferenciación de las células FSV-CULT se analizó *in vitro* en un medio semi-sólido que permite estudiar la diferenciación celular a nivel clonal preservando la función de las células (metilcelulosa), e *in vivo* después de la inyección de células asociadas a una matriz sólida (Matrigel®).

65 En estas condiciones, las células FSV-CULT forman una red que tiene una estructura en forma de tubos huecos (figura 4b). Unos anticuerpos dirigidos respectivamente contra el marcador CD31 y contra el factor de von Willebrand (vWF) marcan fuertemente las células FSV-CULT (figura 4c y d). Cuando las células FSV-CULT son inyectadas en asociación con una matriz de Matrigel®, las células forman numerosas estructuras de tipo tubular en el interior de la

matriz de Matrigel®. La presencia de eritrocitos en el lumen de estas estructuras de tipo tubular demuestra la existencia de una estructura vascular funcional (figura 4e y f). Los anticuerpos dirigidos contra el marcador CD31 y contra el marcador vWF marcan positivamente estas estructuras que se parecen a vasos (figura 4g y h).

- 5 Comparativamente, las células FSV-CULT cultivadas en un medio adipogénico se diferencian en adipocitos (figura 4a).

El conjunto de estos resultados muestra que las células FSV-CULT presentan espontáneamente las propiedades fenotípicas y funcionales de células progenitoras endoteliales.

10

EJEMPLO 5: Desdiferenciación de adipocitos humanos maduros en cultivo.

5.1. Material y métodos

- 15 - Desdiferenciación de adipocitos humanos maduros

La fracción de adipocitos humanos maduros, aislada a partir de una muestra de tejido adiposo tal como se describe en el ejemplo 1, se lava delicadamente en medio DMEM F12 suplementado por 10% de SVN y preparada en forma de suspensión a una concentración de 10^6 células/ml. Una muestra de 100 μ l de la suspensión celular se transfiere en una lámina porta-objeto Thermanox de 25 mm y se coloca en una caja de cultivo de 35 mm. La primera lámina se recubre con una segunda, y después de una incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añaden 1,5 ml de DMEM F12 suplementado por 10% de SVN. Después de 4 ó 5 días de incubación, las células adherentes que contienen pequeñas gotitas lipídicas (células de tipo pre-adipócito) aparecen; estas se modifican en una morfología de tipo fibroblasto que están desprovistas de gotitas de lípidos (células hDDAC para *human dedifferentiated adipose cells*).

25

Estas células de tipo fibroblástico entran entonces en división activa y pueden sufrir algunos pasos sin mayor modificación de sus características.

- 30 Los adipocitos humanos desdiferenciados se cultivan en metilcelulosa y se analizan mediante inmunomarcado tal como se describe en el ejemplo 4. Además, se analiza su potencial angiogénico *in vivo*, después de la inyección en una matriz de Matrigel®, tal como se describe en el ejemplo 4. El potencial angiogénico de las células FSV-CULT preparadas como se describe en el ejemplo 3 se analiza en paralelo.

- 35 Alternativamente, los adipocitos humanos desdiferenciados se cultivan en un medio adipogénico (Björntorp y otros, antes citado).

5.2 Resultados

- 40 A fin de obtener una población homogénea de células precursoras de adipocitos a partir de tejido adiposo y de confirmar la existencia de un precursor común a los adipocitos y a las células endoteliales derivados de las células FSV-CULT, se desdiferenciaron unos adipocitos maduros, según unos protocolos descritos anteriormente (16; 17; 18; 19). Los adipocitos maduros aislados a partir del tejido adiposo representan 99% de una población de células flotantes. La única contaminación celular proviene de macrófagos ricos en gotitas lipídicas, con una relación de algunas células contaminantes para 1000 células. Cuando los adipocitos se cultivan en las condiciones antes citadas (17), estos pierden inicialmente sus ácidos grasos y cambian su morfología en células de tipo pre-adipocitos y después en células de tipo fibroblástico, que pueden fijarse a la lámina. Este cambio de morfología está asociado a cambios funcionales, debido a que los adipocitos pierden igualmente su contenido enzimático para la lipólisis y la lipogénesis, así como los marcadores moleculares (17).

50

La población homogénea de adipocitos humanos desdiferenciados (hDDAC) tiene la capacidad de proliferar y diferenciarse nuevamente en adipocitos, cuando se cultivan en medio adipogénico (figura 5a).

- 55 La misma población homogénea de adipocitos humanos desdiferenciados (hDDAC) cultivada en un medio que contiene metilcelulosa, forma unas alineaciones ramificadas y estructuras en forma de tubo (figura 5b) y co-expresa, a más del 99%, los mismos marcadores que las células FSV-CULT (CD13, CD34 y HLA ABC), incluyendo el marcador vWF (figura 5c).

- 60 Tal como es el caso para las células FSV-CULT, cuando las células hDDAC son inyectadas en asociación con la matriz de Matrigel®, estas forman numerosas estructuras de tipo tubular, que contienen eritrocitos en el lumen que demuestra la existencia de una estructura vascular funcional.

- 65 Estos resultados son ilustrados en la figura 6 que ilustran la plasticidad de las células de la línea adipocitaria para la obtención de células endoteliales. Las células progenitoras adipocitarias tienen la capacidad de diferenciarse en adipocitos y adquirir un fenotipo endotelial funcional. Los adipocitos maduros pueden desdiferenciarse en células progenitoras de doble potencial proliferativo.

