

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 396**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2013** E 13181352 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016** EP 2840132

54 Título: **Método para producir músculo cardíaco por ingeniería (EHM)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2017

73 Titular/es:

**GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN
STIFTUNG ÖFFENTLICHEN RECHTS
UNIVERSITÄTSMEDIZIN (100.0%)
Robert-Koch-Strasse 40
37099 Göttingen, DE**

72 Inventor/es:

**ZIMMERMANN, WOLFRAM-HUBERTUS;
TIBURCY, MALTE y
HUDSON, JAMES**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 615 396 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

Método para producir músculo cardíaco por ingeniería (EHM)

La presente invención proporciona un nuevo método para producir músculo cardíaco por ingeniería (EHM) en condiciones químicamente totalmente definidas todas compatibles con las regulaciones GMP. El miocardio humano resultante genera fuerza y muestra propiedades típicas de músculo cardíaco.

Antecedentes da la invención

La enfermedad cardíaca es la causa número uno de muerte en los países industrializados y se espera que su prevalencia se eleve a pesar del tratamiento farmacológico e intervencionista refinado. Consecuentemente, se requieren inevitablemente nuevas modalidades de tratamiento farmacológico y no farmacológico. El miocardio preparado por ingeniería tisular puede usarse, por una parte, para identificar nuevos fármacos o dianas de fármacos para el tratamiento de la enfermedad cardíaca (cribado de sustancias/validación de dianas) y, por otra parte, puede aplicarse directamente en la reparación cardíaca (medicina regenerativa/repáradora) (Eschenhagen y Zimmermann Circ Res 97: 1220-1231 (2005); Zimmermann et al, Cardiovasc Res 71: 419-429 (2006)). Un prerrequisito principal del miocardio preparado por ingeniería funcional, como con el músculo cardíaco nativo, es la capacidad de generar fuerza.

A lo largo de la última década se han establecido varias modalidades de ingeniería tisular miocárdica. Sin embargo, la generación de fuerza fiable sólo se ha demostrado usando atrapamiento hidrogel-célula (Eschenhagen et al, Faseb J 11: 683-694 (1997); Kofidis et al, J Thorac Cardiovasc Surg 124: 63-69 (2002); Morritt et al, Circulation 115: 353-360 (2007); Zimmermann et al, Biotechnol Bioeng 68: 106-114 (2000); Tulloch et al, Circ Res 109: 47-59 (2011)) o tecnologías de láminas celulares (Shimizu et al, Circ Res 90: e40 (2002)). Los inventores y otros han proporcionado evidencia de que el atrapamiento de miocitos en hidrogeles de colágeno ofrece un medio de crecimiento tridimensional que, por una parte, puede facilitar el ensamblaje de músculo cardíaco anisotrópico, multicelular y, por otra parte, soporta la maduración avanzada de los cardiomiocitos inmaduros (Tiburcy et al, Circ Res 109: 1105-1114 (2011)). Las preparaciones de músculo cardíaco preparado por ingeniería (EHM) resultantes (descrito anteriormente como tejido cardíaco preparado por ingeniería: EHT) facilitan finalmente la formación de construcciones miocárdicas contráctiles con propiedades de músculo cardíaco postnatal (Radisic et al, Proc Natl Acad Sci USA 101: 18129-18134 (2004); Tiburcy et al, Circ Res 109: 1105-1114 (2011); Zimmermann et al, Circ Res 90: 223-230 (2002)). Los estudios en animales de prueba de principio integran pero también mejoran la función cardíaca (Zimmermann et al, Nat Med 12: 452-458 (2006)).

En principio, los inventores han mostrado que el miocardio preparado por ingeniería tisular puede ser una nueva modalidad de tratamiento para la enfermedad cardíaca. Sin embargo, todas las estrategias publicadas hasta la fecha de ingeniería tisular cardíaca se basan en el uso de componentes animales indefinidos, mayoritariamente matriz animal (por ejemplo, colágeno de rata, fibrina de bovino, matriz extracelular derivada de tumor de ratón [Matrigel®], y suero animal (Tulloch et al, Circ Res 109: 47-59 (2011), Zimmermann et al, Circ Res 90: 223-230 (2002), Zimmermann et al, Nat Med 12: 452-458 (2006), Schaaf et al, PLoS One 6: e26397 (2011); Soong et al, Curr Prot Cell Biol 23.8,1-23.8.21 (2012); WO 01/55297, WO 2007/054286, y WO 2008/058917). En el modelo EHM de rata, los inventores han realizado en primer lugar estudios para reemplazar el suero animal con un medio sin suero. Aunque los inventores fueron capaces de conseguir una producción de fuerza comparable en los tejidos resultantes, los inventores no pudieron retirar los componentes animales durante la fase inicial de formación de tejido en los primeros siete días (Naito et al, Circulation 114: 172-78 (2006); Zimmermann, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Habilitation (2006); Schneiderbanger, Universität Hamburg, Dissertation (2006)).

