

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 930**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2007 PCT/FR2007/000158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2007 WO07085745**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007 E 07730876 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 1984490**

54 Título: **Procedimiento de cultivo de células procedentes de tejido adiposo y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

26.01.2006 FR 0600710

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

29.05.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (100.0%)
3, RUE MICHEL ANGE
75016 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**CASTEILLA, LOUIS;
PLANAT-BENARD, VALÉRIE;
PENICAUD, LUC y
JOFFRE-CHANUT, CARINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 613 930 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

Procedimiento de cultivo de células procedentes de tejido adiposo y sus aplicaciones

La presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células procedentes de tejido adiposo y principalmente de la fracción estromal vascular (abreviadamente en lo sucesivo SVF por la expresión inglesa *Stromal Vascular Fraction*) para inducir la formación de cardiomiocitos.

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de células obtenidas por el procedimiento de cultivo tal como se define anteriormente para reconstituir una zona cardíaca isquémica, principalmente después de un infarto, así como una composición farmacéutica que contiene dichas células.

La insuficiencia cardíaca se desarrolla, en muchos casos, como resultado de un accidente isquémico (infarto de miocardio) y está asociada a una pérdida importante de cardiomiocitos y a una isquemia, que no está compensada por la renovación normal de los cardiomiocitos diferenciados por el corazón.

Los medios existentes para reconstituir los cardiomiocitos se basan esencialmente en estrategias que incluyen una terapia celular, para mejorar el comportamiento contráctil defectuoso y la función cardíaca (Wollert et al., *Circulation* 2005, 112, 2, 151-153).

Dichos medios comprenden esencialmente:

- el trasplante de mioblastos autólogos o células satélite, que mejoran la función cardíaca, incluso si dichas células conservan sus características de células musculares en el corazón isquémico. Sin embargo, la aparente ausencia de conexiones entre los mioblastos injertados y los cardiomiocitos residentes excluye una contribución sincronizada de las células injertadas a la función de la bomba sistólica.

- el concepto de plasticidad celular ha abierto nuevas perspectivas en el campo de la insuficiencia cardíaca y ha conducido a utilizar diferentes células con la esperanza de que estas células ectópicas puedan transdiferenciarse en cardiomiocitos, cuando se colocan en un contexto *in vivo* adaptado. De hecho, los estudios iniciales han sugerido que las células madre mesenquimatosas de la médula ósea y las células hematopoyéticas pueden transdiferenciarse en cardiomiocitos; sin embargo, este fenómeno se está discutiendo actualmente al igual que el concepto de plasticidad celular.

- se ha preconizado otra vía, menos complicada, y propone emplear las células implicadas en el proceso de transformación en cardiomiocitos, tales como las células madre cardiomiocitarias residentes, las células fetales, las células embrionarias u otras células, tales como las células mesenquimatosas de la médula ósea o las células endoteliales (Kehat et al., *J. Clin. Invest.*, 2001, 108, 407-444; Muller et al., *FASEB J.*, 2000, 14, 2540-2558; Toma et al., *Circulation*, 2002, 105, 93-98; Liechty et al., *Nat. Medicine*, 2000, 11, 1282-1286; Conderelli et al., *PNAS*, 2001, 98, 10733-10738; Wang et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001, 122, 699-705; Jackson et al., *J. Clin. Invest.* 2001, 107, 1395-1402). Se han propuesto dos hipótesis para explicar estos resultados: las células próximas a la pluripotencia de las células embrionarias persistirían en tejidos de adultos (cerebro, músculo ...) y serían capaces de diferenciarse en diferentes tipos celulares o bien células madre especializadas de estos tejidos poseerían una gran plasticidad y serían capaces de diferenciarse o ser reprogramadas (transdiferenciación). Estos resultados tienen consecuencias importantes para el tratamiento de déficits musculares funcionales (miopatías y cardiomiopatías) y enfermedades asociadas a una degeneración muscular (infarto de miocardio). Sin embargo, en la práctica, la reconstrucción eficaz de tejidos musculares cardíacos a partir de las células antes citadas es difícilmente realizable debido a las dificultades técnicas de la extracción y las pequeñas cantidades de tejidos disponibles. A estas dificultades técnicas, se añaden igualmente los problemas éticos asociados con el uso de tejidos embrionarios (M/S, 2004, 6-7, 20, 651-661).

En este contexto, existe una necesidad real de nuevos medios y principalmente nuevas fuentes de células capaces de reconstruir eficazmente el miocardio que sean eficaces y más sencillas de emplear que los medios existentes.

En consecuencia, los inventores se fijaron el objetivo de proporcionar células capaces de reconstituir los tejidos musculares cardíacos, de una manera duradera, aislando dichas células de tejidos fáciles de extraer y disponibles en cantidades importantes.

Los inventores, en el marco de sus investigaciones anteriores han encontrado (solicitud de patente WO 02/055678) que existía una diferenciación espontánea de células derivadas de tejido adiposo, y más particularmente de células de la fracción estromal vascular (SVF), en cardiomiocitos funcionales, cuando estas células derivadas de tejido adiposo se cultivan en un medio que contiene metilcelulosa (solicitud de patente internacional PCT WO 02/055678; Planat et al., *Circ. Res.*, 2004, 94, 223-229).

Así, la solicitud de patente internacional PCT WO 02/055678 preconiza para obtener una diferenciación de células de la SVF en células cardiogénicas, una etapa de preparación de la SVF, una etapa tricelular (selección) que comprende el cultivo de las células en un medio semisólido (metilcelulosa) y/o la purificación de las células por separación física y/o inmunoselección (anticuerpos) y una etapa denominada de expansión de las células en medio

líquido DMEM-F12. Sin embargo, sucede que el cultivo en el medio líquido DMEM-F12 no permite de hecho el mantenimiento de las células cardiomiogénicas y tampoco su expansión (Planat-Bénard et al., *Circ. Res.*, 2004, 94, 223-229).

5 En efecto, la publicación de los autores Planat-Bénard et al., antes citada muestra que las células de la SVF son capaces de diferenciarse espontáneamente en cardiomiocitos cuando se cultivan en un medio que contiene metilcelulosa. Se precisa además que estas células pueden ser mantenidas varios meses en metilcelulosa o en un medio de cultivo líquido DMEM-F12.

10 Así pues, la publicación citada muestra que se pueden obtener, de modo espontáneo, a partir de la SVF, células de tipo cardiomiocito en cultivo primario, cuando se utiliza como medio de cultivo, un medio semisólido a base de metilcelulosa. Por el contrario, cuando se utiliza el medio líquido DMEM-F12, se observan muy pocas células contráctiles.

15 Así, tanto en el procedimiento descrito en la solicitud de patente PCT internacional WO 02/055678 como en el preconizado en la publicación de los autores Planat-Bénard et al., antes citada, si bien permite obtener eficazmente cardiomiocitos, no proporciona un buen rendimiento de diferenciación. En efecto, la frecuencia de obtención de cardiomiocitos tanto en el procedimiento descrito en la solicitud de patente PCT Internacional WO 02/055678 como en la publicación de los autores Planat-Bénard et al., es muy débil; esto se debe principalmente a la heterogeneidad de las células de la SVF y a la variabilidad de su preparación, que no permite obtener, en las condiciones de cultivo estándares precedentemente descritas, un buen rendimiento de diferenciación de estas células en células cardíacas.

20 Teniendo en cuenta que en las condiciones antes citadas esta diferenciación es escasa, los inventores han puesto a punto ahora un método de expansión *in vitro* que presenta un rendimiento muy bueno en células cardiomiogénicas a partir de tejido adiposo y más particularmente a partir de la fracción estromal vascular.

Por tanto, la presente solicitud tiene por objeto obtener células cardíacas, a partir de la SVF, con un alto rendimiento, para su uso terapéutico.

25 Se ha encontrado inesperadamente que las células así obtenidas sobreviven, pueden ser injertadas y se diferencian en cardiomiocitos después de su implantación en un modelo animal (ratón que presenta isquemia aguda) en comparación con células del tejido adiposo cultivadas, no transformadas en cardiomiocitos.

Para los fines de la presente invención, se entiende por:

– células cardiomiogénicas, cualquier célula capaz de diferenciarse en células de tipo cardíaco, comprendidas las progenitoras cardíacas (células precursoras presentes en el corazón);

30 – cardiomiocitos, los cardiomiocitos contráctiles, de forma cilíndrica que presentan conexiones con las células miocárdicas adyacentes, para formar un retículo tridimensional complejo;

– células de tipo cardíaco (o con fenotipo cardíaco), células que expresan proteínas cardíacas (troponina T); se trata de células en curso de diferenciación cardíaca; se distinguen de las células cardiomiogénicas propiamente dichas que tienen un potencial cardíaco, es decir son aptas para implicarse en una vía de diferenciación cardíaca;

35 – expansión celular: se considera que hay una expansión celular cuando algunas células de un cultivo celular son extraídas y sembradas en un nuevo medio de cultivo, y después proliferan. Cuando esta operación no se realiza más que una sola vez, se tiene un solo pase. Cuando esta operación se realiza varias veces (siembra y división celular), se efectúan así pases sucesivos.

– mantenimiento celular: cultivo celular sin pases.

40 En lo sucesivo la expresión células cardíacas (o también células cardiogénicas) incluye a la vez las células cardiomiogénicas, las progenitoras cardíacas, las células de tipo cardíaco y los cardiomiocitos.

El tejido adiposo existe en diversas formas en los mamíferos: el tejido adiposo blanco extramedular que representa el principal órgano de reserva del organismo, el tejido adiposo blanco medular cuya función exacta no es conocida y el tejido adiposo pardo termogénico.

45 Debido a su importante potencial de expansión que persiste durante toda la vida del individuo, el tejido adiposo blanco de adulto constituye una fuente abundante de células que son fáciles de obtener.

Este tejido adiposo blanco está constituido por dos fracciones celulares:

– una fracción adipocitaria que representa 30% a 60% de células del tejido adiposo y se caracteriza por la acumulación de triglicéridos (fracción de células flotantes). Esta fracción está compuesta principalmente (99%) de adipocitos diferenciados y de algunos macrófagos contaminantes, ricos en gotitas lipídicas, y

50

– una fracción no adipocitaria, denominada fracción estromal vascular (SVF), que comprende algunas células sanguíneas, algunas células endoteliales maduras (células del endotelio microvascular: CD31⁺, CD144⁺), pericitos, fibroblastos y células madre pluripotentes .

5 Se ha demostrado que la fracción estromal vascular, que se utiliza convencionalmente para estudiar la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros, era una fuente de células pluripotentes, que comprende además células progenitoras adipocitarias (preadipocitos), células progenitoras endoteliales, hematopoyéticas y neurogénicas, así como células madre mesenquimatosas capaces de diferenciarse en líneas osteogénicas, condrogénicas y miogénicas (Planat-Bénard V. et al., *Circulation*, 2004, 109, 656-663; Zuk PA et al., *Mol. Biol. Cell* 2002, **13**, 4279-95; Erickson GR. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, **290**, 763-9; Cousin B. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, **301**, 1016-22; Safford KM et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 294, 371-9; Solicitud de patente internacional PCT WO 02/055678 y solicitud de patente de EE.UU. 2003/0082152).

Estas dos fracciones celulares se pueden separar por su diferencia de densidad, de acuerdo con procedimientos tales s como los descritos por Björntorp et al.. (*J. Lipid. Res.*, 1978, 19, 316-24).

15 Los inventores han puesto a punto ahora condiciones de cultivo que aumentan significativamente el número de células de la SVF capaces de transformarse (o transdiferenciarse) en células con fenotipo cardíaco:

– bien sea directamente a partir de la SVF en bruto recién preparada, con ayuda de al menos un marcador fenotípico, que permite seleccionar directamente una población de interés (por ejemplo, tri CMH1 negativa), seguido por cultivo en una medio líquido adecuado,

20 – bien sea después del cultivo primario de la SVF en bruto recién preparada en un medio semisólido, seguido por un cultivo secundario de las células obtenidas en un medio líquido adecuado; en este caso, se puede realizar además una etapa tri celular antes del cultivo secundario.

La presencia de células cardíacas en el tejido adiposo es sorprendente y las señales implicadas en la transformación de células quiescentes residentes quiescentes en células que presentan un fenotipo cardíaco contráctil no eran conocidas hasta ahora.

25 Se ha descrito que el TGFβ y H₂O₂ eran eficaces en promover la diferenciación de los cardiomiocitos neonatales y de las células madre embrionarias, pero no permitían la inducción de dicha transformación a partir de células derivadas del tejido adiposo.

Entre los factores analizados (IL3, IL6, SCF, BMP2, TGFβ, 5-aza-citidina), sólo la presencia de β-mercaptoetanol es necesaria pero no suficiente

30 La presente invención tiene pues por objeto un procedimiento de obtención de células cardíacas, caracterizado porque comprende al menos las etapas siguientes:

a) selección de células cardiomiogénicas a partir de la fracción estromal vascular (SVF o FSV por *stromal vascular fraction* en bruto;

35 b) cultivo de las células seleccionadas en la etapa a) en un medio líquido optimizado para la expansión *ex vivo* de las células cardiomiogénicas, siendo dicho medio líquido seleccionado del grupo constituido por el medio BHK21 que contiene al menos suero de ternera fetal y β-mercaptoetanol y cualquier otro medio cuya composición sea del mismo tipo que la del medio BHK21 en lo que se refiere a la composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas;

c) mantenimiento y expansión de dichas células por pases sucesivos en medio líquido; y

40 d) obtención de células cardíacas.

Por lo tanto, las células de la SVF representan una población celular heterogénea que se puede utilizar directamente (fracción SVF en bruto recién preparada) o después de cultivo.

45 Las células de la SVF después de cultivo primario corresponden a una subpoblación de células adherentes (fracción de células adherentes de la SVF, también denominada ADSC por la expresión inglesa *Adipose-Derived Stromal Cell*).

50 Ventajosamente, dicho cultivo de células seleccionadas en la etapa a) se realiza en un medio líquido tal como se ha define antes y sobre una superficie de adhesión adecuada (tipo gelatina, proteínas de adhesión, proteínas de la matriz extracelular). Por ejemplo, dicho cultivo se lleva a cabo en placas recubiertas de gelatina y que contienen medio BHK21. En efecto, son importantes las propiedades de adhesión de las células cardiogénicas de interés y el medio de cultivo líquido utilizado para la expansión.

El cultivo primario en metilcelulosa hasta la aparición de células alargadas contráctiles permite la selección de células que son capaces de iniciar un programa de diferenciación cardíaca.

Estas células se siembran en un medio líquido BHK21. Se obtiene una expansión celular sembrando cada 2 días en un medio BHK21 las células en suspensión (sin tratamiento proteolítico).

5 Se obtienen *in vitro* a la vez células cardiomiogénicas propiamente dichas (precursoras capaces de participar en una vía de diferenciación cardíaca) y células de tipo cardíaco (células en curso de diferenciación cardíaca); en efecto, las células cardiomiogénicas obtenidas *in vitro* se diferencian en gran parte en células de tipo cardíaco, pero la diferenciación *in vitro* nunca es tan satisfactoria como la obtenida *in vivo*; porque *in vivo* se obtienen cardiomiocitos.