EJEMPLO 6: Estimulación de la neovascularización en el músculo isquémico de ratones, mediante adipocitos humanos desdiferenciados de ratón, y diferenciación de estos adipocitos en células endoteliales.5 **6.1. Material y métodos**

El potencial angiogénico de las células hDDAC se analizó en el ratón *Nude*, como para las células FSV-CULT (ejemplo 3) que sirven de comparación.

10 **6.2 Resultados**

Las células hDDAC son tan eficaces como las células FSV-CULT para restaurar la vascularización de los miembros inferiores isquémicos (figuras 5 d y 5e). Tal como es el caso para las células FSV-CULT, se identifican numerosas células positivas para el marcador CD31 que cubren los vasos nuevamente formados del miembro inferior, en el que las células hDDAC han sido inyectadas (figura 5f).

EJEMPLO 7: Uso de las células FSV-CULT para inducir una neovascularización en un contexto ateromatoso (modelo murino ApoE -/-).20 **7.1) Materiales y métodos**

El potencial angiogénico de las células FSV-CULT se analizó en ratones deficientes en ApoE (ApoE *Knock-out* (ApoE KO o ApoE -/-); lffa-Credo), de 14 semanas de edad, tal como para el ratón C57B1/6 (ejemplo 1). El potencial angiogénico de las células mononucleadas de la médula ósea, en ratones ApoE KO, se analiza en paralelo, a título de comparación. El grupo control recibe una inyección de PBS, en las mismas condiciones.

De manera más precisa, el proceso de neovascularización se analizó mediante microangiografía y láser doppler, 4 semanas después de la oclusión femoral. El análisis estadístico se efectuó mediante un ensayo de varianza de tipo ANOVA para comparar cada parámetro (n=6 para cada grupo). Un ensayo t de Bonferroni permitió después identificar los grupos al principio de estas diferencias. Un valor de $P < 0,05$ se considera como significativo.

30 **7.2) Resultados**

La administración de células FSV-CULT aumenta el resultado angiográfico de un factor 2 ($p < 0,01$) y el flujo sanguíneo de un factor 1,5 ($p < 0,01$), en el miembro inferior isquémico de ratones ApoE KO tratados, con respecto a los ratones ApoE KO no tratados (tabla I). El potencial angiogénico de las células FSV-CULT adiposo es similar a aquel de las células mononucleadas de la médula ósea (tabla I).

Tabla I: Potencial angiogénico de las células FSV-CULT en ratones ApoE -/-

Tratamiento	Resultado angiográfico* (miembro isquémico / miembro no isquémico)	Flujo sanguíneo cutáneo* (miembro isquémico / miembro no isquémico)
FSV-CULT	0,982 ± 0,3	0,963 ± 0,04
BM-MNC	1,002 ± 0,04	0,995 ± 0,03
PBS	0,47 ± 0,02	0,65 ± 0,03

*Los valores representan la media ± desviación estándar sobre un grupo de 6 animales

El tratamiento del miembro isquémico de ratones ApoE (-/-) es eficaz y favorece la angiogénesis/neovascularización. Este efecto es tan eficaz como la inyección de células mononucleadas de la médula ósea. Las células FSV-CULT conservan su potencial pro-angiogénico en un contexto ateromatoso.

45 **EJEMPLO 8: Mejora del potencial angiogénico de las células FSV-CULT mediante la modificación de su estado redox.**50 **8.1) Materiales y métodos**

El potencial angiogénico de las células FSV-CULT tratadas *in vitro* con antimicina (40 nM) y/o con ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC; 0,5 mM) dos días antes de la inyección, se analizó en el modelo de ratones con un miembro inferior isquémico, tal como se describe en el ejemplo 1. Además, después de la inyección de las células FSV-CULT tratadas con antimicina sola, mediante adición de antimicina en el medio de cultivo, o no tratadas, los ratones han recibido, o no, una inyección diaria por i.p. de antimicina (50 µl a 40 nM). Los ratones tratados, de manera similar con PDTC solo o en asociación con antimicina no reciben ningún tratamiento después de la inyección celular.

El potencial angiogénico de las células FSV-CULT no tratadas, en ratones no tratados después de la inyección de las células, se analizó en paralelo, a título de comparación. El grupo control recibió una inyección de etanol, en las mismas condiciones.

- 5 El proceso de neovascularización se analizó mediante microangiografía y eventualmente mediante láser Doppler, 8 días después de la oclusión femoral. El análisis estadístico se efectuó mediante un ensayo de varianza de tipo ANOVA para comparar cada parámetro (n=5 para cada grupo). Un ensayo t de Bonferroni permitió después identificar los grupos al principio de estas diferencias. Un valor de $P < 0,05$ se considera como significativo.

10 **8.2) Resultados**

15 El efecto de la modificación del estado redox de las células FSV-CULT sobre el potencial pro-angiogénico, se ensayó con un inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria mitocondriaca que induce la producción de especies activas del oxígeno y una modificación del estado redox de las células (antimicina), y de un agente antioxidante que limita la producción de especies activas del oxígeno y el estado redox celular (PDCT: ditiocarbamato de pirrolidina). Los resultados son presentados en las tablas II y III siguientes.