Recientemente, se han descrito varios protocolos dirigidos por citoquinas, sin suero, para diferenciaciones cardíacas más eficientes (Burrige et al, Cell Stem Cell 10: 16-28 (2012)) que dan lugar a cultivos que contienen hasta 98% de cardiomiocitos (Lian et al, Proc Natl Acad Sci USA (2012)). De forma importante, estos protocolos de diferenciación sin suero ofrecen una aplicabilidad clínica potencial ya que se utilizan sustancias definidas sin productos animales. Aunque la escalada de células cardíacas humanas bajo condiciones GMP parece ser una advertencia que se puede resolver, la generación de miocardio humano generador de fuerza todavía representa un reto. Permanece como un asunto crucial soportar la organización organotípica y maduración avanzada de miocitos derivados de ESC bajo condiciones de cultivo definidas, sin suero.

Resumen de la invención

Aquí, los inventores reportan un protocolo para preparar por ingeniería miocardio humano (músculo cardíaco humano preparado por ingeniería: hEHM) usando todos los componentes definidos. Estos componentes incluyen una matriz de hidrogel, células humanas y condiciones de medio de cultivo sin suero todos compatibles con regulaciones GMP. El miocardio humano resultante genera fuerza y muestra propiedades típicas de músculo cardíaco.

Más específicamente, se proporciona un método para producir músculo cardíaco preparado por ingeniería (EHM), comprendiendo el método las etapas de:

- 5 i) proporcionar una mezcla de reconstitución sin suero en uno o más moldes, comprendiendo dicha mezcla de reconstitución (a) un medio esencial mínimo sin suero; (b) un suplemento sin suero que resulta en una concentración final de 0,5-50 mg/ml de albúmina, 1-100 µg/ml de transferrina, 0,1-10 µg/ml de etanol amina, 0,003-0,3 µg/ml de selenito de sodio, 0,4-40 µg/ml de L-carnitina HCl, 0,1-10 µg/ml de hidrocortisona, 0,05-5 µg/ml de suplemento de ácidos grasos, 0,0001-0,1 µg/ml de triyodo-L-tironina (T3) y 0,2-2 µg/ml de colágeno; y (c) una mezcla de miocitos cardiacos humanos y no miocitos humanos, en el que 20 a 80% de la mezcla celular total son miocitos cardiacos; en el que la mezcla de reconstitución tiene un pH de 7,2 a 7,6;
- ii) cultivar la mezcla de reconstitución sin suero en dicho uno o más moldes, mediante lo cual se permite que la mezcla de reconstitución sin suero se condense durante al menos 15 min;
- 10 iii) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (ii) en dicho uno o más moldes en un medio de cultivo EHM sin suero hasta que la mezcla se condensa hasta al menos 50% de su espesor original, en el que dicho medio de cultivo EHM comprende (a) un medio basal que comprende 0,5-3 mmoles/L de Ca²⁺; (b) un suplemento sin suero como se define en (i)(b); (c) 0,5-10 mmoles/L de L-glutamina; (d) 0,01-1,0 mmoles/L de ácido ascórbico; (e) 1-100 ng/ml de IGF-1; y (f) 1-10 ng/ml de TGFβ1;
- 15 iv) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (iii) bajo estiramiento mecánico en un medio de cultivo EHM sin suero como se define en la etapa (iii) (a)-(f), mediante lo cual se forma EHM generador de fuerza.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Más específicamente, la invención proporciona un método para producir músculo cardiaco preparado por ingeniería (EHM), comprendiendo el método las etapas de:

- 20 i) proporcionar una mezcla de reconstitución sin suero en uno o más moldes, comprendiendo dicha mezcla de reconstitución (a) un medio esencial mínimo sin suero; (b) un suplemento sin suero que resulta en una concentración final de 0,5-50 mg/ml de albúmina (preferiblemente 1-40 mg/ml, más preferiblemente 2-30 mg/ml, todavía más preferiblemente 3-20 mg/ml, lo más preferiblemente 4-10 mg/ml, y aún lo más preferiblemente 4,5-7,5 mg/ml tal como aproximadamente 5 mg/ml),
- 25 1-100 µg/ml de transferrina (preferiblemente 2-90 µg/ml, más preferiblemente 3-80 µg/ml, aún más preferiblemente 4-70 µg/ml, todavía más preferiblemente 5-60 µg/ml, más preferiblemente 6-50 µg/ml, más preferiblemente 7-40 µg/ml, más preferiblemente 8-30 µg/ml, más preferiblemente 9-20 µg/ml, tal como aproximadamente 10 µg/ml),
- 30 0,1-10 µg/ml de etanol amina (preferiblemente 0,2-9 µg/ml, más preferiblemente 0,3-8 µg/ml, aún más preferiblemente 0,4-7 µg/ml, todavía más preferiblemente 0,5-6 µg/ml, más preferiblemente 0,6-5 µg/ml, más preferiblemente 0,7-4 µg/ml, más preferiblemente 0,8-3 µg/ml, más preferiblemente 1-2,5 µg/ml, tal como aproximadamente 2 µg/ml),
- 0,003-0,3 µg/ml de selenito de sodio (preferiblemente 0,005-0,2 µg/ml, más preferiblemente 0,01-0,1 µg/ml, aún más preferiblemente 0,02-0,05 µg/ml, y lo más preferiblemente aproximadamente 0,03 µg/ml, tal como aproximadamente 0,032 µg/ml),
- 35 0,4-40 µg/ml de L-carnitina HCl (preferiblemente 0,5-30 µg/ml, más preferiblemente 1-20 µg/ml, aún más preferiblemente 2-10 µg/ml, lo más preferiblemente 3-5 µg/ml, y aún lo más preferiblemente aproximadamente 4 µg/ml),
- 40 0,1-10 µg/ml de hidrocortisona (preferiblemente 0,2-9 µg/ml, más preferiblemente 0,3-8 µg/ml, aún más preferiblemente 0,4-7 µg/ml, todavía más preferiblemente 0,5-6 µg/ml, más preferiblemente 0,6-5 µg/ml, más preferiblemente 0,7-4 µg/ml, más preferiblemente 0,8-3 µg/ml, más preferiblemente 0,9-2 µg/ml, tal como aproximadamente 1 µg/ml),
- 0,05-5 µl/ml de suplemento de ácidos grasos (preferiblemente 0,1-4 µl/ml, más preferiblemente 0,2-3 µl/ml, aún más preferiblemente 0,3-3 µl/ml, lo más preferiblemente 0,4-2 µl/ml, y aún lo más preferiblemente 0,45-1 µl/ml, tal como aproximadamente 0,5 µl/ml),
- 45 0,0001-0,1 µg/ml de triyodo-L-tironina (T3) (preferiblemente 0,001-0,01 µg/ml, más preferiblemente 0,002-0,0075 µg/ml, aún más preferiblemente 0,003-0,005 µg/ml, y lo más preferiblemente aproximadamente 0,004 µg/ml), y
- 50 0,2-2 mg/ml de colágeno (preferiblemente 0,3-1,9 mg/ml, más preferiblemente 0,4-1,8 mg/ml, aún más preferiblemente 0,4-1,7 mg/ml, todavía más preferiblemente 0,5-1,6 mg/ml, más preferiblemente 0,6-1,5 mg/ml, más preferiblemente 0,7-1,4 mg/ml, más preferiblemente 0,8-1,3 mg/ml, más preferiblemente 0,9-1,2 mg/ml, tal como aproximadamente 1 mg/ml);
- y (c) una mezcla de miocitos cardiacos humanos y no miocitos humanos, en el que 20 a 80% de la mezcla celular total son miocitos cardiacos;

en el que la mezcla de reconstitución tiene un pH de 7,0 a 7,8, preferiblemente 7,1 a 7,7, más preferiblemente 7,2 a 7,6, aún más preferiblemente 7,3 a 7,5, y lo más preferiblemente aproximadamente 7,4;

5 (ii) cultivar la mezcla de reconstitución sin suero en dicho uno o más moldes, mediante lo cual se permite que la mezcla de reconstitución sin suero se condense durante al menos 15 min, preferiblemente 0,25-3h, y más preferiblemente durante 0,5-1,5h,

(iii) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (ii) en dicho uno o más moldes en un medio de cultivo EHM sin suero hasta que la mezcla se condensa hasta al menos 50% (preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, aún más preferiblemente al menos 70%, y lo más preferiblemente al menos 75%) de su espesor original,

