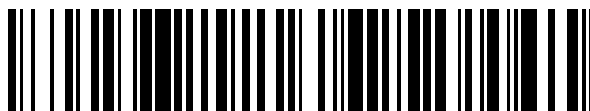


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 744**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2002 E 02711933 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1349919**

54 Título: **Células del tejido adiposo extramedular y sus aplicaciones en la reconstitución del tejido cardíaco**

30 Prioridad:

10.01.2001 FR 0100249

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

05.12.2013

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)**

3, rue Michel-Ange

75794 Paris Cedex 16, FR y

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (50.0%)**

72 Inventor/es:

CASTEILLA, LOUIS;

COUSIN, BÉATRICE;

PENICAUD, LUC y

ANDRÉ, MIREILLE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 432 744 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

Células del tejido adiposo extramedular y sus aplicaciones en la reconstitución del tejido cardíaco

5 La presente invención se refiere a células derivadas del tejido adiposo extramedular, a sus procedimientos de preparación, así como a sus aplicaciones en la regeneración muscular cardíaca, en particular para el tratamiento de miopatías, cardiomiopatías y enfermedades asociadas con una degeneración muscular (infarto de miocardio).

10 La regeneración del tejido muscular cardíaco (miocardio) se ha considerado bastante recientemente, ya que al contrario que los músculos esqueléticos, el corazón no tiene depósitos de células precursoras. Para regenerar el miocardio, se ha propuesto injertar células satélite autólogas en el corazón. Sin embargo, este procedimiento no es satisfactorio en la medida en que las células satélite injertadas se diferencian en células musculares esqueléticas que no tienen las mismas características contráctiles que los cardiomiocitos.

15 Por consiguiente, existe una necesidad real de disponer de nuevos medios y en particular de células capaces de regenerar el miocardio, que sean más eficaces y más sencillos de aplicar que los medios de la técnica anterior.

Recientemente se ha mostrado que los citoblastos de determinados tejidos no hematopoyéticos eran capaces de reconstituir todos los linajes hematopoyéticos de ratones, irradiados de forma letal, es decir:

- 20 - los citoblastos musculares derivados del músculo esquelético de ratones adultos expresan:
- o bien marcadores comunes a todos los citoblastos (Sca-1, c-Kit) pero no el marcador CD45, que es específico de citoblastos hematopoyéticos (Jackson y col., *PNAS*, 1999, 96, 14482-14486),
- 25 - o bien el receptor de la proteína morfogénica del tejido óseo de tipo 2 (BMP2), (Pang, *Blood*, 2000, 95, 1106-1108), y
- citoblastos neurales derivados de cerebro de ratón adulto (Bjornson y col., *Science*, 1999, 283, 534-537).

30 De forma análoga, para obtener cardiomiocitos, se ha propuesto usar células embrionarias humanas, células mesenquimatosas de la médula ósea o células endoteliales (Kehat y col., *J. Clin. Invest.*, 2001, 108, 407-414; Muller y col., *FASEB J.*, 2000, 14, 2540-2548; Toma y col., *Circulation*, 2002, 105, 93-98; Liechty y col., *Nat. Medicine*, 2000, 11, 1282-1286; Condorelli y col., *PNAS*, 2001, 98, 10733-10738; Wang y col., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 2001, 122, 699-705; Jackson y col., *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 1395-1402).

Se han propuesto dos hipótesis para explicar estos resultados: los citoblastos próximos a la totipotencia de las células embrionarias permanecerían en el tejido del adulto (cerebro, músculo...) y serían capaces de diferenciarse en diferentes tipos celulares, o bien los citoblastos especializados de estos tejidos tendrían una gran plasticidad y serían capaces de desdiferenciarse o de ser reprogramados (transdiferenciación).

40 Estos resultados tienen consecuencias importantes para el tratamiento de deficiencias funcionales de la médula ósea (aplasia medular), el tratamiento de la contaminación de la médula ósea por células tumorales (neuroblastoma) y para corregir anomalías genéticas de células hematopoyéticas (manipulación genética de tejido hematopoyético). Estos resultados también tienen consecuencias para el tratamiento de deficiencias musculares funcionales (miopatías y cardiomiopatías) y de enfermedades asociadas a una degeneración muscular (infarto de miocardio).

En efecto, el uso de citoblastos o de precursores de tejidos no hematopoyéticos permitiría evitar los problemas asociados con el rechazo de injerto de médula ósea o con una cantidad insuficiente de células CD34, en la medida en la que se podría considerar la reconstitución del líneas hematopoyéticas de un individuo adulto enfermo, por injerto de tejido nervioso o muscular autólogo extraído de este mismo individuo. Igualmente, el uso de citoblastos distintos de las células satélite, permitiría regenerar el miocardio por injerto de células de médula ósea, células embrionarias o células endoteliales.

55 Sin embargo, en la práctica, la regeneración del tejido muscular cardíaco a partir de las células citadas antes, difícilmente se puede realizar debido a dificultades técnicas en la extracción y a las pequeñas cantidades de tejidos disponibles. A estas dificultades técnicas se añaden igualmente los problemas éticos ligados al uso de tejidos embrionarios.

60 Por consiguiente, los autores de la invención se pusieron por objetivo proporcionar células capaces de reconstituir tejidos musculares de forma duradera, que sean aisladas de tejidos fáciles de extraer y disponibles en cantidades importantes.

El tejido adiposo existe en dos formas diferentes en los mamíferos: el tejido adiposo blanco que representa el órgano principal de reserva del organismo, el tejido adiposo pardo termogénico y el tejido adiposo medular cuya función

exacta no se conoce.

Este tejido adiposo está constituido por dos fracciones celulares:

- 5 - una fracción de adipocitos que comprende células adiposas diferenciadas: adipocitos inmaduros (células adiposas pequeñas) y adipocitos maduros que representan de 30% a 60% de las células del tejido adiposo. Esta fracción celular se caracteriza por la acumulación de triglicéridos y la expresión de marcadores tardíos y muy tardíos como la GPDH (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa), y
- 10 - una fracción que no son adipocitos, llamada fracción del estroma vascular que comprende algunas células sanguíneas, endoteliales, pericitos, fibroblastos y precursores de adipocitos, en particular preadipocitos caracterizados por la ausencia de lípidos en su citoplasma y la expresión de marcadores precoces como la cadena $\alpha 2$ del colágeno VI (A2COL6/pOb24) y la lipoproteína lipasa (LPL).
- 15 Estas dos fracciones celulares se pueden separar por su diferencia de densidad, según procedimientos tales como los descritos por Björntorp y col. (*J. Lipid Res.*, 1978, 19, 316-324).

De forma clásica, la diferenciación de los adipocitos se esquematiza de la siguiente forma: citoblastos multipotentes → precursor de adipocitos o preadipocito → adipocito inmaduro → adipocito maduro.