Tabla II: Efecto del tratamiento *in vitro* o *in vivo*, de las células FSV-CULT por la antimicina sobre el potencial angiogénico de las células

Inyección	Flujo sanguíneo en el miembro isquémico(miembro no isquémico)
Etanol	0,430 ± 0,025
Células FSV-CULT	0,616 ± 0,062
Células FSV-CULT tratadas con antimicina y después antimicina (i.p.)	0,830 ± 0,031
Células FSV-CULT no tratadas y después antimicina (i.p.)	0,426 ± 0,022

20

Tabla III: Efecto del tratamiento *in vitro* de las células FSV-CULT por la antimicina y/o el PDTC sobre el potencial angiogénico de las células

Inyección	Flujo sanguíneo en el miembro isquémico/miembro no isquémico	Resultado angiográfico en el miembro isquémico/miembro no isquémico
Etanol	0,430 ± 0,025	0,588 ± 0,033
Células FSV-CULT	0,690 ± 0,014	0,844 ± 0,027
Células FSV-CULT tratadas con antimicina	0,882 ± 0,015	1,094 ± 0,030
Células FSV-CULT tratadas con antimicina y PDTC	0,716 ± 0,024	0,846 ± 0,026
Células FSV-CULT tratadas con PDTC	0,718 ± 0,041	0,774 ± 0,023

25 El tratamiento de las células FSV-CULT con antimicina sola, antes de la inyección en el miembro isquémico, tiene un efecto significativamente positivo e importante sobre la revascularización, tal como lo muestra el aumento de un factor 1,4 del flujo sanguíneo ($p < 0,05$; tablas II y III) y de un factor 1,3 del resultado angiográfico ($p = 0,06$; tabla III). Este efecto se previene por un antioxidante (tabla III), lo que indica la implicación de las especies activas del oxígeno y/o una modificación del estado redox en los efectos favorables a la angiogénesis. Por el contrario, la antimicina no tiene efecto ninguno cuando se administra directamente en el animal, después de la inyección de las células FSV-CULT en el músculo isquémico (tabla II).

30

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 35 1. Ailhaud G. y otros, Annu. Rev. Nutr., 1992, 12, 207-33.
 2. Castellot J.J. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 5597-601.
 3. Bouloumie A. y otros, Ann. Endocrino. (París), 2002, 63, 91-5.
 4. Wasserman P., The development of adipose tissue, 1965.
 5. Dobson D.E. y otros, Cell, 1990, 61, 223-30.