10 en el que dicho medio de cultivo EHM comprende

(a) un medio basal que comprende 0,5-3 mmoles/L de Ca^{2+} (preferiblemente 1-2,5 mmoles/L, más preferiblemente aproximadamente 2 mmoles/L);

(b) un suplemento sin suero como se define en (i)(b);

15 (c) 0,5-10 mmoles/L de L-glutamina (preferiblemente 1-7 mmoles/L, más preferiblemente 2-6 mmoles/L, aún más preferiblemente 3-5 mmoles/L, todavía más preferiblemente aproximadamente 2 mmoles/L);

(d) 0,01-1,0 mmoles/L de ácido ascórbico (preferiblemente 0,05-1,0 mmoles/L, más preferiblemente 0,1-0,5 mmoles/L, aún más preferiblemente 0,2-0,4 mmoles/L, todavía más preferiblemente aproximadamente 0,3 mmoles/L);

20 (e) 1-100 ng/ml de IGF-1 (preferiblemente 2-90 ng/ml, más preferiblemente 3-80 ng/ml, aún más preferiblemente 4-70 ng/ml, todavía más preferiblemente 5-60 ng/ml, más preferiblemente 6-50 ng/ml, más preferiblemente 7-40 ng/ml, más preferiblemente 8-30 ng/ml, más preferiblemente 9-20 ng/ml, tal como aproximadamente 10 ng/ml); y

(f) 1-10 ng/ml de TGF β 1 (preferiblemente 1-9 ng/ml, más preferiblemente 2-8 ng/ml, aún más preferiblemente 3-7 ng/ml, lo más preferiblemente 4-6 ng/ml, y aún lo más preferiblemente aproximadamente 5 ng/ml);

25 (iv) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (iii) bajo estiramiento mecánico en un medio de cultivo EHM sin suero como se define en la etapa (iii) (a)-(f), mediante lo cual se forma EHM generador de fuerza.

El medio esencial mínimo en la etapa (i) puede seleccionarse de medio de Iscove, α MEM, DMEM, y RPMI. En una realización preferida, el medio basal es medio de Iscove o α MEM. En una realización más preferida, el medio basal es medio de Iscove. Sin embargo, puede usarse cualquier medio mínimo adecuado en el método. Las recetas de medios esenciales mínimos adecuados se proporcionan en la presente memoria o están disponibles públicamente, por ejemplo, en catálogos de la ATCC.

30 Preferiblemente, el suplemento sin suero de la etapa (i) comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en vitamina A, D-galactosa, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, y putrescina. Estos componentes contribuyen a la viabilidad de las células. Las concentraciones adecuadas de los respectivos componentes son conocidas para el experto en la técnica o pueden determinarse fácilmente usando medidas rutinarias.

35 Para el suplemento sin suero, referido en componente (b) de la etapa (i), puede usarse suplemento B27® o suplemento B27® menos insulina disponibles comercialmente. Alternativamente, puede usarse el suplemento personalizado como se muestra en la Tabla 2 siguiente. En una realización preferida, el suplemento B27® o el suplemento B27® menos insulina usado como componente (b) de la etapa (i) del método anterior, se aplica en una cantidad de 2-6% (v/v). Más preferiblemente, el suplemento B27® o el suplemento B27® menos insulina usado como componente (b) de la etapa (i) del método anterior, se aplica en una cantidad de 4% (v/v).

40 Además, dicha mezcla de reconstitución de la etapa (i) comprende preferiblemente 0,3-0,5 mg de colágeno por $1,5 \times 10^6$ de mezclas celulares de miocitos cardiacos y no miocitos. Más preferiblemente, dicha mezcla de reconstitución de la etapa (i) comprende aproximadamente 0,4 mg de colágeno por $1,5 \times 10^6$ de mezclas celulares de miocitos cardiacos y no miocitos

45 El colágeno en el componente (c) de la mezcla de reconstitución de la etapa (i) es preferiblemente de grado médico y se selecciona del grupo que consiste en colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo V, y una mezcla de éstos. En una realización más preferida, el componente (c) de la mezcla de reconstitución de la etapa (i) comprende al menos 90% de dicho colágeno es colágeno tipo I. Sin embargo, dicho colágeno también puede comprender además uno o más componentes de la matriz extracelular seleccionados del grupo que consiste en elastina, laminina, entactina, nidógeno, proteoglicano, y fibronectina. Habitualmente, la composición exacta del colágeno dependerá del origen del que se obtiene. El colágeno es preferiblemente de origen humano, pero también se contempla el origen bovino, u origen marino, tal como origen en algas o peces.