- 20 Los precursores muy precoces, es decir los citoblastos multipotentes capaces de generar diferentes tipos de células mesenquimatosas como las células adiposas y las células musculares, no se han identificado. Sin embargo, se ha mostrado que las líneas de las células mesenquimatosas eran capaces de diferenciarse en adipocitos, condrocitos o en fibroblastos, espontáneamente (línea de teratocarcinoma T984) o después de tratamiento con 5-azacitidina (10T1/2, 3T3, CHEF-18).
- 25

- Se han clonado precursores de adipocitos a partir de estas líneas celulares (línea clonal 1246), a partir de un embrión de ratón (3T3-L1, 3T3-F442A, A31T, TA1) o de hámster (CHEF-18) o bien a partir de ratón adulto (Ob17, HFGu, BFC-1, ST13, MS3-2A, MC 3t3-G2/PA6). Estos precursores de adipocitos son capaces de diferenciarse en adipocitos, in vitro o in vivo (Ailhaud y col., *Annu. Rev. Nutr.*, 1992, 12, 207-233).
- 30

- Además, en trabajos anteriores (Cousin y col., *The FASEB Journal*, 1999, 13, 305-312), los autores de invenciones que se han interesado en la relación entre los adipocitos y los macrófagos en la obesidad y la respuesta inflamatoria, han mostrado que los preadipocitos (cultivos primarios de la fracción del estroma vascular o la línea 3T3-L1), como macrófagos, tienen una actividad de fagocitosis y que el marcador MOMA-2 que es específico de los monocitos-macrófagos es expresado también por los preadipocitos y los adipocitos. Sin embargo, se desprende de este artículo que los preadipocitos son diferentes de los macrófagos en la medida en que, por técnicas clásicas, no se puede detectar la presencia en la superficie de sus células de los marcadores F4/80 y Mac1 que son específicos de los macrófagos maduros.
- 35
- 40

- El tejido adiposo tiene un potencial de regeneración que persiste durante toda la vida del individuo y está asociado al mantenimiento de una población de preadipocitos, dentro de diferentes depósitos adiposos. En efecto, el número de adipocitos presentes en un depósito dado varía en proporciones considerables según las condiciones fisiológicas o fisiopatológicas.
- 45

- Por lo tanto, se ha mostrado que en el hombre o en los roedores adultos, de la misma edad, las células de la fracción del estroma vascular del tejido adiposo que comprenden una proporción importante de preadipocitos, que expresan marcadores precoces de diferenciación (A2COL6/pOb24, LPL, IGF-1....) son capaces de proliferar in vitro y de diferenciarse en adipocitos (Ailhaud y col., 1992, citado antes).
- 50

- Por lo tanto, se ha propuesto usar citoblastos multipotentes derivados de la fracción del estroma vascular del tejido adiposo para reconstituir líneas hematopoyéticas, así como tejidos nerviosos y hepáticos (solicitud internacional WO 01/62901) o tejidos musculares óseos y cartilaginosos (Zuk y col., *Tissue Eng.*, 2001, 7, 20, 211-228). Sin embargo, los medios descritos en estos documentos no han permitido aislar dichos citoblastos capaces de diferenciarse eficazmente en células funcionales capaces de reconstituir una actividad muscular cardíaca.
- 55

- De forma sorprendente, los autores de la invención ahora han mostrado que células de la fracción del estroma vascular del tejido adiposo extramedular (o fracción celular del estroma vascular) son capaces de diferenciarse eficazmente en cardiomiocitos; dichas células son capaces de reconstituir un corazón funcional, en particular cuando son injertadas en la zona de infarto, después de un ataque cardíaco.
- 60

- Por consiguiente, la presente invención tiene por objeto la fracción celular del estroma vascular del tejido adiposo extramedular como medicamento; en efecto, esta fracción permite de forma sorprendente la regeneración del tejido muscular cardíaco (miocardio).
- 65

La invención tiene también por objeto el uso de dicha fracción para preparar un medicamento destinado al tratamiento de miopatías y cardiomiopatías de origen genético o adquiridas, y de patologías (inducidas o constitutivas) asociadas a una degeneración muscular tales como el infarto de miocardio.

5 En efecto, las células de la fracción del estroma vascular del tejido adiposo extramedular son capaces de diferenciarse en cardiomiocitos funcionales, presentando una actividad contráctil.

Según la invención, la fracción celular del estroma vascular se aísla por diferencia de densidad, en particular según el protocolo descrito por Björntorp y col. (citado antes).

10 La presente invención tiene también por objeto células aisladas y purificadas, capaces de diferenciarse en cardiomiocitos, caracterizados por que se pueden obtener mediante las siguientes etapas sucesivas:

- extracción de una muestra de tejido adiposo extramedular,

15 - aislamiento de la fracción celular del estroma vascular, preferiblemente por digestión de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas, y por separación física, en particular por diferencia de densidad, y

20 - purificación de las células por separación física y/o por inmunoselección, y por la expresión de al menos un marcador de citoblastos o de precursores de adipocitos seleccionado del grupo constituido por A2COL6/pOb24 y Pref-1 y al menos un marcador de precursores de cardiomiocitos seleccionado del grupo constituido por la α -actinina y el factor GATA-4.

Ventajosamente:

25 - la separación física se realiza por diferencia de adhesión sobre un soporte sólido adecuado o por diferencia de densidad (centrifugación en un gradiente adecuado, elutriación)

30 - la inmunoselección se realiza con ayuda de al menos un anticuerpo específico de un marcador expresado por los precursores de adipocitos, hematopoyéticos o de cardiomiocitos (selección positiva) y/o de al menos un anticuerpo específico de un marcador ausente de dichos precursores (selección negativa), que son en sí mismos conocidos para el experto en la materia.

35 Según una disposición ventajosa de este modo de realización, la etapa de purificación es precedida por una etapa complementaria de cultivo de las células en un medio semisólido que contiene factores de crecimiento y/o citoquinas adecuadas.

A modo de ejemplo no limitante, se puede citar un medio que contiene metilcelulosa complementada con suero de ternero fetal, suero bovino, insulina, transferrina, SCF (factor de citoblastos), IL3 e IL6.

40 En el marco de la invención, los citoblastos y los precursores corresponden a células multipotentes que tienen propiedades de expansión clonal y de diferenciación tisular, y estos dos términos se consideran equivalentes.

Preferiblemente, dichas células como se han definido antes, son de origen humano.

45 La presente invención tiene también por objeto células modificadas, caracterizadas porque están constituidas por células tales como las definidas antes, genéticamente modificadas

50 Según un modo de realización ventajoso, dichas células modificadas comprenden al menos una mutación de un gen autólogo.

En el sentido de la presente invención, se entiende por mutación de un gen, una inserción, una eliminación o una sustitución de al menos un nucleótido de dicho gen.

55 Por ejemplo, pueden mutarse los genes del CMH de dichas células, con el fin de permitir un injerto heterólogo.

Según otro modo de realización de dichas células modificadas, contienen al menos una copia de un gen heterólogo, en particular un gen de interés terapéutico. Ventajosamente, el producto de dicho gen es secretado por dichas células modificadas.