6. Claffey KP. y otros, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 16316-22.
7. Bouloumie A. y otros, *Circ. Res.*, 1998, 83, 1059-66.
8. Sierra-Honigmann M.R. y otros, *Science*, 1998, 281, 1683-6.
9. Rupnick M.A. y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 10730-5.
- 5 10. Zuk PA. y otros, *Mol. Biol. Cell*, 2002, 13, 4279-95.
11. Erickson GR. y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 290, 763-9.
12. Cousin B. y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 301, 1016-22.
13. Safford KM. y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 294, 371-9.
14. Bjorntorp P. y otros, *J. Lipid Res.*, 1978, 19, 316-24.
- 10 15. Gehling U.M. y otros, *Blood*, 2000, 95, 3106-12.
16. Negrel R. y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1978, 75, 6054-8.
17. Negrel R. y otros, *Methods Enzymol.*, 1985, 109, 377-385.
18. Aoki S. y otros, *Cell Struct. Funct.*, 2003, 28, 55-60.
19. Shigematsu M. y otros, *Cell. Struct. Funct.*, 1999, 24, 89-100.
- 15 20. Demandez Pujol B. y otros, *Differentiation*, 2000, 65, 287-300.
21. Rehman J. y otros, *Circulation*, 2003, 107, 1164-9.
22. Jiang Y. y otros, *Nature*, 2002, 418, 41-9.
23. Jiang Y. y otros, *Exp. Hematol.*, 2002, 30, 896-904.
24. Gronthos S. y otros, *J. Cell Physiol.*, 2001, 189, 54-63.
- 20 25. Carmeliet P., *Nat. Med.*, 2003, 9, 653-60.
26. Orlic D. y otros, *Nature*, 2001, 410, 701-705.
27. Kocher AA. y otros, *Nat. Med.*, 2001, 7, 430-436.
28. Assmus B. y otros, *Circulation*, 2002, 106, 3009-17.
29. Strauer B.E. y otros, *Circulation*, 2002, 106, 1913-8.
- 25 30. Tateishi-Yuyama E. y otros, *Lancet*, 2002, 360, 427-35.
31. Tse H.F. y otros, *Lancet*, 2003, 361, 47-9.
32. Stamm C. y otros, *Lancet*, 2003, 361, 45-6.
33. Charrière G. y otros, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 9850-5.
34. Mallat Z. y otros, *Circ. Res.*, 2002, 91, 441-8.
- 30 35. Nibbelink M. y otros, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 47291-5.
36. Silvestre J.S. y otros, *Circ. Res.*, 2001, 89, 259-64.
37. Tamarat R. y otros, *Lab. Invest.*, 2002, 82, 747-56.
38. Lutun A. y otros, *Trends Cardiovasc. Med.*, 2002, 12, 88-96.
39. Iba O. y otros, *Circulation*, 2002, 106, 2019-2025.
- 35 40. Benelli R y otros, *Internat. J. Biol. Markers*, 1999, 14, 4, 243-246.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de células del tejido adiposo blanco, medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, CD13⁺, HLA ABC⁺, CD14⁺, CD45⁺, CD31⁺, CD 144⁺ y CD34⁺, para la preparación de un medicamento destinado a la reconstrucción total o parcial de una red vascular funcional.
- 10 2. Uso, según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas células del tejido adiposo están representadas por una subpoblación homogénea de células de la fracción estromal vascular extra-medular, susceptibles de ser obtenidas mediante expansión celular limitada en cultivo.
- 15 3. Uso, según la reivindicación 2, caracterizado porque dicha subpoblación homogénea de células de la fracción estromal vascular extra-medular es susceptible de ser obtenida mediante expansión celular, limitada por un número de pasos sucesivos inferior a 10 de dichas células.
- 20 4. Uso, según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas células del tejido adiposo están representadas por una subpoblación homogénea de adipocitos maduros desdiferenciados.
- 25 5. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dichas células del tejido adiposo que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC, están asociadas a un soporte polimérico sólido o semi-sólido.
- 30 6. Uso, según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho soporte polimérico sólido se selecciona del grupo constituido por las matrices membranarias básicas reconstituidas que comprenden al menos uno de los elementos siguientes: colágeno, laminina y proteoglicanos, y las matrices extracelulares reconstituidas que comprenden uno de los elementos siguientes: fibronectina, colágeno, laminina y trombospodina.
- 35 7. Uso, según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, caracterizado porque dicho soporte polimérico puede comprender, además, unas enzimas de degradación de dichas matrices, así como inhibidores enzimáticos y factores de crecimiento.
- 40 8. Uso, según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho soporte polimérico semi-sólido es preferentemente un derivado celulósico y en particular metilcelulosa.
- 45 9. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque dichas células son genéticamente modificadas.
- 50 10. Uso, según la reivindicación 9, caracterizado porque dichas células comprenden, al menos, una mutación de un gen autólogo.
- 55 11. Uso, según la reivindicación 9, caracterizado porque dichas células contienen, al menos, una copia de un gen heterólogo.
- 60 12. Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque dichas células son de origen humano.
- 65 13. Uso de una composición que contiene células del tejido adiposo blanco, medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC, tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y al menos un vehículo y/o un soporte apropiado para una administración parenteral o en el sitio, para la preparación de un medicamento destinado a la reconstrucción total o parcial de una red vascular funcional.
14. Composición farmacéutica que contiene células del tejido adiposo blanco, medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC y que no expresan los antígenos de superficie CD14, CD45, CD31 y CD144, tales como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9 a 12, estando dichas células asociadas a un soporte polimérico sólido o semi-sólido, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, y al menos un vehículo y/o un soporte apropiado para una administración parenteral o en el sitio.
15. Procedimiento de cultivo de células del tejido adiposo blanco medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC, caracterizándose dicho procedimiento porque comprende, al menos, las etapas siguientes:
- expansión celular limitada de células de la fracción estromal vascular extra-medular o de adipocitos maduros desdiferenciados, por un número de pasos sucesivos inferiores a 10 de dichas células sobre un soporte de cultivo sólido adecuado, en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento apto para estimular la formación de células endoteliales y eventualmente, al menos, una citoquina adecuada;

- modificación, de manera continua o transitoria, del entorno en oxígeno del cultivo, y
- modificación, de manera continua o transitoria, del equilibrio redox de dichas células o de la producción de especies activas del oxígeno por dichas células, mediante la adición de moléculas pro- o antioxidantes en el medio extra o intracelular.

5 16. Procedimiento, según la reivindicación 15, caracterizado porque el factor de crecimiento apto para estimular la formación de células endoteliales es en particular VEGF, preferentemente a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml.

10 17. Procedimiento, según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, caracterizado porque el entorno de oxígeno del cultivo está al 1%; desde algunas horas hasta algunos días.

15 18. Procedimiento de cribado de moléculas activas sobre las células endoteliales diferenciadas, caracterizándose dicho procedimiento porque comprende al menos las etapas siguientes:

- cultivar las células del tejido adiposo blanco medular o extra-medular que forman subpoblaciones homogéneas, que expresan al menos los antígenos de superficie CD13 y HLA ABC y que no expresan los antígenos de superficie CD14, CD45, CD31 y CD144, tal como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9 a 12, en un medio de cultivo polimérico semi-sólido,
- 20 - poner en contacto unas células endoteliales diferenciadas así obtenidas con un banco de moléculas a testar,
- identificar y seleccionar unas moléculas activas sobre dichas células endoteliales diferenciadas.