Dichas células cardíacas pueden ser conservadas ventajosamente en forma congelada.

10 En un primer modo de realización ventajosa de dicho procedimiento (procedimiento 1), la selección de la etapa a) se efectúa por cultivo primario de las células de la fracción estromal vascular (FSV o SVF por *stromal vascular fraction*) en bruto en un medio semisólido, hasta la aparición de agrupaciones (o clones) de células contráctiles; en este caso:

15 – la etapa b) comprende la extracción de dichas células contráctiles constituidas por dos subpoblaciones que presentan tipos morfológicos distintos, a saber, células adherentes de tipo alargado y células no adherentes de tipo redondo (o redondeado); y el trasplante de dichas células contráctiles en un medio líquido optimizado para la expansión *ex vivo* de células cardiomiogénicas o células madre embrionarias (células de tipo ES); preferiblemente, la etapa b) de cultivo de células seleccionadas en a) se efectúa en un medio líquido BHK21 que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol y cualquier otro medio cuya composición sea del mismo tipo que la del medio BHK21 en lo que respecta a la composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas y sobre una superficie de adhesión adecuada para la expansión *ex vivo* de las células cardiomiogénicas.

20 – la etapa c) comprende el mantenimiento y la expansión de al menos una de las dos sub-poblaciones de células (células adherentes y células no adherentes en suspensión) por pases sucesivos en medio líquido.

– el medio semisólido se selecciona ventajosamente del grupo que consiste en derivados celulósicos (principalmente, metilcelulosa) y matrices membranales basales reconstituidas que comprenden al menos uno de los compuestos siguientes: colágeno, laminina y proteoglicanos (por ejemplo, Matrigel,).

25 Las células adherentes y las células no adherentes (o en suspensión en el medio líquido) presentan al menos las características siguientes; estos dos tipos celulares son: CD44⁺, CD81⁺, CD31⁻, CD45⁻, c-kit⁻; al menos el 50% de las dos poblaciones son positivas para Sca-1 y troponina T. Estas dos poblaciones son igualmente CD90⁻, Flk1⁻ y MLC2v⁺.

Por lo tanto, estas dos poblaciones expresan CD44⁺ y CD81⁺, pero no expresan CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁻, CD117⁻ (c-kit) y Flk1⁻.

30 Este fenotipo antigénico es muy particular.

Estas dos poblaciones son igualmente positivas para CD29 (células adherentes: 98%; células no adherentes: 89%); este marcador no es sin embargo específico para estas células.

35 La principal diferencia entre los dos tipos celulares es la siguiente: las células adherentes son positivas para CD38 y CD73 y algunas pocas (20%) expresan CD34 y son negativas para CMH2; mientras que las células no adherentes son CMH1⁻.

40 Ventajosamente, la fracción estromal vascular en bruto cultivada en medio semisólido que contiene en particular metilcelulosa, seguido de un trasplante de las agrupaciones contráctiles en medio líquido, tal como el medio BHK21, que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol, permite optimizar significativamente, la transdiferenciación de células de tejido adiposo en células cardiomiogénicas en el cultivo en medio líquido. En efecto, la etapa de cultivo primario en medio semisólido permite una selección eficaz de células cardiomiogénicas de la fracción estromal vascular y proporciona, después de siembra en medio líquido (cultivo secundario), un tapiz celular constituido por las dos morfologías celulares cardiomiogénicas descritas (adherente y en suspensión). Este cultivo puede ser mantenido a largo plazo (varios meses) por pases sucesivos (mecánicos o enzimáticos), en comparación con una siembra directa en el medio líquido BHK21.

45 En estas condiciones, se obtienen sorprendentemente, muy buenos rendimientos en células cardiomiogénicas:

– a partir de células en suspensión: se obtiene el tapiz celular adherente en una placa de cultivo de diámetro variable (por ejemplo, 30 mm de diámetro) y produce una media de 150.000 células cardiomiogénicas cada dos días; estas últimas se vuelven a poner en suspensión en el medio de cultivo, y esto durante todo el tiempo de viabilidad del tapiz celular, que envejece a continuación (~20 días) y disminuye su producción.

50 – a partir de células adherentes: las células flotantes recuperadas y colocadas en una nueva placa de cultivo, se adhieren y vuelven a formar un tapiz adherente en 12 días. A partir de 150.000 células flotantes, 12 días después se tiene un tapiz constituido por una media de 900.000 células adherentes.

De acuerdo con una disposición ventajosa de esta realización (procedimiento 1), la duración del cultivo primario en la etapa a) es de algunos días a algunas semanas, preferiblemente de una a dos semanas.

5 Según otra disposición ventajosa de esta realización (procedimiento 1), previamente al trasplante de las células contráctiles, se efectúa una segunda selección con ayuda de al menos un marcador adecuado; dicho marcador es ventajosamente un marcador positivo (marcador de células cardíacas) y/o un marcador negativo de células cardíacas.

Entre los marcadores positivos de células cardíacas se pueden citar: Sca-1, troponina, MLC2v, CD44, CD81, CD73 y CD38.

10 Entre los marcadores negativos de células cardíacas se pueden citar los marcadores del complejo principal de histocompatibilidad CMH (CMH1 o CMH2), CD31, CD34, CD45, c-kit y Flk1.

15 La etapa tricelular con ayuda de un marcador negativo y/o positivo, realizada después de cultivo sobre un medio semisólido, permite un enriquecimiento espectacular en células cardiomiogénicas. Por ejemplo, para una siembra de 30.000 células CMH1 negativas, procedentes de la SVF en bruto por mL de metilcelulosa, se encuentra una media de 30 agrupaciones de tipo cardíaco; en consecuencia, 1 célula/1500 es el origen de una agrupación contráctil después de 14 días de cultivo.

20 Según otra disposición ventajosa de esta realización (procedimiento 1), el medio líquido de la etapa b) es ventajosamente un medio BHK21 que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol o cualquier otro medio similar que pueda ser utilizado por las células de tipo ES; la composición de dicho medio es principalmente del mismo tipo que la del medio BHK21 en lo que respecta a la composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas.

25 En un segundo modo de realización ventajosa de dicho procedimiento (procedimiento 2), la selección de la etapa a) se efectúa por la etapa tricelular de las células de la SVF en bruto con ayuda de al menos un marcador negativo de células cardíacas, tal como se ha definido anteriormente, y por lo tanto seleccionado principalmente del grupo constituido por los marcadores del complejo principal de histocompatibilidad (CMH1 o CMH2) y CD31, CD34, CD45, c-kit y Flk1. En particular, las células de la SVF capaces de diferenciarse en células cardiomiogénicas son sorprendentemente CMH.

En este caso, la etapa b) comprende el cultivo de las células seleccionadas en un medio líquido BHK21 que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol o cualquier otro medio similar que pueda ser usado por las células de tipo ES, como se ha indicado anteriormente.

30 La etapa tricelular efectuada con el marcador negativo de las células cardíacas y principalmente la tri CMH se realiza a partir de una preparación reciente de la SVF. El rendimiento de células CMH1 negativas obtenidas después de la etapa tricelular es variable según las preparaciones de la SVF y comprende, por ejemplo, 20 a 40% de células CMH1 a partir de la SVF en bruto recientemente preparada.

35 Cualquiera que sea el modo de realización de la etapa a) (procedimiento 1 o procedimiento 2), la etapa c) de mantenimiento y de expansión de las células cardiomiogénicas en cultivos en medio líquido puede ser realizada según una de las dos modalidades siguientes:

40 – centrifugación de las células en suspensión en un medio líquido idéntico o diferente del de la etapa b) y nueva siembra del sedimento celular en el mismo medio líquido; se forma un nuevo tapiz celular y de nuevo se encuentran los dos tipos de morfologías celulares. El cultivo de los dos tipos de morfología puede ser mantenido por tanto a largo plazo;

– rotura enzimática (tipo tripsina) o cualquier otro procedimiento que permita el desprendimiento de las células del tapiz celular adherente, centrifugación de la suspensión celular rota y nueva siembra del sedimento celular en el mismo medio líquido; de modo similar se forma un nuevo tapiz celular y de nuevo se encuentran los dos tipos de morfologías celulares.

45 El cultivo de los dos tipos de morfologías se puede por tanto mantener a largo plazo.

Preferiblemente, el procedimiento según la invención comprende:

– a) un cultivo primario de células de la SVF en un medio semisólido a base de metilcelulosa y selección de las células cardiomiogénicas,

50 – b) un cultivo secundario de las células seleccionadas en a) en un medio líquido BHK21 que contienen al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol y cualquier otro medio cuya composición sea del mismo tipo que la de medio BHK21 en lo que se refiere a la composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas y sobre una superficie de adhesión adecuada para la expansión *ex vivo* de las células cardiomiogénicas,

- c) mantenimiento y expansión de dichas células por pases sucesivos en medio líquido y
- d) obtención de las células cardíacas.

En una variante, las etapas a) y b) se fusionan y se pueden efectuar por cultivo primario de células de la SVF en medio BHK21 y sobre un soporte o de adhesión adecuado, tal como gelatina, proteínas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular.

Conforme con la invención, la fracción estromal vascular en bruto se obtiene, antes de la etapa a) a partir de depósitos de tejido adiposo por:

- aislamiento de la SVF por digestión por enzimas proteolíticas y por separación física, principalmente por combinación de etapas de centrifugación y de filtración y/o diferencia de densidad y

- purificación de las células por separación física (filtración y/o centrifugación) y/o inmunoselección.

Dicha células cardiomiogénicas pueden ser además modificadas genéticamente. Así:

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

Dichas células modificadas genéticamente son preferiblemente de origen humano.

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de células cardíacas susceptibles de ser obtenidas a partir de células de la fracción estromal vascular, en las condiciones expuestas en procedimientos tales como los definidos anteriormente (procedimiento 1 o procedimiento 2), para la preparación de un medicamento apto para reconstituir una zona cardíaca isquémica.

Según un modo de realización ventajosa de dicha utilización, dichas células cardíacas se seleccionan del grupo constituido por:

(i) las células cardiomiogénicas contráctiles adherentes de forme alargada que presentan las características siguientes: CD38⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD81⁺, CD31⁻, CD45⁻, ckit⁻, CD90⁻, Fik1⁻, CMH2⁻, siendo aproximadamente 50% de dichas células Sca-1⁺, troponina T⁺ y MLC2v⁺,

(ii) las células no adherentes de forma redondeada: CD44⁺, CD81⁺, CD31⁻, CD45⁻, CD73⁻, CD90⁻, Fik1⁻, siendo aproximadamente 50% de dichas células Sca-1⁺, troponina T⁺, MLC2v⁺ y CMH1⁻,

expresando los dos tipos de células además el factor de transcripción mesodérmico Brachyury, los factores de transcripción Islet-1 y MEF-2c y el factor de unión transcripcional Oct3/4, o

- (iii) una mezcla de dichas células adherentes y dichas células no adherentes.

Estos dos tipos de células (adherentes y no adherentes) son igualmente CD34⁻.

Los inventores describen una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una mezcla de:

- (i) células cardiomiogénicas adherentes de forma alargada que presentan al menos las características siguientes: CD38⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD81⁺, CD31⁻, CD45⁻, ckit⁻, CMH2⁻, siendo aproximadamente 50% de dichas células Sca-1⁺, troponina T⁺ y MLC2v⁺, y

- (ii) células no adherentes de forma redondeada que presentan al menos las características siguientes: CD44⁺, CD81⁺, CD31⁻, CD45⁻, CD73⁻, CMH1⁻, siendo aproximadamente 50% de dichas células Sca-1⁺, troponina T⁺ y MLC2v⁺, y

expresando los dos tipos de células además el factor de transcripción mesodérmico Brachyury, los factores de transcripción Islet-1 y MEF-2c y el factor de unión transcripcional Oct3/4, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un modo de realización ventajosa de dicha composición, comprende además uno o varios factores cardíacos.

De acuerdo con una disposición ventajosa de este modo de realización, dicha composición comprende además la troponina T y/o quinasa de cadenas ligeras de miosina 2v (abreviadamente MLC2v por la expresión inglesa *Myosin Light Chain Kinase 2v*).

Dicha composición se administra por cualquier vía de administración. En particular, se inyecta ventajosamente *in situ* (inyección directa) con ayuda de jeringas adecuadas o a través de un catéter endoventricular o endocoronario; igualmente se puede inyectar por vía intravenosa o se administra por vía sistémica.

Tratándose de patologías isquémicas, la masa tisular a reconstituir o implantar, es considerable a escala celular (20 a 30 cm³). Sin embargo, en la medida que se trata de células con potencial proliferante (demostrado *in vitro*), las cantidades a inyectar son menores que si se tratara de células diferenciadas.

5 Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención permite la obtención de cantidades importantes de células con potencial cardíaco.

Ahora bien, el infarto de miocardio está asociado a una importante pérdida de cardiomiocitos diferenciados, debido a la isquemia. Esta pérdida no puede ser compensada por la renovación natural de los cardiomiocitos diferenciados en el corazón. Las células obtenidas por el procedimiento de acuerdo con la invención, implantadas en un ambiente isquémico agudo sobreviven y adquieren eficazmente las características de células cardíacas con efectos
10 beneficiosos evitando la remodelación y el deterioro de la función ventricular izquierda.

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

15 – Figura 1: Evolución de la morfología de las células de la SVF cultivadas bajo diferentes condiciones:

– en metilcelulosa en una etapa temprana (D7, parte superior) y más avanzada (D30, parte inferior),

– en medio líquido BHK21 en una etapa temprana (D7, parte superior) y más avanzada (D15, parte inferior)

20 – en metilcelulosa después de BHK21 y después de la selección en una etapa temprana (D7, parte superior) y más avanzada (D15, parte central), dando como resultado una población adherente (parte inferior izquierda) y una población en suspensión (parte inferior derecha) capaz de automantener el cultivo.

– Figura 1B: Porcentaje de células que expresan el marcador cardíaco troponina T en diferentes condiciones de cultivo (parte superior) y evolución del número de células troponina T⁺ en las condiciones de cultivo en metilcelulosa (MC) → BHK21.

25 – Figura 2: Fenotipificación - Clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) de dos poblaciones celulares obtenidas en las condiciones de cultivo MC → BHK21. (A-B) Representación tamaño/granulosidad y marcado con troponina T. (C) Expresión de diferentes marcadores celulares.

– Figura 3: Diferenciación cardíaca *in vitro* de células adherentes: inmunocitoquímica que muestra que las células expresan MLC-2v, titina, α -actinina, β -MHC y troponina T. Las células no expresan α -MHC en esta etapa.

30 – Figura 4: Expresión de genes que codifican factores de transcripción de células madre (Oct3/4, Islet1), células mesodérmicas (Brachyury), células cardíacas (Islet1, MEF2c).