60 Por ejemplo, dichas células expresan una interleuquina o un factor que actúa en la coagulación sanguínea.

De acuerdo con la invención, dichas células modificadas se obtienen según técnicas que son en sí mismas conocidas por el experto en la materia; se puede citar en particular la recombinación homóloga, la infección por un vector recombinante tal como un virus recombinante (retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus asociado a adenovirus

(AAV)), o la transfección por un plásmido recombinante, que se describen en *Current Protocols in Molecular Biology*, (1990-2000), John Wiley and Sons, Inc. New York. Según la naturaleza del vector recombinante, dicho gen heterólogo de interés se integra en el genoma de dichas células o bien está presente en forma extracromosómica.

5 Preferiblemente, dichas células modificadas tal como se han definido antes, son de origen humano.

La presente invención tiene también por objeto líneas de células inmortalizadas derivadas de células humanas tales como se han definido antes.

10 De acuerdo con la invención, las líneas de células inmortalizadas se obtienen por pases a sucesivos, como se describe en Green y col., *Cell*, 1974, 3, 127-133.

De forma ventajosa, dicho medicamento se administra por vía parenteral, preferiblemente por vía intravenosa.

15 La presente invención tiene también por objeto un medicamento destinado a la regeneración del miocardio, caracterizado porque comprende células (aisladas y/o modificadas) capaces de diferenciarse en cardiomiocitos o líneas derivadas de estas células como se han definido antes y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De forma ventajosa, dicho medicamento se administra de forma local en el sitio de la lesión.

20 La presente invención tiene también por objeto el uso de células capaces de diferenciarse en cardiomiocitos o bien células modificadas o líneas derivadas de estas células, como se han definido antes, para preparar un medicamento destinado al tratamiento de cardiomiopatías y enfermedades en las que se observa una degeneración muscular cardíaca.

25 La presente invención tiene también por objeto el uso de células capaces de diferenciarse en cardiomiocitos o bien células modificadas o líneas derivadas de estas células, como se han definido antes, para cribar moléculas capaces de modular (activar o inhibir) la actividad cardíaca.

30 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de células aisladas y purificadas capaces de diferenciarse en cardiomiocitos, como se han definido antes, caracterizado dicho procedimiento porque comprende al menos las siguientes etapas:

35 a₂) extracción de una muestra de tejido adiposo extramedular,

b₂) aislamiento de la fracción celular del estroma vascular, preferiblemente por digestión de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas, y por separación física, y

40 c₂) purificación de las células por separación física y/o por inmunoselección.

Según un modo de llevar a cabo ventajosamente dicho procedimiento, previamente a la etapa c₁ o c₂, comprende una etapa complementaria de cultivo de las células en un medio semisólido que contiene factores de crecimiento y/o citoquinas adecuadas.

45 Según un modo de llevar a cabo ventajosamente dicho procedimiento, comprende una etapa complementaria d₁), d₂) o e₃) de expansión de las células in vitro.

Ventajosamente, la separación física se realiza por diferencia de adhesión sobre un soporte sólido o por diferencia de densidad y la inmunoselección se realiza con ayuda de al menos un anticuerpo específico de un marcador expresado por dichas células (selección positiva) y/o al menos un anticuerpo específico de un marcador ausente de dichas células (selección negativa) como se han definido antes.

50 De forma ventajosa, para llevar a cabo el procedimiento de obtención de las células aisladas y purificadas según la invención:

55 - la extracción (etapas a₁, a₂ o a₃) se puede llevar a cabo a nivel de un depósito adiposo fácilmente accesible, como un depósito adiposo subcutáneo,

60 - la fracción celular del estroma vascular se aísla (etapas b₁, b₂ o b₃) por diferencia de densidad, en particular según el protocolo descrito por Björntorp y col (citado antes),

- el cultivo de las células en un medio semisólido que contiene factores de crecimiento y/o citoquinas adecuadas (etapas complementarias o etapa c₃) se realiza en un medio que contiene metilcelulosa complementada con suero de ternero fetal, suero bovino, insulina, transferrina, SCF, IL3 e IL6.

65

- 5 - la purificación de las células (etapas c_1 , c_2 o d_3) se realiza por separación sobre cualquier soporte adecuado (diferencia de adhesión) o bien por centrifugación en un gradiente adecuado o por elutriación (diferencia de densidad), sea por inmunoselección, según las técnicas clásicas de inmunocitoquímica, en particular las técnicas de selección (positiva o negativa) de células inmunomarcadas por citometría de flujo o con ayuda de perlas magnéticas, tales como las descritas por ejemplo en *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, EE.UU.); al menos un anticuerpo específico de un marcador expresado por dichas células (selección positiva) y/o al menos un anticuerpo específico de un marcador ausente de dichas células (selección negativa) como se han definido antes.
- 10 - la expansión de las células in vitro (etapas d_1 , d_2 o e_3) se realiza en un medio de cultivo conveniente, tal como por ejemplo, pero de forma no limitante, un medio DMEM F12 que comprende sea suero de ternero fetal, sea un sustituto vegetal del suero.
- 15 En relación con los medios existentes de regeneración de tejido muscular cardíaco, las fracciones celulares y las células aisladas, así como sus procedimientos de preparación, como se han definido antes, presentan las siguientes ventajas:
- ventajas técnicas
- 20 - facilidad de extracción,
- cantidad de tejido y de células muy importante con posible expansión de las células extraídas, favorable para un injerto homólogo o heterólogo,
- 25 - posibilidad de mantener y multiplicar, es decir inmortalizar, las células in vitro en un medio definido, favorable para un injerto homólogo o heterólogo,
- posibilidad de reconstruir el tejido muscular de varios individuos a partir de un solo individuo,
- 30 - posibilidad de mantener las células congeladas,
- células que se pueden transfectar,
- 35 - células con un fuerte poder de secreción que se podrán usar para liberar proteínas de interés terapéutico,
- células adaptadas para el cribado in vitro, de una cantidad importante de moléculas terapéuticas que pueden modular la actividad muscular cardíaca.
- ventajas económicas:
- 40 - tiempo de hospitalización reducido (sin acondicionamiento ni citaféresis),
- ventajas éticas:
- 45 - extracciones poco invasivas,
- ausencia de uso de tejidos embrionarios.
- 50 Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende también otras disposiciones, que saldrán de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos de aplicación del procedimiento objeto de la presente invención así como a los dibujos adjuntos, en los que:
- 55 - la figura 1 ilustra la reconstitución de líneas hematopoyéticas, obtenidas por inyección de células del estroma vascular del tejido adiposo extramedular o de células de la médula ósea (control). La figura 1A es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el porcentaje de supervivencia de ratones irradiados de forma letal (en ordenadas), frente a una duración de 10 semanas después de la irradiación (en abscisas). Los ratones irradiados no reconstituidos se representan por círculos, los ratones trasplantados con células de la médula ósea se representan por cuadrados y los ratones trasplantados con células del estroma vascular se representan por triángulos. Cada grupo comprende un número inicial de 10 a 15 ratones. Las figuras 1B y 1C ilustran respectivamente el número de plaquetas y de leucocitos en ratones irradiados reconstituidos con células de la médula ósea (en negro) o células del estroma vascular del tejido adiposo (en blanco). Los resultados se expresan en porcentaje con respecto a los valores de los testigos no irradiados, y los valores indicados representan la media $\pm$ error típico, obtenidos en grupos de 5 a 15 ratones.
- 60 - la figura 2 ilustra la detección por PCR del gen *sry* específico del cromosoma Y en la rata (panel superior) y la
- 65