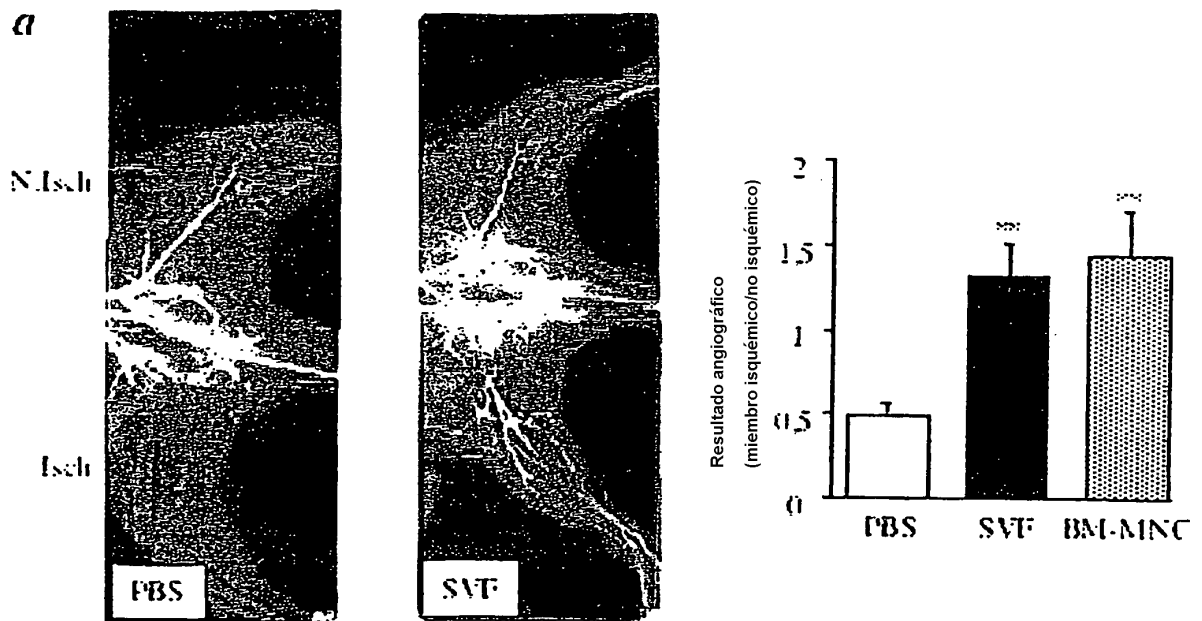


Figura 1.1

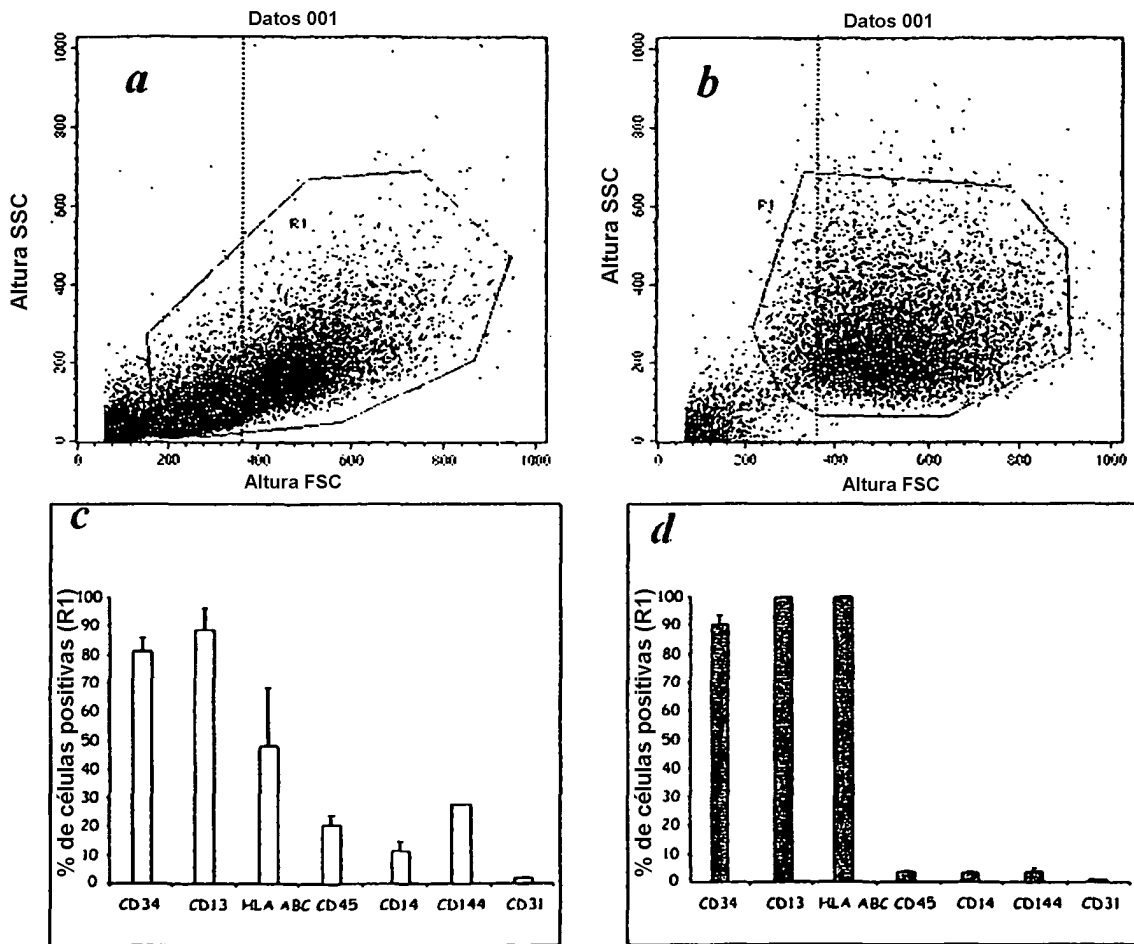