– Figura 5: Presencia de células 7 días después de su injerto en un modelo de m \acute{u} rdo con isquemia de miocardio: la inmunohistoquímica revela la presencia de células GFP escasas (cuando son células de la SVF cultivadas en condiciones convencionales o sólo células adherentes del tapiz celular) o numerosas (adherentes + en suspensión) en las zonas que presentan un infarto.

35 – Figura 6: Identificación por inmunohistoquímica de múltiples sitios donde se encuentran las células 7 días después de su injerto. (a) reconstitución de una zona injertada con numerosas células GFP. (b, c) marcaje específico con GFP de células encontradas en el infarto, así como las zonas flanqueantes en comparación con el control isotípico (b', c').

40 – Figura 7: Diferenciación cardíaca *in vivo*: Inmunohistoquímica confocal que muestra que las células injertadas GFP⁺ también expresan MLC2v con la co-expresión visualizada en la imagen "superpuesta", en contraste con el tejido sano que no expresa más que la proteína cardíaca (MLC2v) (véanse las flechas). Más precisamente: En la parte superior: La Inmunohistoquímica para la presencia de GFP (flechas, figura de la izquierda) frente al control isotípico (figura de la derecha). Partes central e inferior: Inmunofluorescencia en microscopía confocal utilizando anticuerpos anti-MLC2v y anti-GFP. La figura superpuesta muestra la presencia de miocitos cardíacos y de células
45 que co-expresan las proteínas GFP y MLC2v (color gris claro).

– Figura 8: Diferenciación cardíaca *in vivo*: inmunohistoquímica en cortes seriados que muestran que en la misma zona se co-localizan las células que expresan GFP (parte izquierda) y el marcador cardíaco troponina T (parte derecha).

– Figura 9: Frecuencia de aparición de clones cardiomiogénicos en metilcelulosa.

– Figura 10: PCR cuantitativa para determinar el injerto de células GFP *in vivo*. Porcentaje de células adherentes y no adherentes que expresan GFP, implantadas en el corazón del receptor de control (animal sacrificado inmediatamente después de la inyección) y 7 días después en un modelo agudo de infarto de miocardio.

5 – Figura 11: Análisis funcional por ecocardiografía. A: Evolución de volúmenes telesistólicos (LVESV, parte superior), volúmenes telediastólicos (LVEDV, parte central) y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF, parte inferior) 0, 7 y 28 días después de la inyección de las células o del medio. B: Comparación de las variaciones de los valores funcionales entre el día 0 y el día 28.

Sin embargo, debe quedar bien entendido que estos ejemplos se dan únicamente como ilustración del objeto de la invención, y de ningún modo constituyen una limitación.

10 **Ejemplo 1: Materiales y métodos.**

1) Animales y muestras de tejidos

Ratones C57B1/6 machos de 8 semanas (Harlan, Francia) y ratones machos GFP son criados en un ambiente controlado (ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 21°C) con acceso libre a agua y a dieta estándar.

Todos los procedimientos se realizan de acuerdo con la Directiva CEE/Nº 07430.

15 Después de los experimentos, los ratones se sacrifican por dislocación cervical con anestesia de CO₂.

El tejido adiposo se extrae rápidamente y se trata para los análisis posteriores.

2) Aislamiento de células del tejido adiposo.

Procedimiento 1:

20 Las células se aíslan del tejido adiposo de ratones de 5 a 8 semanas, globalmente de acuerdo con el procedimiento descrito por Bjöntorp et al., 1978, con modificaciones menores. El tejido adiposo extraído se disecciona bajo microscopio en placas estériles que contienen PBS con el fin de eliminar todas las trazas de tejido muscular y luego se digiere a 37°C durante 30 minutos, en el medio de la digestión que contiene DMEM F12-OK, 2% de BSA (seroalbúmina bovina) y 2 mg/mL de colagenasa (referencia Sigma) a razón de 10 mL de medio de digestión por 3 g de tejido. El medio DMEM F12-OK comprende para 500 mL de DMEM F12 (referencia Gibco 31330 038), 5 mL de ASP (solución lista para su uso de antibióticos + antifúngicos: anfotericina 0,25 µg/mL, estreptomycin 100 µg/mL, penicilina G 100 µg/mL) (referencia SIGMA A7292), biotina 0,016 mM (referencia Sigma B4639), ácido pantoténico 0,018 mM (referencia Sigma P5155) y ácido ascórbico 100 µM (referencia Sigma A4034). Después de la eliminación de los fragmentos no digeridos por filtración (filtro de 25 µm), los adipocitos maduros se separan del sedimento que contiene las células de la SVF por centrifugación (600 g, 10 min). Las células del estroma vascular así aisladas se vuelven a poner en suspensión en medio de cultivo DMEM-F12 y se cuentan (recuento manual en celda hematimétrica o contador de partículas Coulter).

Procedimiento 2:

35 Las células se aíslan del tejido adiposo de ratones de 3 semanas y se procede como se describe en el Procedimiento 1 usando 10 mL de medio de digestión por 1 g de tejido adiposo. Las condiciones de digestión son idénticas a las del Procedimiento 1, el medio de digestión es diferente. Contiene Hepes 6,7 mM, NaCl 3 mM, KCl 0,025 mM, CaCl₂ 0,078 mM, 4,5 mg/mL de glucosa, BSA al 1,5% suplementado con 1 mg/mL de colagenasa. Como variante, el medio de digestión es un tampón PBS que contiene 2% de BSA y 2 mg/mL de colagenasa (utilizado en particular para el tejido adiposo pardo interescapular extraído de ratón transgénico GFP). Después de la eliminación de los fragmentos no digeridos por filtración (filtro de 25 µm), los adipocitos maduros se separan del sedimento que contiene las células de la SVF por centrifugación (1000 g, 10 min).

Las células del estroma vascular así aisladas se vuelven a poner en suspensión en el medio de cultivo DMEM-F12 y se realiza una nueva centrifugación (1000 g, 10 min). Las células se vuelven a poner en suspensión en medio de cultivo y se cuentan como anteriormente.

3) Cultivo en medio a base de metilcelulosa

45 Las células de la SVF aisladas (fracción SVF en bruto recién preparada) como se describe en 2), se cultivan (30.000 células/mL) en un medio a base de metilcelulosa (Methocult GFM3534, StemCell Technologies, Vancouver) y se mantienen en cultivo durante dos semanas, durante las cuales se vigila la morfología de los clones (o agrupaciones) obtenidos.

Los clones contráctiles se identifican, recogen y lavan en PBS.

50 Después de una breve centrifugación (5 min, 600 g) se prepara una suspensión celular para su uso posterior.

4) Procedimiento de cultivo de los clones contráctiles

5 Un extracto en bruto de células de la SVF (32.000 células/cm²) o clones tomados del medio a base de metilcelulosa (1.500 células/cm²) se siembran en placas de 30 mm (Greiner Bio-One) recubiertos de gelatina al 0,1% y se cultivan en un medio BHK21 (Gibco BRL), - cuya composición precisa se proporciona en las Tablas I y II siguientes, - que contiene 10% de suero de ternera fetal (StemCell Technologies) y suplementado con β-mercaptoetanol 10⁻⁴ M (Sigma), glutamina 2 mM (Gibco BRL), piruvato 1 mM (Gibco BRL), aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco BRL) y una solución que contiene 0,25 µg/mL de anfotericina, 100 U/mL de penicilina G y 100 µg/mL de estreptomina (Sigma, solución en APS).

10 Igualmente se puede usar cualquier otro medio similar al medio BHK21 que pueda ser utilizado para las células de tipo ES. La composición de dicho medio es principalmente del mismo tipo que la del medio BHK21 con respecto a la composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas.

La expansión celular se realiza por recogida de las células en suspensión en el medio de cultivo cada tres días. Después de centrifugación (600 g, 5 min), las células se vuelven a sembrar en placas de cultivo de 30 mm de diámetro recubiertas de gelatina al 0,1% y se cultivan en un medio BHK21.

15 5) Cultivo de células de control

Las células de la SVF en bruto recién preparada se siembran en el medio DMEM-F12, cuya composición precisa se proporciona en la Tabla III, suplementado con 10% de suero de ternera recién nacida a una densidad de 30.000 células/cm². Estas células se conocen como células estromales derivadas de tejido adiposo (abreviadamente ADSC por la expresión inglesa *Adipose-Derived Stromal Cells*).

20 Para los experimentos de control, estas células se tratan adicionalmente de la siguiente manera: Después de 6 horas de cultivo, las células no adherentes se eliminan por lavado y las células adherentes se mantienen en cultivo durante seis días hasta fenotipificación o injerto (para la expansión). Las células subconfluentes se recogen por tripsinización 5 minutos a 37°C y constituyen la fracción de células adherentes de la SVF. Estas células se trasplantan a ratones.

25

Tabla I

Composición del medio de cultivo líquido BHK21	
Ref. Componentes	21710 (o cualquier medio susceptible de ser utilizado para
Sales inorgánicas:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	265,00
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,10
KCl	400,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00
NaCl	6400,00
NaHCO ₃	2750,00
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	141,00
Aminoácidos:	
L-arginina . HCl	42,00
L-cistina	24,00
L-glutamina	292,00
L-histidina.HCl.H ₂ O	21,00
L-isoleucina	52,00
L-leucina	52,00
L-lisina.HCl	73,00
L-metionina	15,00
L-fenilalanina	33,00
L-treonina	47,60
L-triptófano	8,00
L-tirosina	36,20
L-valina	46,80
Aminoácidos no esenciales (Véase Tabla II)	
	5 mL, 10 mM/500 mL
Vitaminas :	
Pantotenato de calcio D	2,00
Cloruro de colina	2,00
Ácido fólico	2,00
i-inositol	3,60
Nicotinamida	2,00
Piridoxal.HCl	2,00
Riboflavina	0,20
Tiamina.HCl	2,00

Otros componentes:	
D-Glucosa	4500,00
Rojo de fenol	15,00
L-glutamina	5 mL, 200 mM/500 mL
β -mercaptoetanol	10^{-4} M final
Piruvato	5 ml, 100 mM/500 mL
Antibióticos + antimicóticos (anfotericina, estreptomicina, penicilina) (ASP, Sigma A7292)	1%
Suero ES 10% (células madre)	10%

Tabla II

Aminoácidos no esenciales	
Ref.	11140
Componentes	100X líquido g/L
Aminoácidos	
L-alanina	890,00
L-asparagina	1320,00
L-ácido aspártico	1330,00
L-ácido glutámico	1470,00
Glicina	750,00
L-prolina	1150,00
L-serina	1050,00

Tabla III

Composición del medio de cultivo líquido DMEM-F12	
Compuestos	Concentración (mg/L)
Aminoácidos:	
Glicina	18,75
L-alanina	4,45
Hidrocloruro de L-arginina	147,5
L-Asparagina.H ₂ O	7,5
Ácido L-aspártico	6,65

ES 2 613 930 T3

Composición del medio de cultivo líquido DMEM-F12	
Compuestos	Concentración (mg/L)
Aminoácidos:	
Hidrocloruro de L-cisteina.H ₂ O	17,56
L-cistina.2HCl	31,29
Ácido L-glutámico	7,35
Hidrocloruro de L-histidina.H ₂ O	31,48
L-isoleucina	54,47
L-leucina	59,05
Hidrocloruro de L-lisina	91,25
L-metionina	17,24
L-fenilalanina	35,48
L-prolina	17,25
L-serina	26,25
L-treonina	53,45
L-triptófano	9,02
Sal deshidratada disódica de L-tirosina	55,79
L-valina	52,85
Vitaminas:	
Fosfato de ácido ascórbico	2,5
Biotina	0,0035
Cloruro de colina	8,98
Pantotenato de calcio D	2,24
Ácido fólico	2,65
i-inositol	12,6
Niacinamida	2,02
Hidrocloruro de piridoxina	2

Composición del medio de cultivo líquido DMEM-F12	
Compuestos	Concentración (mg/L)
Aminoácidos:	
Riboflavina	0,219
Hidrocloruro de tiamina	2,17
Vitamina B12	0,68
Sales inorgánicas :	
Cloruro de calcio (CaCl ₂) (anhidro)	116,6
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,0013
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O)	0,05
Sulfato férrico (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,417
Cloruro de magnesio (anhidro)	28,64
Otros componentes	
Biotina (Sigma B4639)	16 µM
Ácido ascórbico (Sigma A4034)	100 µM
Ácido pantoténico (Sigma P5155)	18 µM
Antibióticos + antimicóticos (anfotericina-estreptomicina-penicilina) (Sigma A7292)	1 %
Suero de ternera recién nacida	10%

6) Caracterización fenotípica

5 Las células se marcan en tampón de PBS que contiene 0,2% de suero de ternera fetal y se incuban con anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína de clorofila peridina (PerCP) o alofocianina (APC) durante 30 minutos a 4°C.

Después de lavados, las células se analizan por el tipo de citometría de flujo denominado clasificación de células activada por fluorescencia (abreviadamente FACS por la expresión inglesa *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) (FACS) Calibur, Becton Dickinson, Mountain View, California). La adquisición y análisis de los datos se realizan utilizando el programa informático Cell Quest (Becton Dickinson).

10 Todos los anticuerpos (CD34, CD31, CD38, CD44, CD45, CD73, CD81, CD90, CD117, Sca-1 y Flk1) son de BD Biosciences (Heidelberg, Alemania).

Para el marcaje intracelular, después de una fijación con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a 4°C, las células se permeabilizan con tampón de PBS que contiene 1% de BSA y 0,5% de saponina (Sigma) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, después del marcaje con anticuerpos anti-troponina T (Microm Microtech, clon 13-11) se utiliza un anticuerpo PerCP anti-ratón (BD Biosciences).

7) Inmunocitoquímica

5 Las células adherentes, cultivadas en portaobjetos se lavan con PBS, después se fijan durante una noche a 4°C en una mezcla de paraformaldehído al 3,7%/tampón de PBS, o se enfrían a -20°C en una mezcla metanol-acetona (50/50).

10 Después de bloquear los sitios no específicos durante 1 hora en tampón de PBS que contiene 1% de BSA, las células se incuban durante 1 hora en una mezcla de Triton X-100 al 0,3%/Tampón de PBS con un anticuerpo primario: anticuerpos de ratones dirigidos contra MLC2v (1:2, Biocytex, Francia), contra α -actinina sarcomérica (1:500, Sigma), contra anti- β -MHC (1:X), contra anti- α -MHC, contra titina (1:X) o contra troponina T (1:100, Microm Microtech) o anti-anticuerpos de conejo anti-conexina 43 (1:X, Zymed Laboratories).

Después del lavado, se añade un anticuerpo secundario y la incubación es de 60 minutos a temperatura ambiente: Alexa 546 o Alexa 350 conjugado con IgG anti-ratón o anti-conejo (Molecular Probes Eugene, OR, dilución 1:300).

15 Los controles negativos (sin coloración) se realizan con IgG de ratón purificadas (Dako X0931) o IgG de conejo purificadas (Dako X0903) y no producen coloración.