sangre (panel inferior) de ratones hembra reconstituidos, realizada 10 semanas después del trasplante de células de la médula ósea o de células del estroma vascular. Panel superior: la PCR se lleva a cabo con 50 ng (bandas 1, 5 y 6) o 150 ng (bandas 2 a 4) de ADN de rata. Se detecta un producto de 722 pb en los ratones reconstituidos con células de la médula ósea (banda 1) o del estroma vascular (bandas 2-4), derivadas de un ratón macho. No se detecta ninguna señal en los ratones hembra testigo (banda 5). Se usa una muestra de sangre de un ratón macho como testigo positivo (banda 6). Se indica como referencia un marcador de peso molecular (PM). Panel inferior: la PCR se lleva a cabo con 50 ng de ADN de sangre. Se detecta un producto de 722 pb en los animales reconstituidos con células de la médula ósea (banda 5) o del estroma vascular (bandas 3-4), derivadas de un ratón macho. No se detecta ninguna señal en los ratones hembra testigo (banda 2). Se usa una muestra de sangre de un ratón macho como testigo positivo (banda 1). Se indica como referencia un marcador de peso molecular (PM).

- la figura 3 ilustra el análisis por citometría de flujo de células del estroma vascular de ratones macho C57B1/6. Panel 1: la región R1 corresponde a la población celular seleccionada para el análisis, en función de los parámetros de granulometría (FSC: *Forwards Scatter*), en abscisas y los parámetros de tamaño (SSC: *Side Scatter*) en ordenadas. Panel 2: reparto de las células positivas por el antígeno A2COL6 específico de preadipocitos (en abscisas), en función del tamaño de las células (en ordenadas). Paneles 3 y 4: representación de un marcaje triple para el antígeno específico de preadipocitos (A2COL6) y C para dos antígenos específicos de citoblastos hematopoyéticos (CD45 y CD34). El panel 3 representa el reparto de células A2COL6⁺ (en abscisas) y CD34⁺ (en ordenadas) en la población de células CD45⁺. El panel 4 representa el reparto de células A2COL6⁺ (en abscisas) y CD45⁺ (en ordenadas) en la población de células CD34⁺.

- la figura 4 ilustra la reconstitución de líneas hematopoyéticas obtenidas por inyección de la línea de preadipocitos 3T3-L1 o de células de la médula ósea (control). La figura 1A es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el porcentaje de supervivencia de los ratones irradiados de forma letal (en ordenadas), frente a una duración de 10 semanas después de la irradiación (en abscisas). Los ratones irradiados no reconstituidos se representan por círculos, los ratones trasplantados con células de la médula ósea por cuadrados y los ratones trasplantados con la línea de preadipocitos 3T3-L1 por triángulos. Cada grupo comprende un número inicial de 10 a 15 ratones. Las figuras 4B y 4C representan respectivamente el número de plaquetas y de leucocitos en ratones irradiados reconstituidos con células de la médula ósea (en blanco) o células de la línea de preadipocitos 3T3-L1 (en negro). Los resultados se expresan en porcentaje con respecto a los valores de los testigos no irradiados, y los valores indicados representan la media $\pm$ error típico, obtenidos en grupos de 5 a 15 ratones.

- la figura 5 ilustra el análisis inmunocitoquímico de la diferenciación en cardiomiocitos y en células musculares esqueléticas de células aisladas a partir del estroma vascular del tejido adiposo extramedular, según los procedimientos de la invención. Paneles superiores: presencia de cardiomiocitos y de células musculares esqueléticas diferenciados y detectados específicamente con ayuda de un anticuerpo dirigido contra α -actinina (panel de la izquierda), por comparación, en el control negativo no se observa ningún marcaje en ausencia de anticuerpos dirigidos contra α -actinina (panel de la derecha). Paneles inferiores: presencia de células musculares esqueléticas diferenciadas y detectadas específicamente con ayuda de un anticuerpo dirigido contra isoformas rápidas de la miosina (panel de la izquierda), por comparación, en el control negativo no se observa ningún marcaje en ausencia de anticuerpos dirigidos contra isoformas rápidas de la miosina α (panel de la derecha).

EJEMPLO 1. Materiales y procedimientos.

1) Aislamiento de células de la médula ósea

Las células de la médula ósea se aíslan a partir de fémures de ratones C57B1/6 macho, de 6 semanas de edad; los glóbulos rojos eliminan por tratamiento con ayuda de una disolución de cloruro de amonio al 9% en agua, después las células se centrifugan a 600 g durante 10 min y se vuelven a suspender en PBS, antes de contarlas e inyectarlas.

2) Aislamiento de células del estroma vascular (fracción del estroma vascular o SVF)

Las células se aíslan según el protocolo descrito por Björntorp y col., citado antes. De forma más precisa, se extrae tejido adiposo inguinal de ratones C57B1/6 macho, de 6 semanas de edad y se digiere a 37°C durante 45 min, en tampón de PBS que contiene BSA al 0,2% y collagenasa 2 mg/ml. El producto de digestión se filtra sucesivamente sobre un filtro de 100 μ m y de 25 μ m, y después se centrifuga a 800 g durante 10 min; las células del estroma así aisladas se vuelven a poner en suspensión en un tampón de PBS, y después se cuentan y se usan en los experimentos de trasplante o para los análisis inmunológicos.

3) Cultivo de la línea de preadipocitos

La línea de preadipocitos de ratón 3T3-L1 (ATCC referencia CL-173) se cultiva en medio DMEM que contiene suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% y L-glutamina 2 mM. Los cultivos de células 3T3-L1 confluentes se recogen por tripsinización, se cuentan y se usan para los experimentos de trasplante o de análisis inmunológicos.

4) Trasplante de células (médula ósea, estroma vascular y línea 3T3-L1)

El día del trasplante, los ratones C57B1/6 hembra de 8 a 10 semanas de edad, reciben una irradiación letal de 10 Gy, en una sola dosis, y después una inyección de $5 \cdot 10^6$ a 10^7 células, en un volumen de 400 μ l, por vía intravenosa en la vena de la cola o por vía intraperitoneal. Los ratones son alimentados con agua acidificada y alimentos tratados en autoclave. Los animales son manipulados de acuerdo con las directrices relativas a la experimentación con animales.

5) Análisis hematológico

4, 8 ó 10 semanas después del trasplante, se extrae una muestra de 200 μ l de sangre periférica del plexo retroorbital de los ratones trasplantados y se transfiere inmediatamente a un tubo que contiene heparina. Las muestras de sangre periférica extraídas de los ratones no irradiados se usan como testigo positivo y las muestras de sangre periférica extraídas de ratones irradiados no reconstituídos se usan como testigo negativo. El recuento de células sanguíneas totales y la proporción de los diferentes tipos de células nucleadas se realiza automáticamente mediante un aparato de análisis hematológico.

6) Análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

10 semanas después del trasplante, se extrae el ADN genómico total de las células de tejidos hematopoyéticos (médula ósea, bazo, timo, hígado) y de la sangre, según las técnicas clásicas descritas en *Current Protocols in Molecular Biology*, (1990-2000), John Wiley and Sons, Inc. New York. Las muestras de ADN se amplifican en un volumen de 50 μ l que contiene 20 pmoles de cada uno de los cebadores del gen *sry*, específico del cromosoma Y, según el protocolo descrito por Pang y col., citado antes.

A partir del ADN de los ratones trasplantados con células de la médula ósea o células del estroma vascular, se obtiene un fragmento de 722 pb, que corresponde a las posiciones 256 a 978 del gen *sry*.

A partir del ADN de ratones trasplantados con la línea 3T3-L1, se obtienen diferentes fragmentos que no corresponden al gen *sry* pero cuyo perfil es específico de estas células.

Para cada serie de amplificación, se usan las muestras procedentes de ratones machos y hembras respectivamente como testigos positivo y negativo.

7) Análisis inmunoquímico

Las células en suspensión, aisladas como se describe en el ejemplo 1.2, se incuban con un primer anticuerpo, dirigido contra CD34 acoplado con biotina (Clinisciences) o dirigido contra CD45 (Clinisciences), diluidas con tampón de PBS que contiene BSA al 0,1%. Después de los lavados y centrifugados, las células se incuban respectivamente con un anticuerpo secundario [dirigido contra inmunoglobulinas de ratón acoplado con isotiocianato de fluoresceína (A2COL6), dirigido contra inmunoglobulinas de rata acoplado con rojo de texas (CD45)] y con estreptavidina acoplada con Cy-Chrome, según los protocolos clásicos descritos en *Current Protocols in Molecular Biology*, citado antes. Después las células se fijan en tampón de PBS que contiene paraformaldehído al 0,037% y se analizan por citometría de flujo, o bien se fijan en lamelas por centrifugación y se observan por microscopía de fluorescencia.

8) Diferenciación hematopoyética

Los progenitores o precursores hematopoyéticos a corto plazo se analizan a partir de tejidos hematopoyéticos de ratones C57B1/6 hembra, irradiados de forma letal, y después trasplantados según el protocolo descrito en el ejemplo 1.4.

Los progenitores o precursores hematopoyéticos a largo plazo se analizan a partir de tejidos hematopoyéticos de ratones SCID que han recibido una irradiación no letal de 4 Gy, y después se han trasplantado según el protocolo descrito en el ejemplo 1.4.

a) Líneas linfoides

Los timocitos (precursores de linfocitos) se purifican a partir del timo de ratones hembra trasplantados, según las técnicas clásicas tales como las descritas en *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, EE.UU.). Después se extrae el ADN genómico total de los timocitos y se amplifica como se ha descrito en el ejemplo 1.6.

b) Líneas mieloides

Se preparan extractos de células de la médula ósea y de bazo de ratones trasplantados según las técnicas clásicas

tales como las descritas en *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, EE.UU.), y después las células se siembran en un medio que contiene metilcelulosa al 1%, suero de ternero fetal al 15%, suero bovino al 1%, insulina humana 10 µg/ml, transferrina 200 µg/ml, mercaptoetanol 10^{-4} M, L-glutamina 2 mM, SCF murino recombinante 50 ng/ml, IL3 murina recombinante 10 ng/ml, IL6 humana recombinante 10 ng/ml (medio METHOCULT™ GF M3534, STEM CELL TECHNOLOGIES INC), según las instrucciones del fabricante.

9) Diferenciación muscular

Células del estroma vascular, aisladas como se describe en el ejemplo 1.2, se ponen en cultivo en el medio semisólido basado en metilcelulosa como se ha definido antes (ejemplo 1.8).

Los cardiomiocitos y las células musculares esqueléticas se detectan por la expresión de la α -actinina que se pone de manifiesto con ayuda de anticuerpos específicos (clon EA-53, SIGMA), según las instrucciones del fabricante.

Las células musculares esqueléticas se detectan específicamente por la expresión de la cadena pesada de la isoforma de miosina (isoformas más rápidas) que se pone de manifiesto con ayuda de anticuerpos específicos (clon MY-32, SIGMA), según las instrucciones del fabricante.

Los cardiomiocitos son detectados igualmente por su actividad contráctil espontánea, en presencia o ausencia de agonistas o antagonistas de receptores muscarínicos de la acetilcolina (carbamilcolina y atropina, respectivamente) o β -adrenérgicos (isoproterenol y propranolol, respectivamente).

De forma más precisa, se añaden 1 ml de medio DMEM que contiene carbamilcolina (2 µM), atropina (10 µM), isoproterenol (10 µM) o propranolol (40 µM) al medio basado en metilcelulosa. Después de una incubación de 5 min necesaria para la difusión de las moléculas, se elimina el exceso de tampón y se cuentan las contracciones de las células con microscopio durante 1 min.

EJEMPLO 2: Reconstitución de líneas hematopoyéticas a partir de células de la médula ósea (control) o de células del estroma vascular, en ratones hembra irradiados de forma letal

Los ratones receptores son irradiados y después trasplantados por vía intraperitoneal, con células del estroma vascular o bien con células de la médula ósea (control), según los protocolos descritos en el ejemplo 1.

1) Supervivencia de los animales irradiados

La figura 1A ilustra la supervivencia de los animales analizados 10 semanas después de la irradiación, para evaluar la reconstitución duradera de las líneas hematopoyéticas. Los resultados observados muestran que los ratones no reconstituidos mueren en las siguientes 3 semanas después de la irradiación. En cambio, se observa una supervivencia de 40% en los animales trasplantados con células del estroma vascular o bien con células de la médula ósea. Dado que la irradiación letal elimina la mayoría de los precursores hematológicos endógenos, los resultados observados indican que la supervivencia de los animales reconstituidos está asociada con las células injertadas.

2) Análisis de líneas hematopoyéticas

Las figuras 1B y 1C ilustran la reconstitución de diferentes líneas hematopoyéticas, expresado en porcentaje con respecto a los valores del testigo no irradiado.

En los ratones no reconstituidos, el número de plaquetas disminuye rápidamente en una semana, de un valor inicial de $553 \cdot 10^3$ plaquetas/µl a un valor de $145 \pm 6 \cdot 10^3$ plaquetas/µl. En cambio, en los ratones trasplantados con células del estroma vascular o células de la médula ósea, el número de plaquetas aumenta progresivamente para alcanzar valores significativos a las 4 semanas que prácticamente llegan a las del testigo a las 10 semanas (figura 1C).

En los ratones reconstituidos con células del estroma vascular, los leucocitos son prácticamente indetectables una semana después de la irradiación, pero 7 semanas más tarde, alcanzan los valores idénticos a los del testigo.

Las figuras 1B y 1C muestran igualmente que la recuperación del número de plaquetas y de leucocitos es más rápido en los ratones reconstituidos con células de la médula ósea.

El análisis de la población de leucocitos muestra que en los ratones reconstituidos con células de la médula ósea o células del estroma vascular, las proporciones de linfocitos, monocitos y granulocitos son equivalentes a las de los ratones testigo no irradiados.