El desarrollo de miocardio humano por ingeniería tisular funcional (es decir, generador de fuerza), definido, sin suero, para terapia cardíaca regenerativa potencial requiere superar varios obstáculos. Tiene una importancia crítica una fuente fiable de células cardíacas humanas. Hasta la fecha, las células madre pluripotentes humanas han surgido como la fuente principal de célula cardíaca humana. Las células madre pluripotentes son capaces de diferenciarse en cada tipo celular del cuerpo. Como tales, las células madre pluripotentes humanas ofrecen una oportunidad única para obtener *bona fide* células cardíacas humanas. Actualmente, las células pluripotentes más utilizadas son células madre embrionarias (ESC) o células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las líneas de ESC humanas se establecieron por primera vez por Thomson y colaboradores (Thomson et al. Science 282: 1145-1147 (1998). La investigación con ESC humanas ha permitido recientemente el desarrollo de una nueva tecnología para reprogramar las células del cuerpo en una célula semejante a ES. Esta tecnología fue liderada por Yamanaka y colaboradores en 2006 (Takahashi y Yamanaka Cell 126: 663-676 (2006). Las células pluripotentes inducidas (iPSC) resultantes muestran un comportamiento muy similar al de ESC y, de forma importante, también son capaces de diferenciarse en cada célula el cuerpo. La diferenciación cardíaca de las ESC e iPSC ocurre en cultivos de cuerpo embriode (Schroeder et al. Biotechnol Bioeng 92: 920-933 (2005) como un evento más o menos estocástico dando lugar a poblaciones celulares que contienen 5-20% *bona fide* de cardiomiocitos (Kehat et al. J Clin Invest 108: 407-414 (2001); Mummery et al. Circulation 107: 2733-2740 (2003); Xu et al. Circ Res 91: 501-508 (2002). Además, se ha reportado que las células madre partenogénicas también son probablemente adecuadas para la producción de EHM (Didié et al. J Clin Invest. doi:10.1172/JCI66584). De acuerdo con esto, en una realización preferida, los miocitos cardíacos son miocitos cardíacos humanos. Preferiblemente, dichos miocitos cardíacos se derivan de células madre embrionarias, en la que la célula no se produce usando un proceso que implica modificar la identidad genética de la línea germinal de los seres humanos o que implica el uso de un embrión humano para propósitos industriales o comerciales. En una realización alternativa, los miocitos cardíacos se derivan de células pluripotentes inducidas, células madre partenogénicas, o células madre adultas, como se ha descrito anteriormente.

Recientemente, se han descrito varios protocolos dirigidos por citoquinas, sin suero, para diferenciaciones cardíacas más eficientes (Burridge et al. Cell Stem Cell 10: 16-28 (2012) dando lugar a cultivos que contienen hasta 98% de cardiomiocitos (Lian et al. Proc Natl Acad Sci USA (2012). De acuerdo con esto, en otra realización preferida, los miocitos cardíacos pueden obtenerse por diferenciación sin suero. Por otra parte, los miocitos cardíacos también pueden derivar de células madre de primates no humanos, miocitos cardíacos fetales o neonatales.

Se ha demostrado que es ventajoso proporcionar los miocitos cardíacos mezclados con células de una o más clases de células seleccionadas del grupo de no miocitos, tales como fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, y células madre mesenquimales. Por lo tanto, preferiblemente, la mezcla de miocitos cardíacos contiene 20-80% de miocitos cardíacos, más preferiblemente 30-70% de miocitos cardíacos, aún más preferiblemente 40-60% de miocitos cardíacos, y lo más preferiblemente aproximadamente 50% de miocitos cardíacos, en el que los no miocitos son fibroblastos o células endoteliales. De hecho, es una realización particularmente preferida que los no miocitos son fibroblastos. Los no miocitos adecuados pueden identificarse por la expresión de, por ejemplo, el marcador de superficie CD90. Las células adecuadas pueden identificarse, por ejemplo, usando técnicas tales como tinción inmune o separación celular activada por fluorescencia (FACS). Los EHM que resultan de dicha mezcla generan habitualmente una fuerza mayor.