8) Extracción del ARN y análisis por PCR cuantitativa en tiempo real.

20 Preferiblemente, la cuantificación se lleva a cabo en tiempo real, es decir que la detección y cuantificación de la señal emitida por la sonda, principalmente la emisión de fluorescencia, se realizan durante el proceso de amplificación, en la medida en la que el aumento de la señal es directamente proporcional a la cantidad de amplicones producidos durante la reacción.

25 Los principios generales de la PCR y la RT-PCR cuantitativas en tiempo real, así como las diferentes técnicas de detección cuantitativa de los amplicones con ayuda de sondas fluorescentes, a saber: hidrólisis de sondas por la actividad 5'-nucleasa de la ADN-polimerasa (TaqMan™), hibridación de 2 sondas (Hybprobes), balizas moleculares (Molecular Beacons) y cebadores *Scorpion* son conocidos para los expertos en la técnica y se describen en particular en la publicación de Poitras et al., *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2002, 2, 1-11. La PCR y la RT-PCR cuantitativas en tiempo-real con ayuda de sondas del tipo TaqMan™ están descritas en particular por Heid C. et al., (*Genome Research*, 1996, 6, 986-994) y Gibson U. et al., (*Genome Research*, 1996, 6, 995-1001) respectivamente.

30 Cada una de las sondas se marca, al menos en un extremo, con un fluorocromo diferente. Preferiblemente, el extremo 5' se marca con un fluorocromo emisor (*reporter*) y el extremo 3' con un fluorocromo supresor (*quencher*).

Ventajosamente, uno de los extremos, preferiblemente el extremo 3' de cada una de las sondas se marca también con un grupo MGB (*Minor Groove Binder*), que permite aumentar artificialmente la temperatura de hibridación de cada una de las sondas y reducir de este modo su longitud.

35 Los fluorocromos emisores útiles para la detección cuantitativa son conocidos por los expertos en la técnica, se trata principalmente de: 6-FAM (6-carboxifluoresceína), TET (tetracloro-6-carboxifluoresceína), HEX (hexacloro-6-fluoresceína), isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, cianina (CY3, CY5) y rojo Texas (*Texas Red*).

De manera similar, los fluorocromos supresores son conocidos por los expertos en la técnica; se trata principalmente de: rojo de metilo y TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).

40 Más precisamente, el ARN total de las células identificadas como contráctiles en el cultivo y el ARN del corazón de ratón se aíslan con ayuda de un kit de extracción del ARN (RNeasy, Quiagen, Francia).

Se transcribe 1 μ g de ARN a ADN con ayuda de la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, Cergy, Francia) y se utiliza en la PCR en tiempo real.

]Las secuencias de los cebadores de la PCR son las siguientes:

MEF2C

sentido : 5'-AGATACCCACAACACACCACGCGCC-3' (SEQ ID NO:1)

antisentido: 5'-ATCCTTCAGAGAGTTCGCATGCGCTT-3' (SEQ ID NO:2)

Oct-3/4

sentido : 5'-TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG-3' (SEQ ID NO:3)

antisentido: 5'-TGACGGGAACAGAGGGAAAG-3' (SEQ ID NO:4)

Brachyury

sentido : 5'-GACTTCGTGACGGCTGACAA-3' (SEQ ID NO:5)

antisentido: 5'-CGAGTCTGGGTGGATGTAG-3' (SEQ ID NO:6)

Islet1

sentido : 5' -CATCGAGTGTTTCCGCTGTGTAG-3' (SEQ ID NO:7)

antisentido: 5'-GTGGTCTTCTCCGGCTGCTTGTGG-3' (SEQ ID NO:8)

La PCR en tiempo real se realiza utilizando un termociclador *LightCycler Rapide* (Roche, Meylan, Francia). La amplificación se lleva a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

- 5 Se añaden 12 µL de una mezcla de reacción que contiene 10 µL de una mezcla de *LightCycler-DNA Master SYBR green I* (Fast Start Kit que comprende *Taq*ADN-polimerasa, tampón de reacción, mezcla de desoxinucleósidos y colorante SYBR Green) a MgCl₂ 3 mM, 0,5 µM de una mezcla de cebadores apropiados y 2 µL de ADNc.

Los resultados se expresan en función de la tasa de expresión del gen de interés, utilizando un modelo matemático previamente descrito (Pfaffl et al., *Nucleic Acids Res.* 2002, **30**, 9, e36).

Los datos se normalizan por análisis de PCR de α-tubulina (patrón interno).

- 10 El protocolo de amplificación incluye una desnaturalización inicial a 95°C durante 8 minutos, seguido de 40 ciclos que comprenden una etapa de desnaturalización a 95°C durante 3 segundos, una etapa de hibridación a 65°C durante 10 segundos y una etapa de prolongación a 72°C durante 10 segundos.

La tasa de transición de temperatura es 20°C/s.

La fluorescencia se mide al final de cada etapa de prolongación.

- 15 Después de la amplificación se traza una curva de fusión calentando el producto a 20°C/s hasta 95°C, enfriando a 20°C/s hasta 70°C, y manteniendo los 70°C durante 20 segundos y luego calentando lentamente a 0,1°C/s hasta 95°C.

La fluorescencia se mide durante la fase de calentamiento lento.

- 20 Las curvas de fusión se utilizan para determinar la especificidad de los productos de PCR, que se confirma por electroforesis en gel.

La prueba *t* de Student se utiliza para analizar la significación estadística. Todos los valores de P corresponden a pruebas efectuadas por duplicado y los valores de P<0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

El análisis por PCR también se puede realizar a partir del ADN.

El ADN del corazón de ratón se aísla utilizando el kit de extracción QIAmp® DNA mini kit (QIAGEN).

- 25 Las concentraciones de ADN se miden con el sistema Nanodrop ND100.

La pureza del ADN se comprueba por medidas de la absorbancia a 260 y 280 nm.

La PCR en tiempo real se realiza con el termociclador AB17000 (Applied Biosystems) para cuantificar las células injertadas en el corazón de ratón. Cada medio de reacción (25 µL) contiene entre 1 y 3 ng de ADN genómico, 0,3 µM de cada cebador y 2,5 µL de una mezcla 2x *SYBR Green master mix* (Applied Biosystem).

- 30 Los datos se normalizan para análisis por PCR del gen 36B4 (fosfoproteína PO ribosoma ácido). Las secuencias de nucleótidos de los cebadores de la PCR son los siguientes:

- GFP

sentido : GGGCACAAGCTGGAGTACAAC (SEQ ID NO:9)

antisentido : TCACCTTGATGCCGTTCTTCT (SEQ ID NO:10)

- 36B4

sentido : AGTCGGAGGAATCAGATGAGGAT (SEQ ID NO:11)

antisentido : GGCTGACTTGGTTGCTTTGG (SEQ ID NO:12)

5 El protocolo de amplificación comprende una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos que comprenden una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una etapa de prolongación a 60°C durante 1 minuto. Para confirmar la ausencia de amplificación no específica, se genera una curva de disociación desde 60°C a 95°C.

La curva estándar para cuantificar los genes GFP y 36B4 en el corazón del ratón injertado se realiza mezclando el ADN de GFP del ratón donante con ADN de C57B1/6N del ratón injertado.

9) Modelo infarto de miocardio

10 Se utilizan ratones hembras C57 B1/6N de 8 a 12 semanas (22 a 28 g). Como son muy próximos genéticamente los ratones GFP donante [ratones transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (abreviadamente GFP por la expresión inglesa *Green Fluorescent Protein*)] (Okabe M. et al., *FEBS Lett.*, 1997, 407, 3, 313-319) no es necesario un tratamiento inmunosupresor.

Después de una inyección intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg) y xilasina (7,5 mg/kg), los ratones se someten a una intubación traqueal para permitir la ventilación (ventilador Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Alemania).

15 Se mantiene una anestesia gaseosa con isoflurano o halotano al 2%.

La intervención quirúrgica se realiza bajo aumento óptico (4 y 8 aumentos).

20 Después de una toracotomía izquierda hasta el quinto espacio intercostal, se abre el pericardio y la arteria descendente izquierda se liga con un hilo de polipropileno 8/0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Bruselas). Inmediatamente después, un volumen total de 10 µL que contienen 1.10⁵ células se inyecta en 3 puntos de la zona isquémica (zona pálida, aguas abajo de la ligadura) con una jeringa Hamilton N° 701 (Reno, Nevada).

Se cierra el tórax y se reaniman los ratones.

Para los estudios ecocardiográficos funcionales, se ha modificado ligeramente el modelo de infarto de miocardio agudo.

25 Para obtener los datos antes (punto de comparación) y 3 días después del infarto de miocardio, se utiliza un modelo sub-agudo.

Las inyecciones de las células o de medio (grupo de control) se realizan 3 días después de la ligadura de la arteria coronaria, con ayuda del mismo método intercostal. Se realiza una ecografía de control antes de la generación del infarto y se le da el valor basal (línea base). Luego se realiza una ecografía 3 días después del infarto y corresponde al día cero (D0 en los dibujos). A continuación se realiza la inyección de células de la invención o de medio.

30 Todos los tipos de células analizadas se inyectan en la misma cantidad (10⁵) y se vuelven a poner en suspensión en el mismo volumen (10 µL).

10) Inmunohistoquímica

35 Los ratones se sacrifican por dislocación cervical bajo anestesia de CO₂. Los corazones se extraen rápidamente, los días 7, 14 y 28, se cortan longitudinalmente a lo largo del eje central y se fijan una noche a 4°C en paraformaldehído al 3,7% o 4%. El tejido se incrusta en parafina y se corta en secciones de 6 µm.

40 Para la inmunohistología, las secciones de tejido se desparafinan durante 15 minutos y se rehidratan en alcohol. La actividad de peroxidasa endógena se inhibe por incubación en peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos y después 2 lavados de 5 minutos en PBS. Estas secciones se incuban a continuación durante 30 minutos en BSA al 1% en PBS, y luego con un anticuerpo primario: anticuerpo anti-GFP de conejo (1:300, Molecular Probe A11122) y/o anticuerpo anti-MLC-2v de ratón (1:2) o anticuerpo anti-troponina T de ratón (1:100). En cuanto a estos últimos anticuerpos, es necesaria antes del marcaje una incubación en un tampón de citrato a 95°C durante 25 minutos. Después de lavados, se utilizan los siguientes anticuerpos secundarios: anticuerpos FITC anti-conejo de cabra (1:500, Jackson), anticuerpos Rojo Texas anti-ratón de asno (1:100, Jackson), anticuerpos HRP anti-conejo de asno

(1:500, Jackson) o anticuerpos HRP anti-ratón de asno (1:500, Jackson). Para los anticuerpos HRP secundarios, el marcaje en las secciones se revela por AEC (Dako) y se visualizan con un microscopio inverso (Leica, TMRB), el análisis de la fluorescencia se realiza con un microscopio confocal (Zeiss LSM 510).

11) Evaluación funcional por ecocardiografía

- 5 La evaluación funcional ecocardiográfica se realiza en los dos grupos, antes de infarto de miocardio (punto de comparación), inmediatamente antes de la inyección (día 0 (D0), 3 días después del infarto de miocardio), 1 semana (día 7 (D7)) y 4 semanas (día 28, (D28)) después de la inyección.

10 Todos los análisis ecocardiográficos se realizan bajo anestesia gaseosa. Las evaluaciones ecográficas se realizan con el sistema ecocardiográfico VIVID 7 (General Electric) equipado con un transductor con matriz lineal de 14 MHz (Agilent; Andover, MA), lo que permite obtener una sección transversal del ventrículo izquierdo. Las telesístoles y las telediástoles se definen como las fases en las que la superficie del ventrículo izquierdo es más pequeña o más grande, respectivamente.

15 El diámetro del ventrículo izquierdo en telesístole (*Left-Ventricular End-Systolic Diameter* o LVESD) y el diámetro del ventrículo izquierdo en telediástole (*Left-Ventricular End-Diastolic Diameter* o LVEDD) se miden en el músculo papilar en el modo M de rastreo del ventrículo izquierdo con una velocidad de barrido de 200 mm/s.

Igualmente se miden en 2-D otros parámetros cardíacos.

La fracción de eyección (abreviadamente EF por la expresión inglesa *Ejection Fraction*) se mide por la superficie en un solo plano y se calcula usando la fórmula siguiente:

$$20 \quad EF (\%) = [(0.85 LVAD^2/LVLD)-(0.85 LVAS^2/LVLS)]/(0.85 LVAD^2/LVLD) \times 100,$$

25 en donde LVAD corresponde a la superficie telediastólica del ventrículo izquierdo (la abreviatura LVAD corresponde a la expresión inglesa *Left Ventricular Area in end-Diastole*); LVAS corresponde a la superficie telesistólica del ventrículo izquierdo; LVLD corresponde al espesor del ventrículo izquierdo en telediástole a largo de un eje longitudinal (la abreviatura LVLD corresponde a la expresión inglesa *Left Ventricular Long-Axis Length in end-Diastole*) y LVLS corresponde al espesor del ventrículo izquierdo en telesístole a lo largo de un eje longitudinal.

Cada valor es la media de tres mediciones.

Todos los datos se expresan en los valores medios \pm error típico de la media (ETM).

30 Se utiliza la prueba *t* de Student para analizar la significación estadística. Todos los valores de P corresponden a pruebas *t* pareadas realizadas para cada grupo regular y a pruebas *t* desapareadas para la comparación de los grupos.

Todos los valores de $P < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Ejemplo 2: Diferenciación de las células de la SVF en células de tipo cardíaco

2.1. Medios estándares

35 El medio líquido estándar DMEM-F12 que contiene 10% de suero de ternera recién nacida o medio BHK21 que contiene 10% de suero de ternera fetal, utilizados convencionalmente para el cultivo de células madre pluripotentes, se ensayaron en comparación con metilcelulosa (control positivo; Figura 1A).

Cualquiera que sean los elementos añadidos (IL3, IL6, SCF, BMP2, TGF- β además o no de una exposición a 5-azacitidina), el medio DMEM-F12 nunca permite obtener una diferenciación de las células de la SVF en células cardíacas de una manera eficaz.

40 2.2. Condiciones de la invención

2.2.1

45 Cuando las células de la SVF en bruto se siembran y cultivan en un medio BHK21 que contiene 10% de suero de ternera fetal y sobre un soporte o superficie de adhesión adecuado (gelatina), alrededor del 10% de las células presentan un fenotipo cardíaco estimado por la contracción espontánea de las células y la expresión de troponina T (Figura 1B). La eliminación de β -mercaptoetanol conduce a la ausencia de aparición de agrupaciones de células cardíacas, pero la adición de este compuesto a otros medios de cultivo clásicos jamás induce una diferenciación cardíaca, lo que sugiere que el β -mercaptoetanol es necesario pero no suficiente para implicar a las células de la SVF en una diferenciación cardíaca, siendo también importante el medio BHK21.

50 La frecuencia de obtención de agrupaciones con fenotipo cardíaco en estas condiciones de cultivo es variable, pero sin embargo permite obtener suficientes células cardíacas para su trasplante.