FIGURA 2

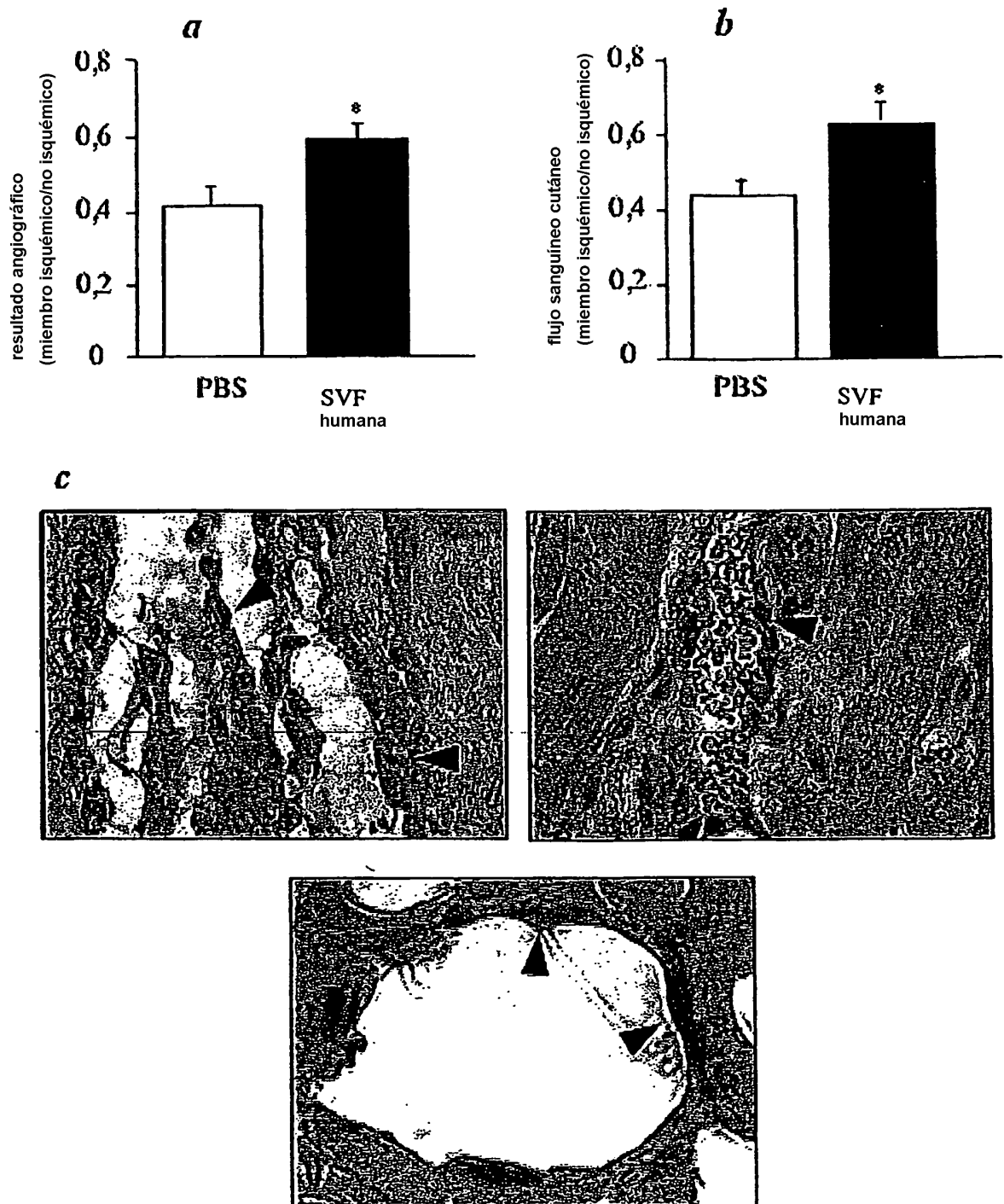


Figura 3