Por consiguiente, estos resultados demuestran que la inyección intraperitoneal de células del estroma vascular

permite mantener con vida ratones irradiados de forma letal y permite la reconstitución de las líneas mieloides y linfoides con una eficacia comparable a la observada con un número equivalente de células de la médula ósea, pero con un retardo de algunas semanas.

5 3) Puesta en evidencia de las células injertadas en los ratones receptores

La presencia de células macho derivadas de células inyectadas en los tejidos hematopoyéticos y la sangre de ratones hembra reconstituidos, se ha analizado por la PCR con ayuda de cebadores del gen *sry*, específicos del cromosoma Y.

10 No se ha detectado ninguna célula macho en el grupo de ratones no reconstituidos o en los ratones hembra testigo.

En cambio, un producto de 722 pb específico del gen *sry* está presente en cantidades muy importantes en los tejidos hematopoyéticos (médula ósea, timo, bazo) y en la sangre de ratones a los que se ha inyectado células de la médula ósea derivadas de ratones macho (figura 2). Se ha detectado igualmente un producto de tamaño idéntico en los tejidos hematopoyéticos (médula ósea, timo, bazo) y en la sangre de ratones hembra, 10 semanas después del trasplante de células del estroma vascular, derivadas de ratones macho (figura 2).

Por consiguiente, los resultados presentados en la figura 2 muestran que algunas células del estroma vascular tienen la capacidad de migrar de la cavidad peritoneal hacia los sitios hematopoyéticos, proliferar y diferenciarse en células sanguíneas circulantes, permitiendo así reconstituir una hematopoyesis funcional en los ratones irradiados de forma letal.

25 4) Análisis de la diferenciación hematopoyética

El gen *sry* se detecta en los timocitos (precursores de linfocitos) purificados, derivados de ratones hembra trasplantados con las células del estroma vascular del tejido adiposo de ratones macho, indicando que estas células tienen un potencial de diferenciación en líneas linfoides.

30 Se han obtenido clones de células mieloides que contienen el gen *sry* a partir de células de la médula ósea y del bazo de ratones (C57 B1/6 y SCID) trasplantados con células del estroma vascular del tejido adiposo; en los ratones SCID irradiados de forma no letal, el número de clones hematopoyéticos que contienen el gen *sry* es significativamente superior. Estos resultados indican que las células del estroma vascular del tejido adiposo contienen progenitores hematopoyéticos capaces de diferenciarse en líneas mieloides.

35 El conjunto de estos resultados indica que el estroma vascular del tejido adiposo contiene progenitores hematopoyéticos a corto plazo y a largo plazo capaces de diferenciarse en líneas hematopoyéticas linfoides y mieloides, capaces de reconstituir una hematopoyesis funcional en los ratones irradiados.

40 **EJEMPLO 3: Análisis fenotípico de células del estroma vascular.**

En la medida en que el estroma vascular está constituido por una población de células heterogéneas, se han realizado experimentos de inmunomarcaje por citometría de flujo con el fin de identificar las células del estroma vascular que tienen una actividad hematopoyética.

45 La figura 3 muestra que $35,3 \pm 3,6\%$ de la población de células del estroma vascular expresan el antígeno A2COL6 que es un marcador específico de preadipocitos (panel 2). Usando 2 antígenos específicos de citoblastos hematopoyéticos, los experimentos de inmunomarcaje indican que $35,8 \pm 6\%$ y $30,6 \pm 3,1\%$ respectivamente de las células son positivas para CD34 y CD45, lo que demuestra que las células del estroma vascular, aisladas a partir de tejidos adiposos son una fuente inesperada de citoblastos hematopoyéticos aptos para diferenciarse en células de diferentes líneas hematopoyéticas (líneas mieloides y linfoides).

50 Experimentos complementarios de marcaje triple ponen de manifiesto que la mayoría de las células A2COL6 positivas expresan igualmente los antígenos CD34 y CD45 (figura 3: paneles 3 y 4) lo que demuestra que los preadipocitos se pueden considerar precursores hematopoyéticos. Este triple marcaje se ha obtenido igualmente con la línea de preadipocitos 3T3-L1.

60 **EJEMPLO 4: Reconstitución de líneas hematopoyéticas a partir de células de la línea de preadipocitos 3T3-L1, en ratones hembra irradiados de forma letal**

Los ratones receptores se irradian y después se someten a trasplante por vía intravenosa o intraperitoneal, con células de la línea de preadipocitos 3T3-L1, según los protocolos descritos en el ejemplo 1.

65 Experimentos preliminares han mostrado que los injertos son menos eficaces cuando las células se inyectan por vía intraperitoneal, probablemente debido a la lentitud de la migración de las células de la cavidad peritoneal hacia los

centros hematopoyéticos.

Por consiguiente, los resultados de las inyecciones intravenosas se presentan en la figura 4.

- 5 La figura 4A muestra que 10 semanas después de la irradiación letal, 80% de los ratones trasplantados con células de la médula ósea todavía viven, mientras que solamente han sobrevivido a la irradiación 50% de los ratones trasplantados con las células 3T3-L1.

- 10 El recuento de las células sanguíneas de los dos grupos de ratones trasplantados muestra una recuperación parcial del número de plaquetas y de leucocitos en las 4 semanas siguientes a la irradiación (figura 4B y 4C). A las 10 semanas, el número de plaquetas vuelve a ser equivalente al de los testigos no irradiados (figura 4B) para los dos grupos de ratones trasplantados. En cambio, a las 10 semanas los ratones reconstituidos con las células de la médula ósea vuelven a tener los valores equivalentes a los de los testigos no irradiados, mientras que el número de leucocitos no supera 50% de los valores de los testigos en los ratones reconstituidos con las células 3T3-L1.

- 15 El análisis de la población de leucocitos muestra que en los ratones reconstituidos con las células 3T3-L1, las proporciones de linfocitos, monocitos y granulocitos son equivalentes a los de los ratones testigo no irradiados.

- 20 Por consiguiente, estos resultados demuestran que comparativamente con las células de la médula ósea que son más eficaces y permiten la reconstitución de líneas mieloides y linfoides con valores comparables a los de los testigos no irradiados, desde las ocho semanas después de la irradiación, la línea 3T3-L1 permite, no obstante, una reconstitución parcial de las líneas hematopoyéticas.

25 **EJEMPLO 5: Diferenciación in vitro de células del estroma vascular de tejido adiposo en células musculares cardíacas y esqueléticas**

Células del estroma vascular, aisladas como se describe en el ejemplo 1.2, se ponen en cultivo y después se analizan en las condiciones descritas en el ejemplo 1.9.

- 30 En estas condiciones, se observa una multiplicación de las células y después una diferenciación de las células en células contráctiles cardíacas y esqueléticas.

- La figura 5 muestra la presencia de cardiomiocitos y de células musculares esqueléticas caracterizadas por la expresión de α -actinina. También muestra la detección específica de células musculares esqueléticas por la expresión de la cadena pesada de la isoforma de la miosina.