2.2.2

– cultivo primario en un medio a base de metilcelulosa (véase ejemplo 1.3) hasta la aparición de clones contráctiles (aproximadamente 2 semanas)

5 – selección de células contráctiles por disección bajo microscopio inverso (selección tanto de células alargadas como de células redondeadas)

– cultivo de los clones seleccionados en un medio líquido BHK21, que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol, en las condiciones descritas en el Ejemplo 1.4), es decir, por siembra en placas recubiertas de gelatina y adición de medio BHK21.

10 En las 48 horas siguientes después de cultivo en el medio líquido BHK21, se observan algunas fibras alargadas y contráctiles.

Dos semanas más tarde, alrededor del 60% de de las células son troponina T⁺ (Figura 1B).

En esta etapa, el cultivo contiene dos tipos morfológicos distintos de células: las fibras contráctiles que se adhieren y células redondeadas unidas a dichas fibras, pero principalmente presentes en suspensión no adherentes.

15 Las células redondeadas no adherentes están poco unidas y pueden ser recuperadas por recogida y centrifugación del medio de cultivo.

Las células redondeadas pueden ser sembradas de nuevo en BHK21 líquido; se obtendrá de nuevo, después de algunos días, los dos tipos de morfologías (fibras y células redondeadas). Un examen cuidadoso del cultivo derivado de las células redondeadas re-sembradas en medio BHK21 líquido muestra una alta expresión de troponina T (60-70%) correlacionada con una baja expresión de CD90 (3-9%).

20 Por el contrario, las células que expresan fuertemente CD90 (60%) presentaron un débil potencial cardíaco en cultivo (30% de troponina T⁺ o menos). Esta observación se correlaciona con la presencia de una subpoblación de pequeñas células fibroblásticas que se desarrollan en el medio de cultivo en lugar de las células alargadas en forma de fibras y contráctiles.

25 El cultivo a partir de las células redondeadas en suspensión se obtuvo después de más de 10 pases (n = 3); sin embargo, las células seleccionadas para una caracterización o un injerto en ratones se obtienen preferiblemente después de 1 a 4 pases.

Un cultivo a largo plazo de las células redondeadas (más de 15 pases, n = 3) muestra que estas células tienen una morfología estable.

30 La población de células adherentes se puede recoger por un tratamiento con tripsina después de un lavado meticuloso para eliminar la mayor parte de las células redondeadas que permanecen en suspensión.

Para evitar el uso de tripsina, es por tanto posible obtener una buena expansión de las células recuperar y volver a sembrar las células en suspensión en el medio de cultivo (células redondeadas).

35 Con dicho procedimiento, se pueden obtener en 4 semanas $2 \cdot 10^8$ células adherentes troponina T positivas y $1,5 \cdot 10^7$ células no adherentes, a partir de un gramo de tejido graso (20×10^6 células de la SVF en bruto) sin el uso de tripsina. Esto permite una expansión extraordinaria. Sembradas 200.000 células por placa de 30 mm (200.000/P30), estas células no adherentes redondeadas se convierten en ocho días en una capa confluyente de 10^6 células con 60% de células troponina T positivas.

Al mismo tiempo, cada placa produce 150.000 células redondeadas en suspensión cada dos días durante 10-15 días, durante 4-6 semanas, es decir al menos hasta que envejece la capa adherente.

40 **2.3. Estudios comparativos**

– cultivo de células de la SVF únicamente en medio DMEM-F12:

45 No se obtienen o se obtienen muy pocas células cardiogénicas. Las células se pierden en el primer cambio de medio (15 minutos a 4 horas después de la siembra) porque en estas condiciones no se adhieren o muy poco al frasco de cultivo. Si se recoge el medio de cultivo que contiene las células que quedan en suspensión, entonces se pueden recuperar allí las células cardiogénicas reveladas por el cultivo en metilcelulosa.

La Figure 9 ilustra la frecuencia de aparición de clones cardiogénicos en metilcelulosa.

– cultivo de células de la SVF únicamente en medio BHK21:

Se observa la presencia de células cardiogénicas.

En estas condiciones las células se adhieren al soporte de cultivo celular y es posible el cultivo de células cardiogénicas. Pero otras células (no cardiogénicas) se adhieren y se desarrollan también, siendo el cultivo por tanto heterogéneo.

5 **Ejemplo 3: Características fenotípicas de las poblaciones de células adherentes y no adherentes: datos *in vitro***

Los fenotipos celulares se resumen en la Figura 2. Se observa que los dos tipos celulares presentan las siguientes características fenotípicas: CD44⁺, CD81⁺, CD31⁻, CD45⁻, CD90⁻, ckit⁻, Flk1⁻ y al menos el 50% son positivas para Sca-1, troponina T y MLC-2v.

10 La principal diferencia entre los dos tipos celulares es que las células adherentes son positivas para CD38 y CD73 (74%) y algunas (20%) expresan CD34 y son negativas para CMH2, mientras que este no es el caso de las células no adherentes que son CMH1⁻.

Una elevada expresión de troponina T está inversamente correlacionada con una baja expresión de CD90 (3-9%).

La Tabla IV siguiente resume estas características.

Tabla IV : Características fenotípicas de las células adherentes y no adherentes

	Células adherentes (forma alargada)	Células en suspensión (forma redondeada)
CD31	-	-
CD34	+/-	-
CD38	+	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD62		-
CD73	+	Heterogénea/-
CD81	+	+
CD90	Heterogénea/-	Heterogénea/-
c-kit	-	-
MLC2v	+	+ (50%)
CMH1	+ (25-30%)	-
CMH2	-	Heterogénea
Sca-1	+ (50%)	+ (50%)
Troponina T	+ (50%)	+ (50%)
Flk1	-	-
Expresión de :		
Brachyury	+	+
Islet-1	+	+

	Células adherentes (forma alargada)	Células en suspensión (forma redondeada)
MEF-2c	+	+
Oct3/4	+	+

5 La PCR cuantitativa en tiempo real revela que las dos poblaciones expresan el factor de transcripción mesodérmico Brachyury, los factores de transcripción cardíacos Islet-1 y MEF-2c, así como Oct3/4, un factor de unión transcripcional presente en las células no diferenciadas que tiene un alto potencial proliferante (Figura 4). Para todos los transcritos, la tasa de expresión es mayor en células adherentes en comparación con células no adherentes.

Una identificación concomitante de estos marcadores revela la presencia de células inmaduras y una heterogeneidad en las tasas de diferenciación de estas poblaciones.

10 La expresión de proteínas en función de la diferenciación cardíaca se analiza por inmunohistoquímica en las fibras adherentes (Figura 4) y muestra la presencia de proteínas cardíacas, tales como MLC-2v, titina, β -MHC, α -actinina sarcomérica, troponina T, incluso si las células no expresan α -MHC.

Estos datos *in vitro* muestran que el procedimiento según la invención permite obtener cantidades significativas de células cardiomiogénicas a partir de tejido adiposo. Las células cultivadas presentan dos fenotipos distintos que, sin embargo, están asociados en el cultivo.

15 La comparación del número de células cardiomiogénicas obtenidas con el procedimiento según la invención con el número de células obtenidas con el procedimiento que se describe en la solicitud de patente internacional PCT WO 02/055678 se muestra en la Tabla V a continuación. Estos datos se obtienen a partir de 1 g de tejido adiposo (20×10^6 células de la SVF).

Tabla V

Solicitud de patente internacional PCT WO 02/055678	Invención
Cultivo en metilcelulosa	Cultivo en metilcelulosa + medio BHK21
→14286 clones en 1 mes, es decir $7 \cdot 10^6$ a $14 \cdot 10^6$ células cardiogénicas en 1 mes. Estas células se pueden mantener en medio DMEM (sin expansión)	→ $2 \cdot 10^8$ células cardiogénicas adherentes en 1 mes y $1,5 \cdot 10^7$ células cardiogénicas no adherentes. Expansión posible principalmente por trasplante de células no adherentes en medio líquido (numerosos pases): en 8 días, $1,5 \cdot 10^7$ células no adherentes dan $7,5 \cdot 10^7$ células adherentes que producen por sí mismas $1,1 \cdot 10^7$ células no adherentes cada 2 días durante 4-6 semanas.

20 **Ejemplo 4: Utilización de células adherentes y no adherentes según el Ejemplo 1 para inducir una reparación de la isquemia cardíaca. Diferenciación *in vivo*.**

Después de su inyección en un modelo de infarto en múridos (condiciones del ejemplo 1.8), se estudia solo el destino de las células GFP redondeadas y alargadas o en comparación con las células de la SVF-GFP en bruto.

25 Las células redondeadas se obtienen por centrifugación del líquido sobrenadante del cultivo. El cultivo enriquecido en células adherentes se recoge después de tripsinización de la capa adherente, que se lava con el fin de eliminar la mayor parte de las células redondeadas (véase el Ejemplo 1).

El primer grupo (n = 6) recibe 10^5 células de la SVF-GFP en bruto (control) y los corazones se analizan 7 o 14 días después de la inyección.

Sea cual sea el momento del análisis (7 o 14 días), apenas se encuentran células GFP en los ratones.

30 Dichas células presentan siempre un aspecto de fibroblastos; no se detecta ninguno de los marcadores cardíacos (Figura 5).

El segundo grupo (n = 9) recibe 10^5 células redondeadas no adherentes recogidas por centrifugación del medio de cultivo. En todos los ratones de este grupo, no se detecta ninguna célula GFP positiva a los 7 días (n = 3) o 14 días (n = 2) del trasplante.

5 En el tercer grupo (n = 7), se inyectan 10^5 células adherentes enriquecidas. Más precisamente, se inyectan células procedentes de la tripsinización de un tapiz celular obtenido según el modo de cultivo MC → BHK21. Obviamente el cultivo había sido lavado antes de la acción de la tripsina para eliminar la máxima cantidad de células sobrenadantes. Sin embargo, estas últimas que proceden del tapiz, nunca se está seguro de haber retirado todas por lavado, pues algunas células que establecen uniones con el tapiz permanecen enganchadas. Esta es la razón por la que esta población se denomina enriquecida (casi exclusivamente constituida por) en células adherentes.

10 Se detectan células GFP aisladas en 3 de cada 4 corazones en el día 7 y en 3 de cada 5 corazones en el día 14. La morfología de estas células GFP es alargada, pero no de tipo cardíaco, en la medida en que no se observan estrías (Figura 5).

15 El cuarto grupo (n = 23) recibe una mezcla 1:1 de células adherentes y células redondeadas en suspensión ($1 \cdot 10^5$ de células cardiomiogénicas expresan la GFP recogidas únicamente entre el pase 3 y 4 de la etapa c)); la inyección se lleva a cabo inmediatamente después del infarto de miocardio por inyección directa de la mezcla de células en la pared ventricular. Después de 7 días, las células GFP se encuentran en todos los corazones (11 de 11). Se observa un marcado específico con GFP en los bordes de la zona isquémica, lo que sugiere la aparición de una zona de regeneración alrededor de la zona isquémica. Además, también se observan células GFP en la zona isquémica. Estas células tienen un morfología cardíaca (Figura 6) y están en la misma orientación espacial que el miocardio intacto (Figura 6). Son muy abundantes y forman un verdadero injerto de tejido de tipo miocardio (Figura 6). Estas células expresan los marcadores de cardiomiocitos, tales como MLC-2v (Figura 7A) y troponina T (Figura 7B).

20 Después de 15 días y un mes, estas células están todavía presentes (en 5 animales de cada 7) y conservan las mismas características.

25 Después de un mes, en 4 de cada 5 corazones analizados el fenotipo de las células GFP se hace más preciso con una morfología homogénea de células estriadas.

En el grupo en el que los ratones reciben a la vez células adherentes y células en suspensión, se observa efectivamente en todos los corazones, la presencia de células GFP positivas que expresan las características de células cardíacas.

30 Esta caracterización inmunofenotípica se ve reforzada por el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real, basado en la presencia de la secuencia genómica de la GFP.

La cantidad de células GFP inyectadas identificadas 7 días después de la administración representa $5,32\% \pm 1,955$ en el modelo de infarto de miocardio agudo, lo que corresponde a un valor medio de 5322 células GFP (Figura 10).

35 En comparación, en un modelo de infarto de miocardio sub-agudo en el que las células se inyectan 3 días después de la ligadura de la arteria coronaria, el porcentaje de células GFP injertadas en el día 7 (D7) es $2,2\% \pm 0,511$ y representa un valor medio de 2201 células GFP (Figura 10).

Un experimento de control en el que los ratones se sacrifican inmediatamente después de la inyección de células muestra que sólo se encuentra el 7% de las células inyectadas (Figura 10).

Esta cantidad representa 6946 células entre las 100.000 células inyectadas.

40 En resumen, la inyección de 100.000 células GFP conduce al injerto de 7000 células y 7 días más tarde todavía están presentes 5300 a 2200 células GFP, según el modelo de infarto de miocardio implicado.

Para completar el estudio y principalmente la influencia del ambiente isquémico sobre el injerto, la mezcla de las dos poblaciones de células (células adherentes y células no adherentes) se inyectan en un infarto de miocardio crónico (2 semanas después de la ligadura de la arteria coronaria).

En estas condiciones, no se observa injerto, como en el modelo agudo (n = 9).

45 Los resultados se resumen en la Tabla VI.

Tabla VI : Resultados de los injertos de células cardíacas según la invención (células adherentes y células no adherentes) mezcladas en un relación 1:1, en diferentes modelos de infarto

Tiempo entre la inyección y el sacrificio del animal (en días)	Modelo agudo	Modelo sub-agudo	Modelo crónico
D7	11/11	2/2	1/5
D15	5/7	1/1	0/4
D30	4/5	5/9	0/5
	células cardíacas (n=23)	células cardíacas (n=12)	ausencia de células cardíacas (n=14)

Para discriminar la eficacia de las células no adherentes recogidas en suspensión a partir del medio de cultivo (n = 9) frente a las células adherentes obtenidas después de tripsinización (n = 7), se inyectan independientemente como se ha precisado anteriormente.

- 5 Sorprendentemente 7 o 15 días después de la inyección, cuando se administran por separado no pueden ser identificadas pocas células GFP (a partir de la población de células no adherentes, Figura 5) o ninguna células GFP (a partir de la población de células adherentes).

Por lo tanto, se requiere la inyección conjunta de los dos tipos celulares.

Los resultados se resumen en la Tabla VII.

10

Tabla VII: Modelo agudo de infarto de miocardio

Tiempo entre la inyección y el sacrificio del animal (en días)	ADSC ⁽¹⁾	Células cardíacas o cardiomiogénicas según la invención ⁽²⁾		
	ADSC	Población no adherente	Población adherente	Mezcla de las dos poblaciones en una relación 1:1
D7	3/4	3/4	0/5	11/11
D15	2/2	3/5	0/2	5/7
D30	-	-	-	4/5
	ausencia de células cardíacas (n=6)	ausencia de células cardíacas (n=9)	ausencia de células cardíacas n=7)	células cardíacas (n=23)

⁽¹⁾ ADSC (células estromales derivadas de tejido adiposo): células de la SVF obtenidas a partir de tejido adiposo y cultivadas 6 días en DMEM-F12

⁽²⁾ Células de la SVF obtenidas a partir de tejido adiposo, cultivadas en metilcelulosa para obtener una diferenciación cardíaca y puestas en expansión en el medio BHK21

Ejemplo 5: Estudio funcional

Este estudio permite verificar si las células cardíacas según la invención protegen o restablecen la función ventricular izquierda en el corazón isquémico.