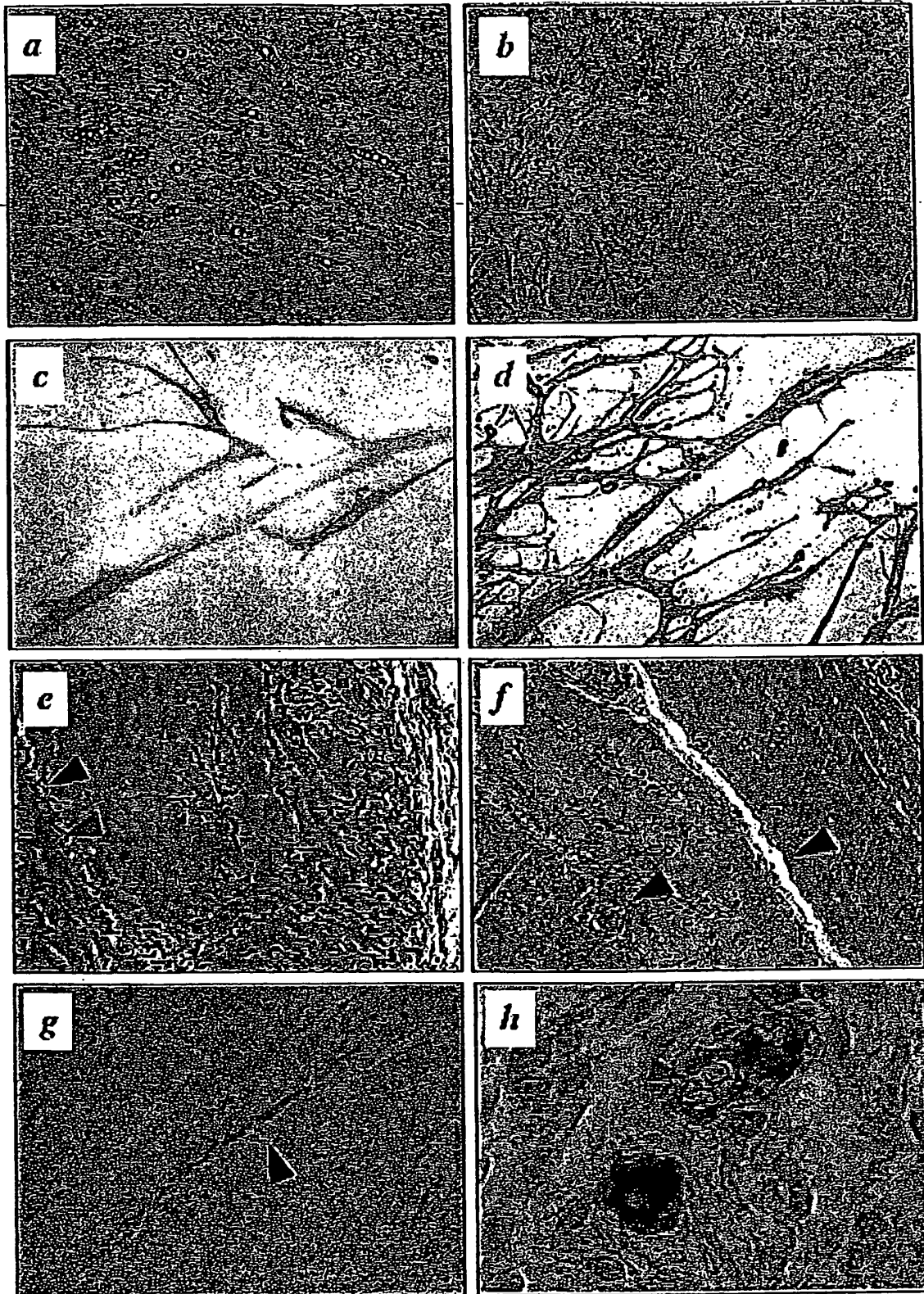


FIGURA 4

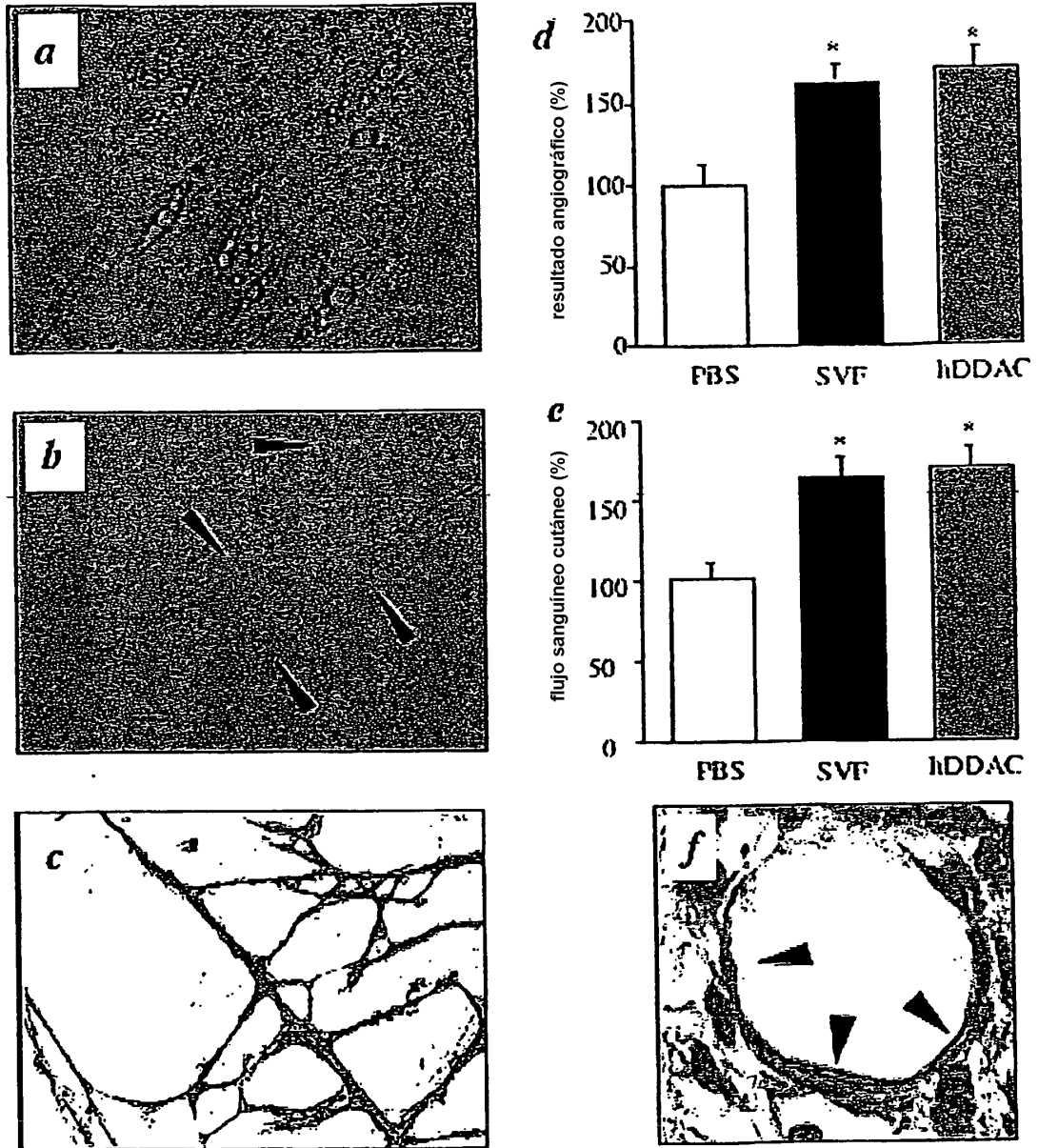