- 35 La siguiente tabla I muestra la actividad contráctil espontánea de las células, que es específica de cardiomiocitos, así como la inhibición de las contracciones por la carbamilcolina (agonista de receptores muscarínicos de la acetilcolina) y la inversión de su efecto por la adición de atropina (antagonista de los mismos receptores). Los valores corresponden a la media de 3 medidas independientes.

Tabla I

Carbamilcolina	-	+	+
Atropina	-	-	+
Contracciones	100%	53%	106%

- 45 La siguiente tabla II muestra la estimulación de la frecuencia de las contracciones por el isoproterenol (agonista de receptores β -adrenérgicos) y la inversión de su efecto por la adición de propranolol (antagonista de los mismos receptores). Los valores corresponden a la media de 3 medidas independientes.

Tabla II

50

Isoproterenol	-	+	+
Propranolol	-	-	+
Contracciones	100%	160%	100%

REIVINDICACIONES

1. Uso de la fracción celular del estroma vascular del tejido adiposo extramedular, para preparar un medicamento destinado al tratamiento de cardiomiopatías y de enfermedades en las que se observa una degeneración muscular cardíaca.
2. Células aisladas y purificadas, capaces de diferenciarse en cardiomiocitos, **caracterizadas porque** se pueden obtener mediante las siguientes etapas sucesivas:
 - extracción de una muestra de tejido adiposo extramedular,
 - aislamiento de la fracción celular del estroma vascular,
 - cultivo de las células en un medio semisólido que contiene factores de crecimiento y/o citoquinas adecuados, y
 - purificación de las células por separación física y/o por inmunoselección, y**porque** expresan al menos un marcador de precursores de adipocitos seleccionado del grupo constituido por A2COL6/pOb24 y Pref-1 y al menos un marcador de precursores de cardiomiocitos seleccionado del grupo que comprende la α -actinina y el factor GATA-4.
3. Células según la reivindicación 2, **caracterizadas porque** dicho medio semisólido que contiene factores de crecimiento y/o citoquinas adecuados es un medio que contiene metilcelulosa complementada con suero fetal de ternero, suero bovino, insulina, transferrina, SCF (*factor de células madre*), IL3 e IL6.
4. Células según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, **caracterizadas porque** el aislamiento de la fracción celular del estroma vascular se realiza por digestión de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas y por separación física.
5. Células según cualquiera de las reivindicación 2 a 4, **caracterizadas porque** la separación física se realiza basándose en la diferencia de adhesión sobre un soporte sólido adecuado.
6. Células según cualquiera de las reivindicación 2 a 5, **caracterizadas porque** expresan al menos A2COL6/pOb24.
7. Células según cualquiera de las reivindicación 2 a 6, **caracterizadas porque** son de origen humano.
8. Células modificadas, **caracterizadas porque** son células según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 que están modificadas genéticamente.
9. Células modificadas según la reivindicación 8, **caracterizadas porque** comprenden al menos una mutación de un gen autólogo.
10. Células modificadas según la reivindicación 8, **caracterizadas porque** contienen al menos una copia de un gen heterólogo.
11. Células según cualquiera de las reivindicación 8 a 10, **caracterizadas porque** son de origen humano.
12. Líneas celulares inmortalizadas derivadas de células humanas según la reivindicación 7 o la reivindicación 11.
13. Medicamento destinado a la regeneración del miocardio, **caracterizado porque** comprende células según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o células modificadas o líneas derivadas de estas células según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Uso de las células según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, o bien de las células modificadas o de las líneas derivadas de estas células según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para preparar un medicamento destinado al tratamiento de cardiomiopatías y de enfermedades asociadas con la degeneración muscular cardíaca.
15. Procedimiento de preparación de células aisladas y purificadas capaces de diferenciarse en cardiomiocitos, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado porque** dicho procedimiento comprende al menos las siguientes etapas:
 - a) extracción de una muestra de tejido adiposo extramedular,

b) aislamiento de la fracción celular del estroma vascular, preferiblemente por digestión de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas, y por separación física,

c₁) cultivo de las células en un medio semisólido que contiene factores de crecimiento y/o citoquinas adecuados, y

c₂) purificación de las células por separación física y/o por inmunoselección.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado porque** comprende la etapa adicional d) de expansión de las células in vitro.

17. Procedimiento según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, **caracterizado porque** la inmunoselección se realiza con ayuda de un anticuerpo específico de un marcador expresado por dichas células tal como se definen en la reivindicación 2.

18. Uso de las células según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o bien de las células modificadas o de las líneas derivadas de estas células según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para el cribado de moléculas capaces de modular la actividad muscular cardíaca.

19. Procedimiento de preparación de cardiomiocitos, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:

a) cultivo de células purificadas y aisladas a partir de la fracción celular del estroma vascular del tejido adiposo extramedular, en un medio semisólido que contiene factores de crecimiento y/o citoquinas adecuados, y

b) selección de las células que presentan actividad contráctil espontánea.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado porque** la etapa b) comprende la selección de dichas células cuya actividad contráctil es inhibida de forma reversible por un agonista de receptores muscarínicos de la acetilcolina.

21. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado porque** la etapa b) comprende la selección de dichas células cuya frecuencia de contracción es estimulada de forma reversible por un agonista de receptores β -adrenérgicos.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, **caracterizado porque** dicho medio semisólido es metilcelulosa.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, **caracterizado porque** dichos factores de crecimiento y/o citoquinas adecuados son suero fetal de ternero, suero bovino, insulina, transferrina, SCF, IL3 e IL6.