15

La evaluación ecocardiográfica ha permitido comparar dos grupos de animales con un infarto de miocardio.

Tres días después de la cirugía, un grupo (n = 9) recibe $1 \cdot 10^5$ células (mezcla de dos poblaciones de células), mientras que el grupo de control recibe un medio celular (n = 8).

Se analizaron varios parámetros para estimar la remodelación (basada en los diámetros y volúmenes) y la función sistólica (basada en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo), en los dos grupos.

5 Se observa alguna diferencia significativa en lo que se refiere al volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (LVEDV), el volumen telesistólico del ventrículo izquierdo (LVESV) y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) entre los dos grupos, antes y 3 días después de la cirugía.

Tres días después de la ligadura de la arteria coronaria e inmediatamente antes de la inyección (D0), la función cardíaca se deteriora de manera similar en los dos grupos ($P = 0,5825$) lo que indica que los tamaños de los infartos de miocardio fueron similares (Figura 11).

10 Los animales se tratan con una inyección de células o con un medio (para el grupo de control) y se analizan los parámetros cardíacos después de 7 (D7) y 28 (D28) días.

En el grupo de control, la LVEF disminuye desde $52,9\% \pm 4,9$ (D0) hasta $44,7\% \pm 5,8$ el D7 llegando finalmente a $38,75\% \pm 5,5$ el D28 ($P < 0,0001$ D7 frente a D28).

En el grupo tratado con células, la LVEF permanece estable ($56,6\% \pm 4,5$ el día 0 (D0); $56,4 \pm 5,8\%$ el día 7 (D7) y $57,7\% \pm 4,4$ en el día 28 (D28) $P = 0,967$, D7 frente a D28).

15 28 días después de la inyección la LVEF es significativamente diferente en favor del grupo tratado, entre el grupo tratado y el grupo de control ($P = 0,0201$ del control frente al tratamiento celular).

20 En lo que se refiere a la remodelación, se observa después de 28 días, una dilatación significativa del ventrículo izquierdo que recibe el medio, como se indica por el aumento significativo del LVDEV de $0,18 \text{ mL} \pm 0,015$ en el día 0 (D0) a $0,27 \text{ mL} \pm 0,039$ en el día 7 (D7) y $0,38 \text{ mL} \pm 0,071$ en el día 28 (D28) (todos los $P < 0,03$). En el grupo de control, se observa igualmente un aumento del LVESV: $0,0885 \text{ mL} \pm 0,015$ en el día 0 (D0); $0,158 \text{ mL} \pm 0,032$ en el día 7 (D7) y $0,250 \text{ mL} \pm 0,056$ en el día 28 (D28) (todos $P < 0,03$).

25 Por el contrario, en los infartos de miocardio tratados con las células, no se observa ninguna dilatación significativa: $0,147 \text{ mL} \pm 0,015$ en el día 0 (D0); $0,193 \text{ mL} \pm 0,030$ en el día 7 (D7); $0,199 \text{ mL} \pm 0,038$ en el día 28 (D28) para el LVEDV y $0,069 \text{ mL} \pm 0,013 \text{ ml}$ en el día 0 (D0), $0,092 \text{ mL} \pm 0,022$ en el día 7 (D7) y $0,100 \text{ mL} \pm 0,033$ en el día 28 (D28) para el LVESV.

La comparación del LVEDV y del LVESV después de 28 días muestra una diferencia significativa (menor dilatación) para el grupo tratado frente al grupo de control ($p = 0,046$ y $0,039$, respectivamente).

Un mejor comportamiento del ventrículo izquierdo el día 28 (D28) es apoyado por la presencia de células que co-expresan GFP y MLC-2v identificadas en 5 de cada 9 corazones tratados el día 28 (D28) (véase la Figura 11).

30 Un porcentaje más elevado de células GFP se cuantifica en el modelo de infarto agudo en relación con el modelo de infarto de sub-agudo, lo que sugiere que las células podrían ser inyectadas tres días después de la ligadura de la arteria sin consecuencias para el injerto celular.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 CASTEILLA, Louis
 PLANAT-BENARD, Valérie
 5 PENICAUD, Luc
 CHANUT, Carine
- <120> Procedimiento de cultivo de células procedentes de tejido adiposo y sus aplicaciones
- 10 <130> BLOcp/131PCT
- <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador sentido MEF2C
- <400> 1
 25 agataccac aacacaccac gcgcc 25
- <210> 2
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
- <220>
 <223> Cebador antisentido MEF2C
- <400> 2
 35 atcctcaga gagtcgatg cgctt 25
- <210> 3
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Cebador sentido Oct-3/4
- 45 <400> 3
 tcagctggg ctagagaagg 20
- <210> 4
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
- <220>
 55 <223> Cebador antisentido Oct-3/4
- <400> 4
 tgacgggaac agagggaag 20
- 60 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 65 <220>

<223> Cebador sentido Brachury
 <400> 5
 gacttcgtga cggctgacaa 20
 5
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador antisentido Brachury
 <400> 6
 15 cgagtcctggg tggatgtag 19
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sentido Isletl
 25 <400> 7
 catcgagtgt ttccgctgtg tag 23
 <210> 8
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido Isletl
 35 <400> 8
 gttgtcttct ccggctgctt gtgg 24
 <210> 9
 40 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Cebador sentido GFP
 <400> 9
 gggcacaagc tggagtacaa c 21
 50 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador antisentido GFP
 <400> 10
 60 tcaccttgat gccgttctc t 21
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>

ES 2 613 930 T3

<223> Cebador sentido 36B4

<400> 11

5 agtcggagga atcagatgag gat 23

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador antisentido 36B4

<400> 12

15 ggctgacttg gttgcttgg 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de células cardíacas, caracterizado porque comprende al menos las etapas siguientes:

5 a) selección de células cardiomiogénicas a partir de la fracción estromal vascular (FSV o SVF por *stromal vascular fraction*) en bruto;

b) cultivo de las células seleccionadas en la etapa a) en un medio líquido optimizado para la expansión *ex vivo* de las células cardiomiogénicas, seleccionándose dicho medio líquido del grupo constituido por:

- el medio BHK21 cuya composición es la siguiente:

Sales inorgánicas, 1X líquido mg/L:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	265,00
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,10
KCl	400,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00
NaCl	6400,00
NaHCO ₃	2750,00
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	141,00
Aminoácidos, 1X líquido mg/L:	
L-arginina.HCl	42,00
L-cistina	24,00
L-glutamina	292,00
L-histidina.HCl.H ₂ O	21,00
L-isoleucina	52,00
L-leucina	52,00
L-lisina.HCl	73,00
L-metionina	15,00
L-fenilalanina	33,00
L-treonina	47,60
L-triptófano	8,00
L-tirosina	36,20
L-valina	46,80
Aminoácidos no esenciales, 5 mL, 10 mM/500 mL, 100X líquido g/L:	
L-alanina	890,00
L-asparagina	1320,00
L-ácido aspártico	1330,00
L-ácido glutámico	1470,00
Glicina	750,00
L-prolina	1150,00
L-serina	1050,00

Vitaminas, 1X líquido mg/L :	
Pantotenato de calcio D	2,00
Cloruro de colina	2,00
Ácido fólico	2,00
i-inositol	3,60
Nicotinamida	2,00
Piridoxal.HCl	2,00
Riboflavina	0,20
Tiamina.HCl	2,00

y que contiene al menos suero de ternera de fetal y β -mercaptoetanol y

– cualquier otro medio, cuya composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas sea idéntica a la del medio BHK21

5 – y dicho medio que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol;

c) mantenimiento y expansión de dichas células por pases sucesivos en medio líquido; y

d) obtención de células cardíacas.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1 (procedimiento 1), caracterizado porque la selección de la etapa de a) se efectúa por cultivo primario de células de la fracción estromal vascular en bruto en un medio semisólido, hasta la aparición de agrupaciones (o clones) de células contráctiles.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la etapa b) comprende retirar dichas células contráctiles constituidas por dos subpoblaciones que presentan tipos morfológicos distintos, a saber, células adherentes de tipo alargado y células no adherentes de tipo redondo (o redondeado); y trasplantar dichas células contráctiles en dicho medio líquido optimizado para la expansión *ex vivo* de células cardiomiogénicas o células madre.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizado porque la etapa c) comprende el mantenimiento y la expansión de al menos una de las dos subpoblaciones de células (células adherentes y células no adherentes en suspensión) por pases sucesivos en medio líquido.

20 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque el medio semisólido de la etapa a) se selecciona ventajosamente del grupo que consiste en derivados celulósicos y matrices membranales basales reconstituidas que comprenden al menos una de los siguientes elementos: colágeno, laminina y proteoglicanos.

6. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la duración de cultivo según la etapa a) es de algunos días a algunas semanas, preferiblemente de una a dos semanas.

25 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, caracterizado porque, antes de trasplantar células contráctiles, se realiza una segunda selección utilizando al menos un marcador adecuado.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho marcador es ventajosamente un marcador positivo y/o un marcador negativo de las células cardíacas.

30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque el marcador positivo de las células cardíacas se selecciona del grupo que consiste en los siguientes marcadores: Sca-1, troponina, MLC2v, CD44, CD81, CD73, CD38 y el marcador negativo de células cardíacas se selecciona del grupo que consiste en los marcadores del complejo principal de histocompatibilidad CMH1 o CMH2, CD31, CD34, CD45, c-kit y Fik1.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, caracterizado porque dicho medio además del medio líquido de la etapa b) es un medio susceptible de ser utilizado para las células de tipo ES.

35 11. Procedimiento de la reivindicación 1 (procedimiento 2), caracterizado porque la selección de la etapa a) se efectúa por la etapa tricelular de células de la SVF en bruto con ayuda de al menos un marcador negativo de las células cardíacas, tal como se define en la reivindicación 9, y la etapa b) comprende el cultivo de las células seleccionadas en un medio líquido BHK21 que contienen al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol o cualquier otro medio susceptible de ser utilizado para las células tipo ES, cuya composición de sales inorgánicas,

aminoácidos y vitaminas es como se define en la reivindicación 1 y que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol.

5 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la etapa c) de mantenimiento y expansión de los cultivos en medio líquido se puede realizar usando una de las dos modalidades siguientes:

– centrifugación de las células en suspensión en un medio líquido idéntico o diferente del de la etapa b) y nueva siembra del sedimento celular en el mismo medio líquido; o

10 – rotura enzimática o cualquier otro procedimiento que permita para el desprendimiento de células del tapiz celular adherentes, centrifugación de la suspensión celular desprendida y nueva siembra del sedimento celular en el mismo medio líquido.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque dichas células cardiomiogénicas están modificadas genéticamente.

15 14. Utilización de las células cardíacas, susceptibles de ser obtenidas a partir de las células de la fracción estromal vascular, en las condiciones descritas en los procedimientos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la preparación de un medicamento adecuado para reconstituir una zona cardíaca isquémica, seleccionándose dichas células cardíacas del grupo que consiste en:

(i) células cardiomiogénicas contráctiles adherentes de forma alargada que presentan al menos las siguientes características: $CD38^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD81^+$, $CD31^-$, $CD45^-$, $ckit^-$, $Fli1^-$, $CMH2^-$, siendo alrededor del 50% de dichas células $Sca-1^+$, troponina T^+ y $MLC2v^+$.

20 (ii) células no adherentes de forma redondeada que presentan al menos las siguientes características: $CD44^+$, $CD81^+$, $CD31^-$, $CD45^-$, $CD73^-$, $CMH1^-$, siendo alrededor del 50% de dichas células $Sca-1^+$, troponina T^+ y $MLC2v^+$, expresando además los dos tipos de células el factor de transcripción mesodérmico Brachyury, los factores de transcripción *Islet-1* y *MEF-2c* y el factor de unión transcripcional *Oct3/4*, o

25 (iii) una mezcla de dichas células adherentes y dichas células no adherentes.

15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la etapa b) de cultivo de las células seleccionadas en a) se efectúa sobre una superficie de adhesión adecuada para la expansión *ex vivo* de células cardiomiogénicas.

16. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque comprende:

30 a) un cultivo primario de células de la SVF en un medio semisólido a base de metilcelulosa y la selección de células cardiomiogénicas,

35 b) un cultivo secundario de las células seleccionadas en a) en el medio líquido BHK21 que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol u otro medio cuya composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas es tal como se define en la reivindicación 1 y que contiene al menos suero de ternera fetal y β -mercaptoetanol sobre una superficie de adhesión adecuada para la expansión *ex vivo* de células cardiomiogénicas.

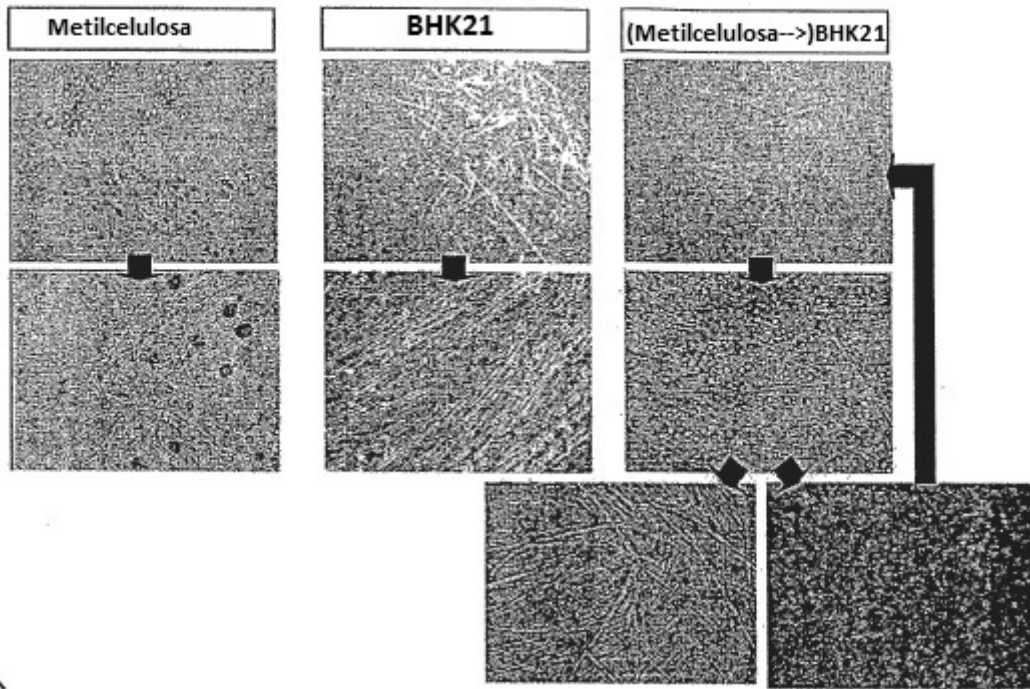
c) mantenimiento y expansión de dichas células por pases sucesivos en un medio líquido, y

d) obtención de células cardíacas.