FIGURA 5

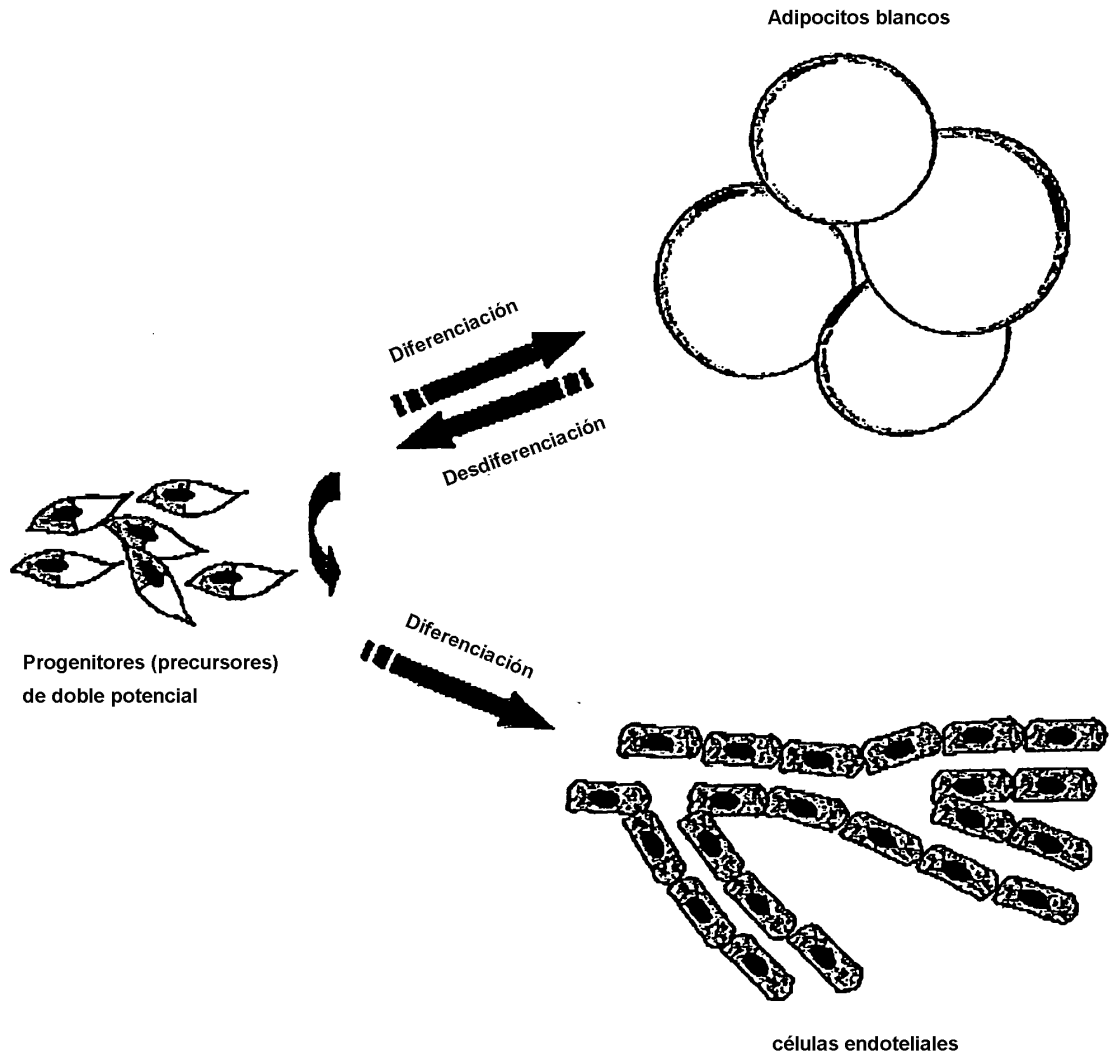


FIGURA 6