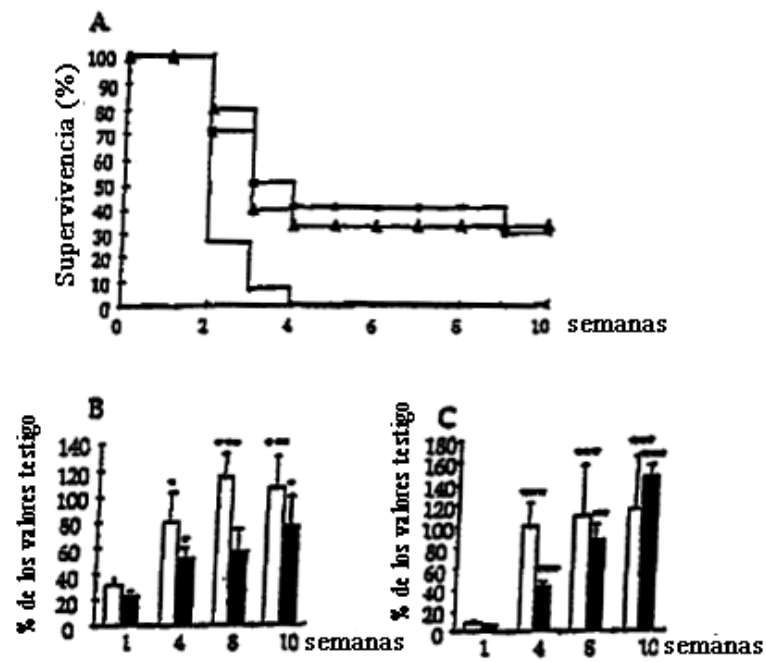


FIGURA 1



FIGURA 2

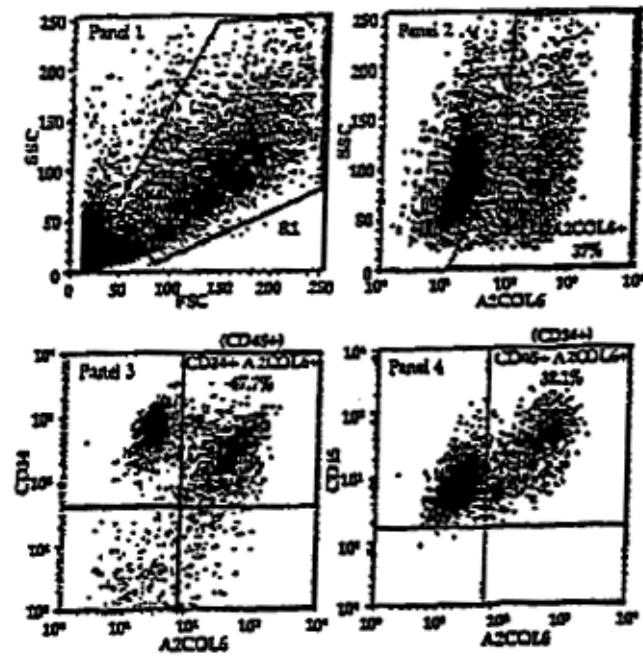


FIGURA 3

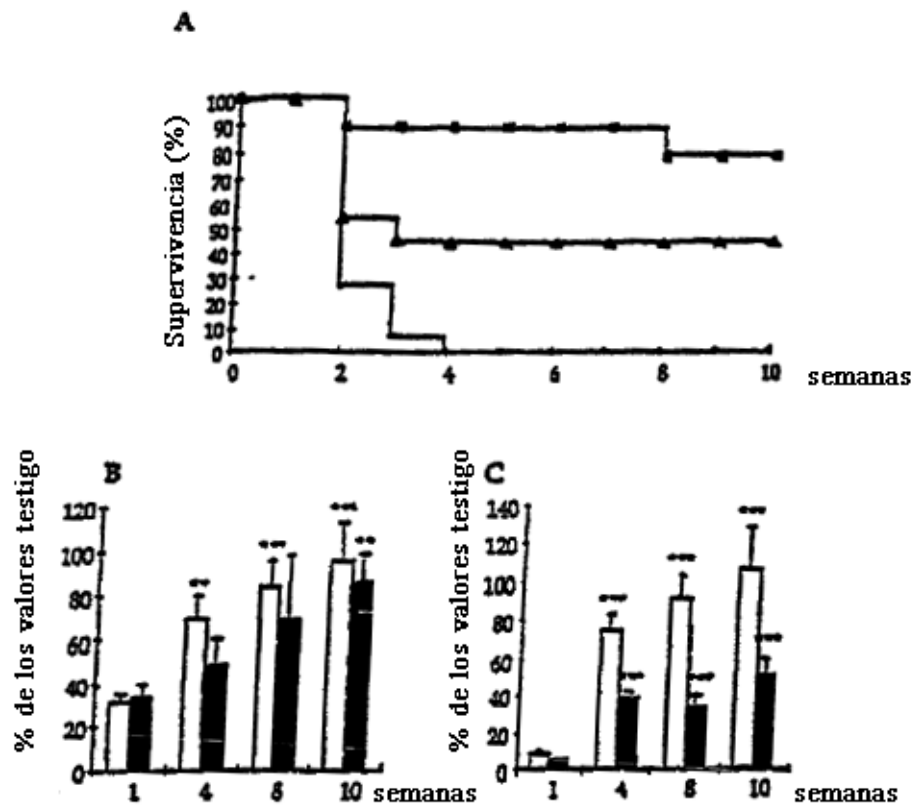


FIGURA 4

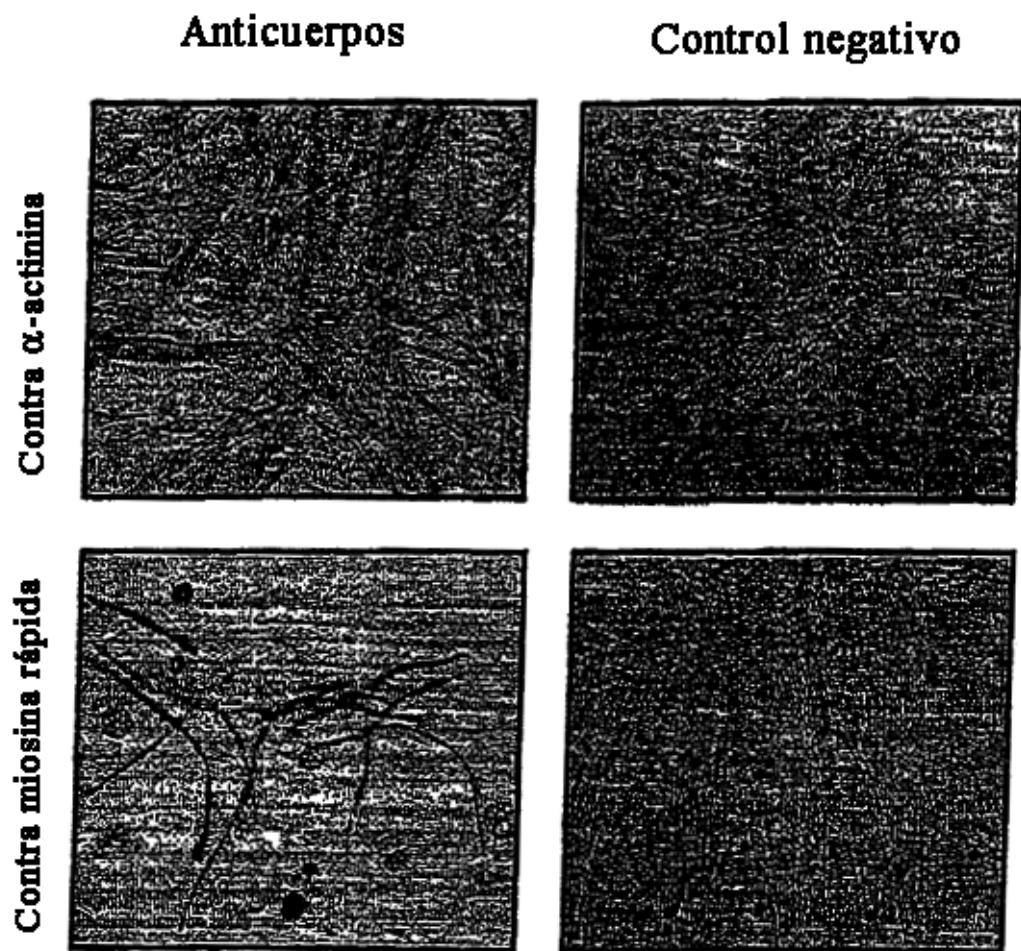


FIGURA 5