40 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la selección de células cardiomiogénicas a partir de la fracción vascular estromal (SVF) en bruto recién preparadas por cultivo primario de dichas células de la SVF directamente en medio BHK21 y sobre un soporte o superficie de adhesión adecuado.

18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 17, caracterizado porque el soporte o superficie de adhesión adecuado se selecciona del grupo constituido por gelatina, proteínas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular.

A.



B.

Medio de cultivo	DMEM-F12	BHK21	MC->BHK21
Troponina T ⁺	0%	10,5%	57%

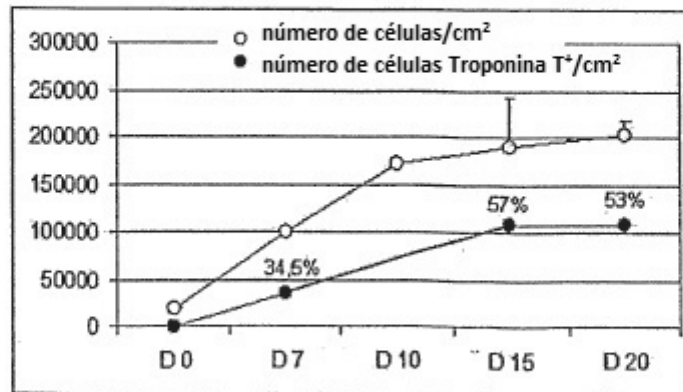
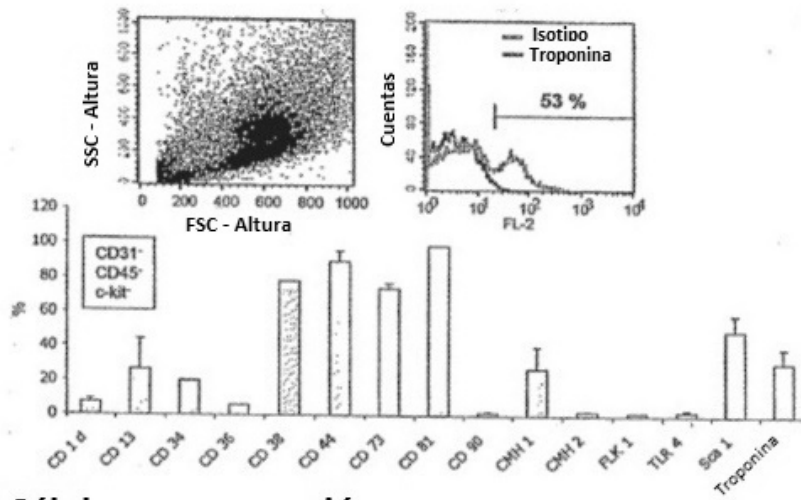


FIGURA 1

A. Células adherentes



B. Células en suspensión

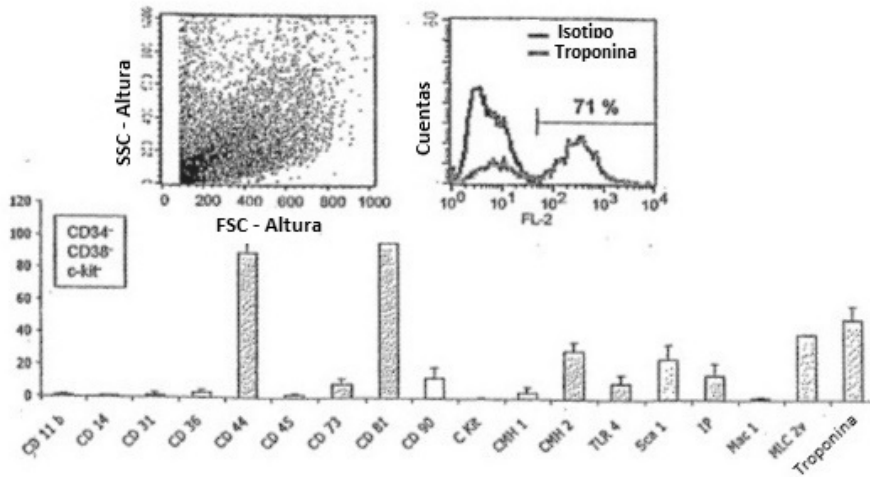


FIGURA 2.1

C.

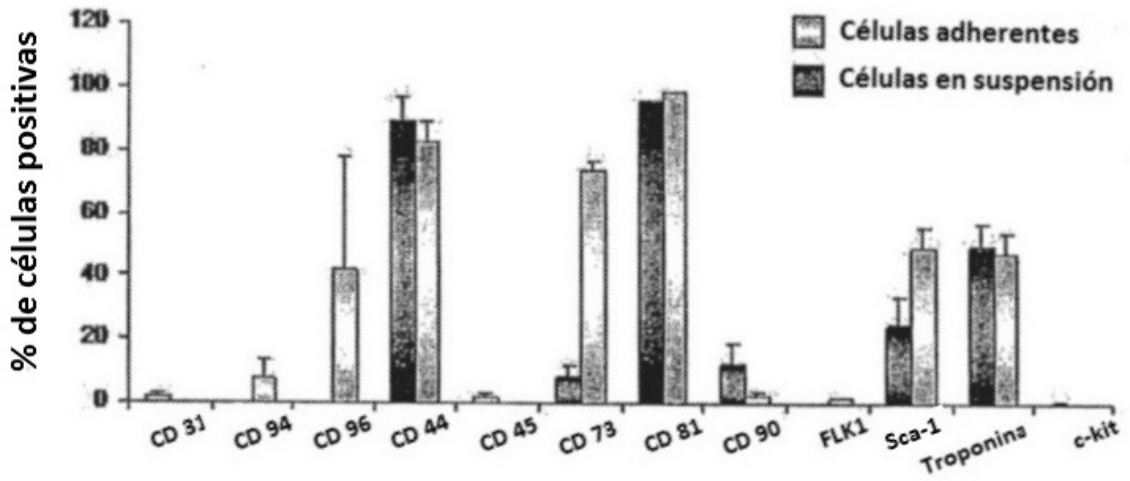


FIGURA 2.2

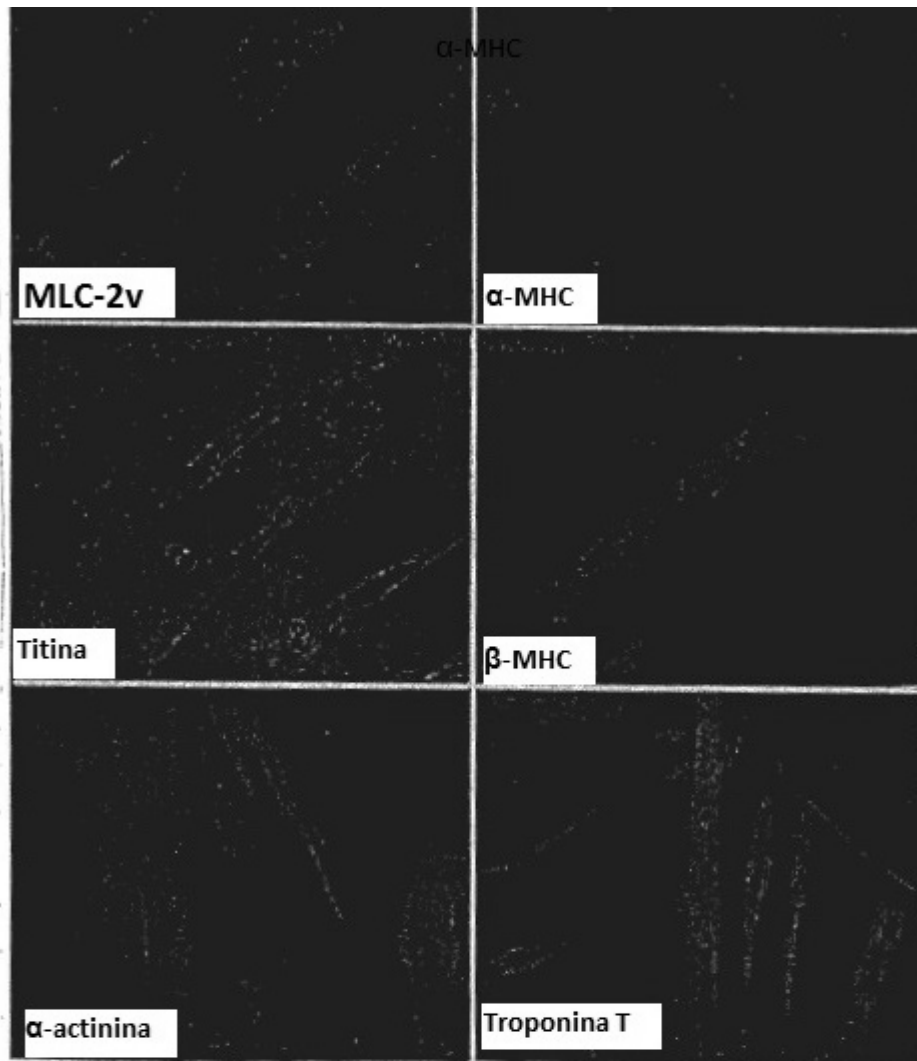


FIGURA 3

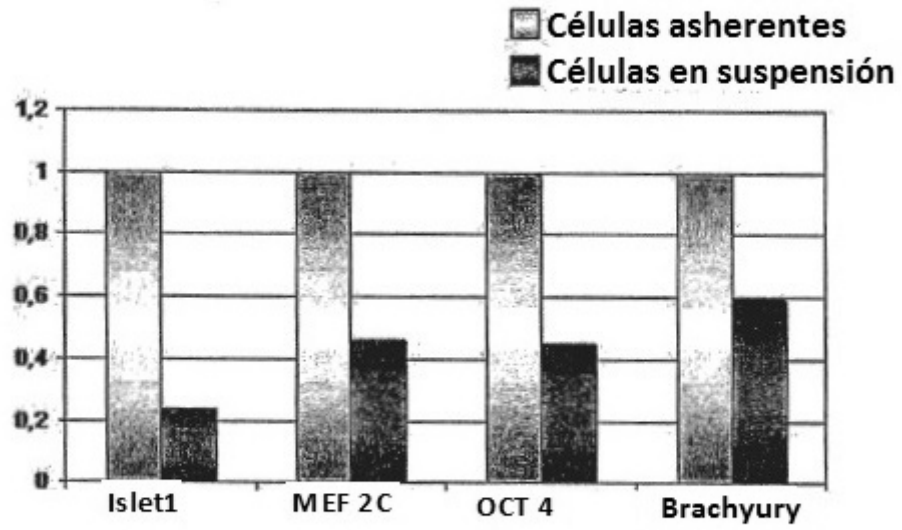


FIGURA 4

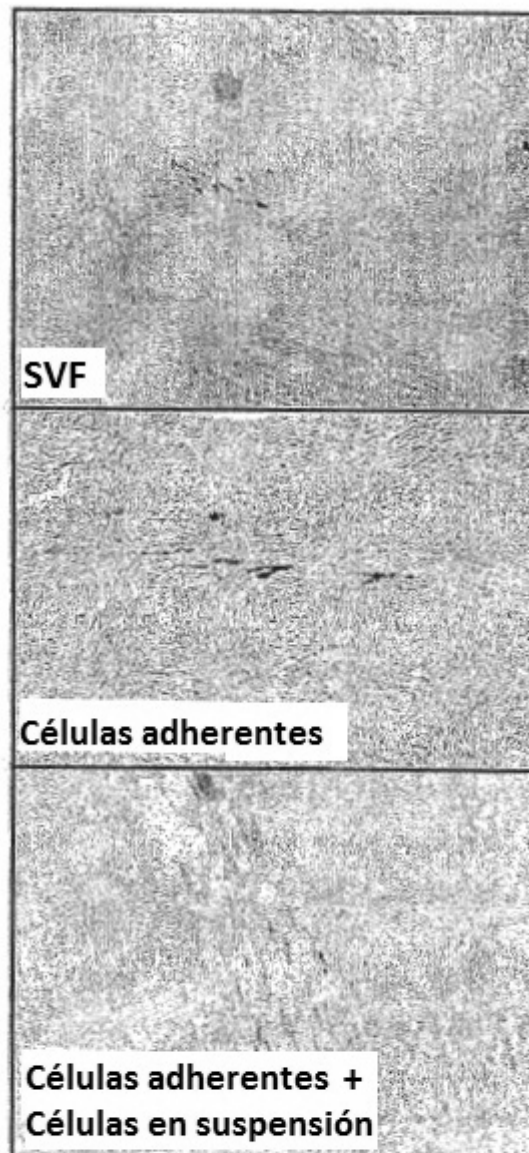


FIGURA 5

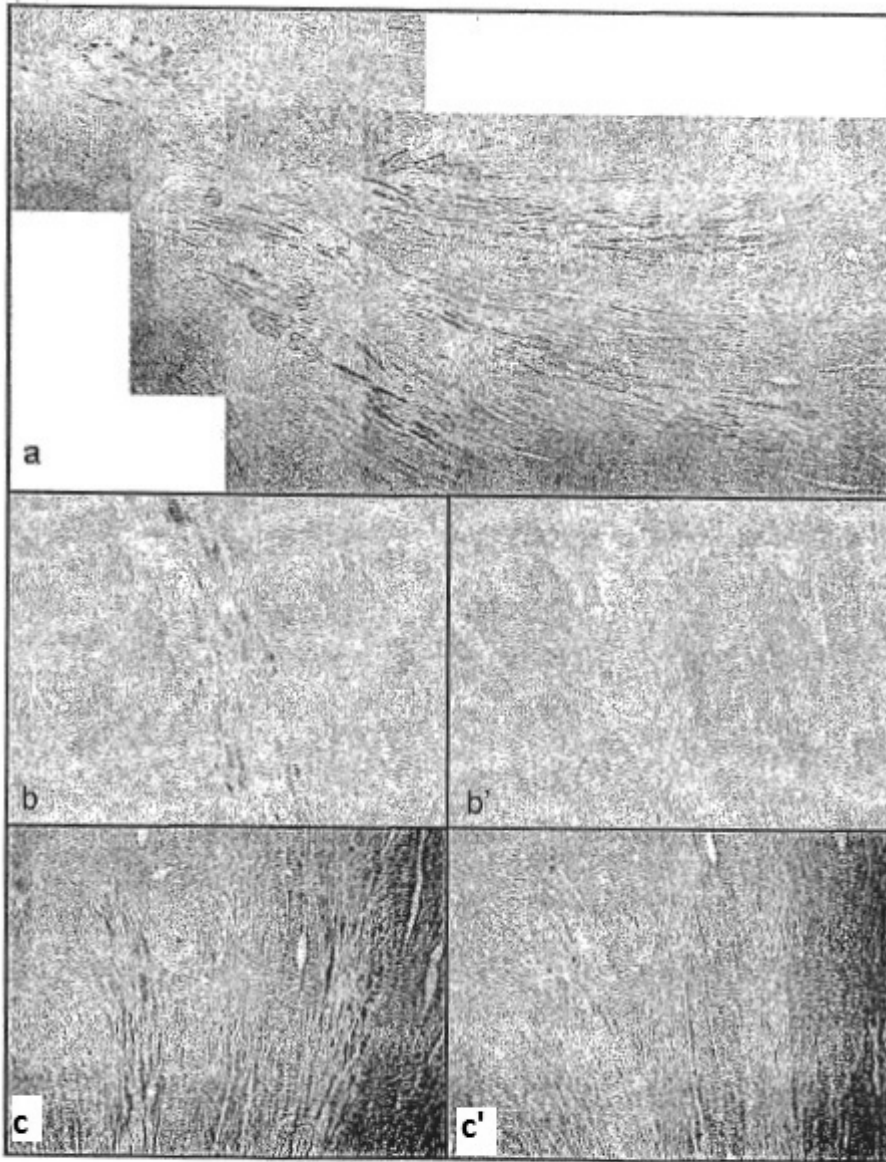


FIGURA 6

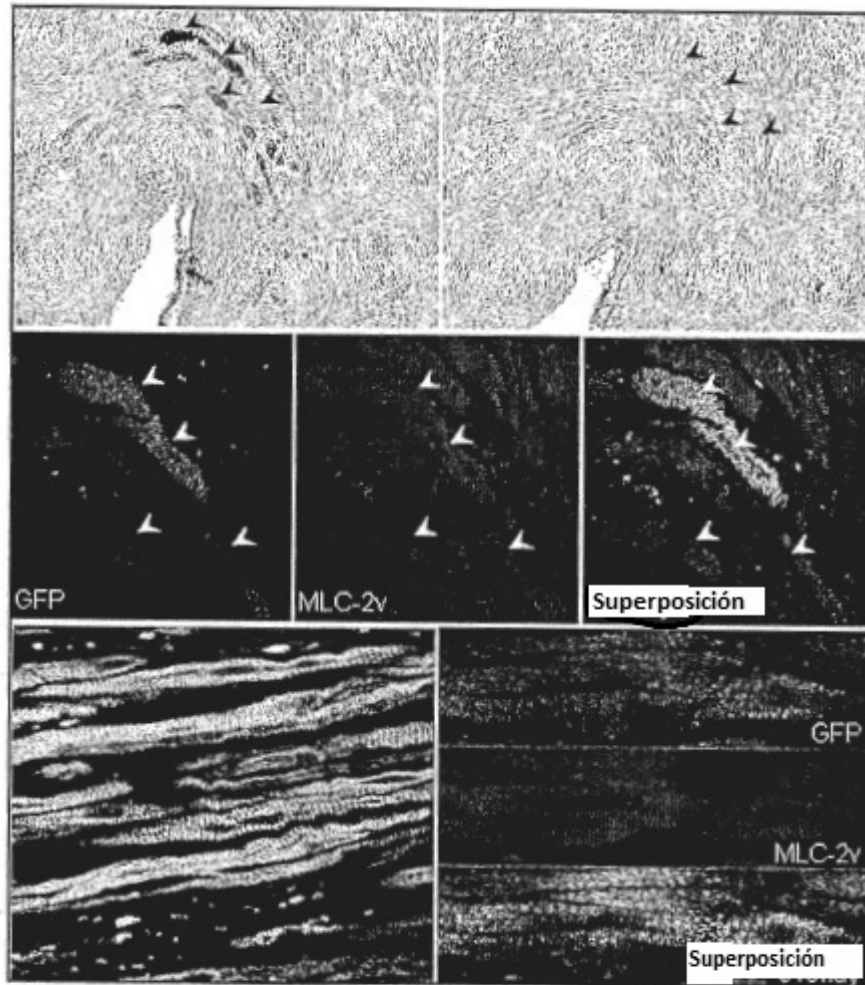


FIGURA 7

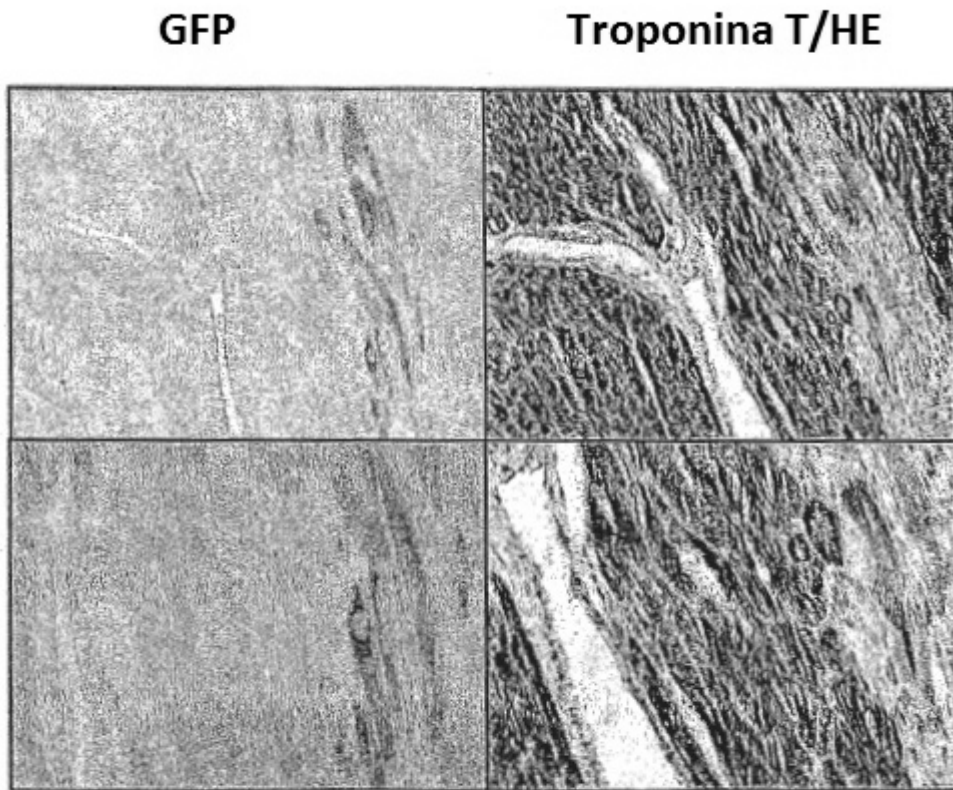


FIGURA 8

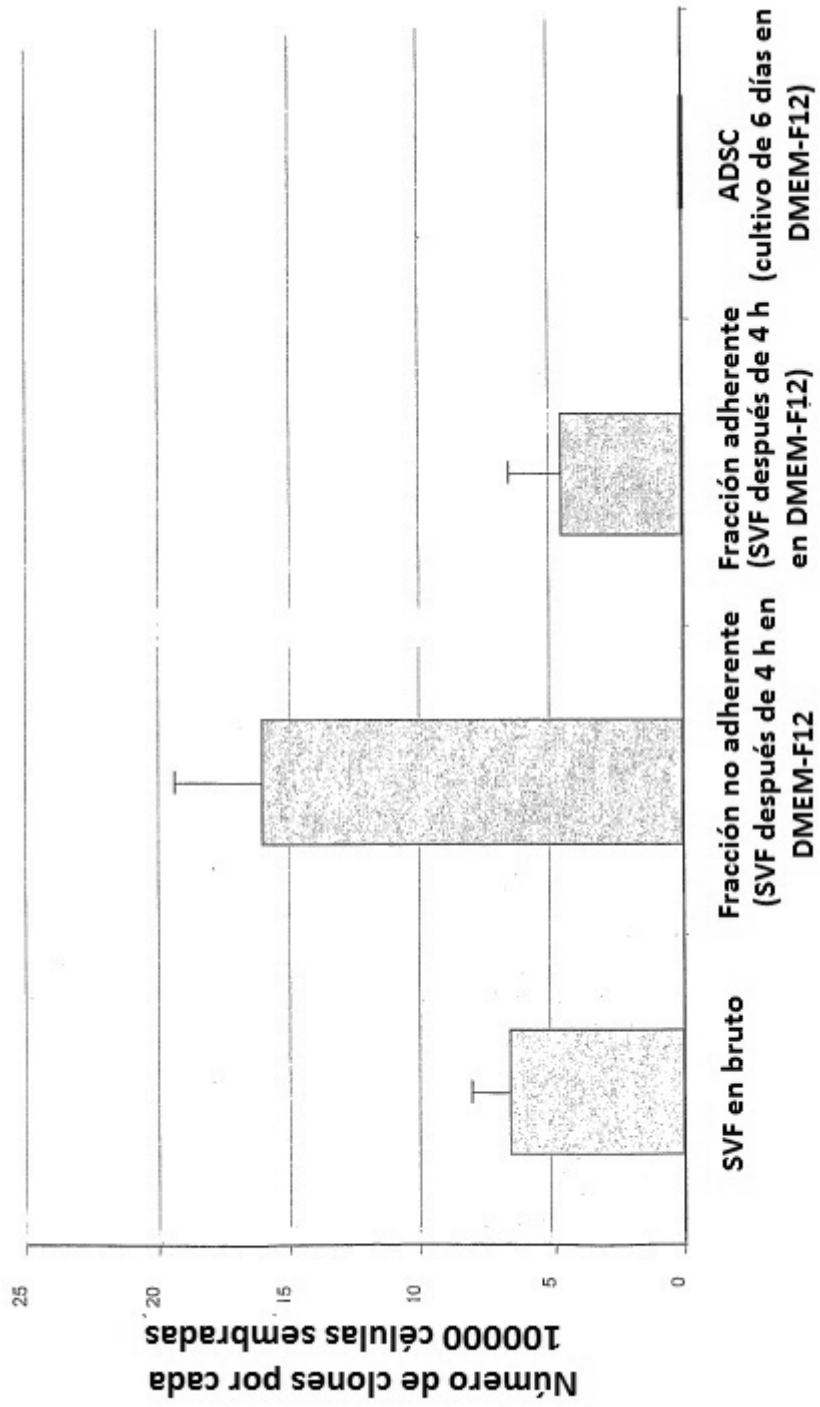


FIGURA 9

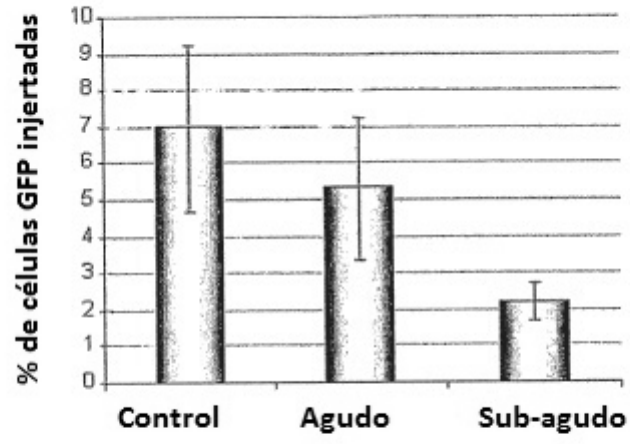


FIGURA 10

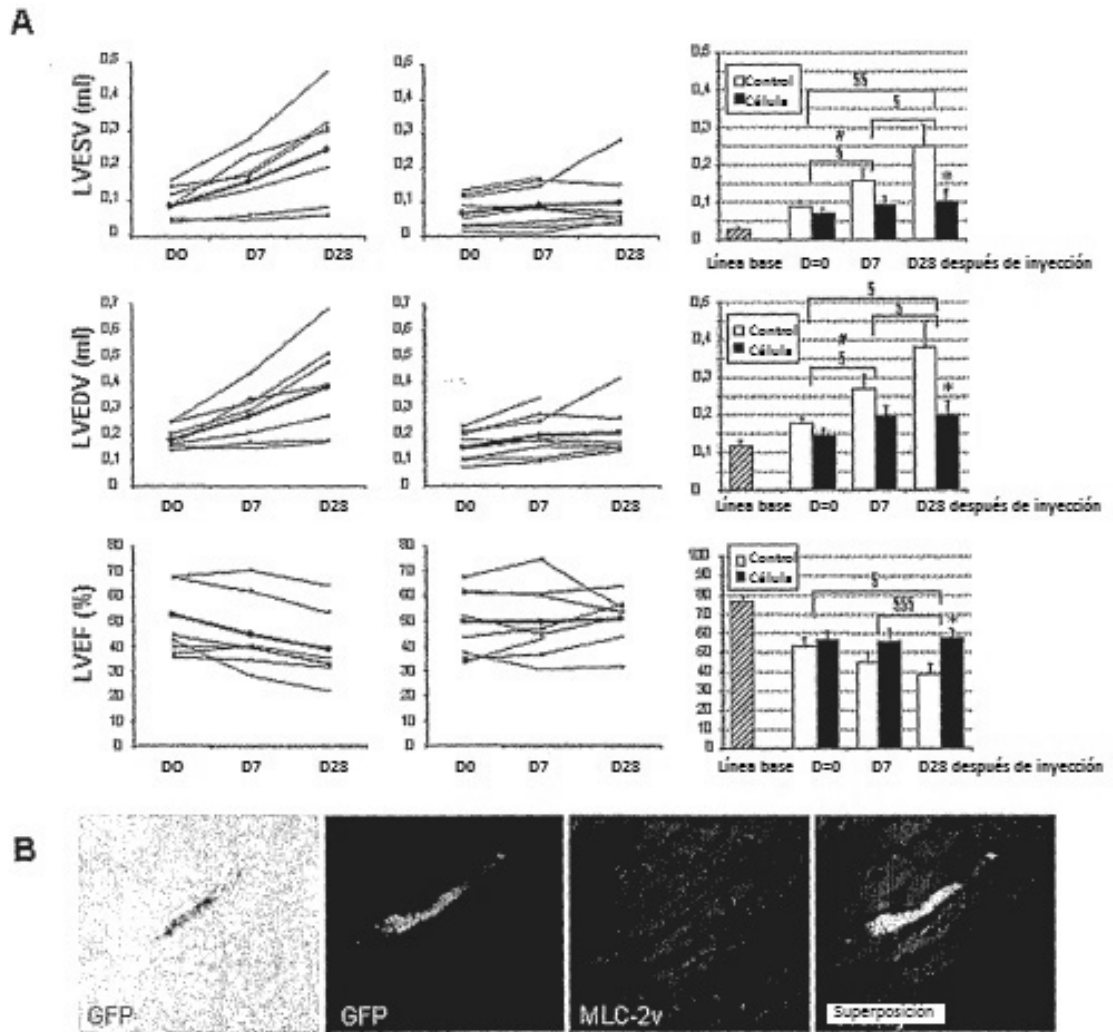


FIGURA 11