Preferiblemente, los miocitos cardíacos se proporcionan en la etapa (i) en una concentración celular de al menos $2,7 \cdot 10^5$ por ml. Sin embargo, en una realización más preferida, los miocitos cardíacos se proporcionan en la etapa (i) en una concentración celular de al menos $2,9 \cdot 10^6$ por ml, aún más preferiblemente en una concentración celular de al menos $3,1 \cdot 10^6$ por ml, y en una realización lo más preferida en una concentración celular de al menos $3,3 \cdot 10^6$ por ml.

El molde al que se hace referencia en el método puede tener cualquier forma adecuada que permita la incorporación del EHM en un huésped que lo necesita. Sin embargo, en una realización preferida, el molde tiene una forma de anillo, multiangular, disco o bolsa.

El cultivo celular se lleva a cabo usando procedimientos y equipos comunes conocidos generalmente en la técnica. Habitualmente, las condiciones de cultivo comprenden una temperatura en el intervalo de 30-40°C, preferiblemente 36-38°C, y lo más preferiblemente a aproximadamente 37°C, usando un incubador de cultivo celular humidificado en presencia de 5-10% CO₂.

Para el suplemento sin suero al que se hace referencia en el componente (b) de la etapa (iii), puede usarse suplemento B27® o suplemento B27® menos insulina disponibles comercialmente. Alternativamente, puede usarse el suplemento personalizado como se muestra en la Tabla 2 siguiente. En una realización preferida, el suplemento B27® o el suplemento B27® menos insulina usado como componente (b) de la etapa (iii) del método anterior, se aplica en una cantidad de 2-6% (v/v). Más preferiblemente, el suplemento B27® o el suplemento B27® menos insulina usado como componente (b) de la etapa (i) del método anterior, se aplica en una cantidad de 4% (v/v).

Además, el suplemento sin suero de la etapa (iii) puede comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en vitamina A, D-galactosa, L-carnitina, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, y putrescina. Como se ha indicado anteriormente, estos componentes contribuyen a la viabilidad de

las células. Las concentraciones adecuadas de los componentes respectivos son conocidas para el experto en la técnica o pueden determinarse fácilmente usando medidas rutinarias.

El medio basal comprendido en dicho medio de cultivo de EHM en la etapa (iii) puede seleccionarse de medio de Iscove, α MEM, DMEM, y RPMI. Como RPMI tiene habitualmente una menor concentración de calcio, puede ser necesario suplementar el medio basal RPMI según esto. Si se considera apropiado, el medio basal puede suplementarse con aminoácidos no esenciales. Si se usa α MEM como el medio basal, el medio de cultivo de EHM no necesita suplementarse adicionalmente con aminoácidos no esenciales. Los aminoácidos no esenciales están disponibles comercialmente como un suplemento combinado. Dicho suplemento comprende, por ejemplo, 750 mg/L de glicina, 890 mg/L de L-alanina, 1.320 mg/L de L-asparagina, 1.330 mg/L de ácido L-aspártico, 1.470 mg/L de ácido L-glutámico, 1.150 mg/L de L-prolina, y 1.050 mg/L de L-serina.

En una realización preferida, el medio basal comprendido en dicho medio de cultivo de EHM en la etapa (iii) es medio de Iscove o α MEM. En una realización más preferida, el medio basal comprendido en dicho medio de cultivo de EHM en la etapa (iii) es medio de Iscove. Sin embargo, puede usarse cualquier medio basal en el método. Las recetas de los medios esenciales mínimos adecuados se proporcionan en la presente memoria o están disponibles públicamente, por ejemplo, en catálogos de la ATCC.

Como se demuestra en los Ejemplos más adelante, el medio de cultivo de EHM sin suero comprende ventajosamente además VEGF, FGF, o tanto VEGF como FGF. Se ha mostrado que la adición de VEGF y/o FGF resulta en EHM que presenta una fuerza mayor.

Típicamente, VEGF se añade en una concentración de aproximadamente 5-20 ng/ml de VEGF, preferiblemente 6-18 ng/ml, más preferiblemente 7-16 ng/ml, aún más preferiblemente 8-14 ng/ml, lo más preferiblemente 9-12 ng/ml, y aún lo más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 10 ng/ml.

FGF se añade en una concentración de aproximadamente 5-20 ng/ml de FGF, preferiblemente 6-18 ng/ml, más preferiblemente 7-16 ng/ml, aún más preferiblemente 8-14 ng/ml, lo más preferiblemente 9-12 ng/ml, y aún lo más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 10 ng/ml.

En principio, puede usarse cualquier tipo de VEGF, FGF, IGF1 y TGF β 1, siempre que estos factores de crecimiento sean capaces de señalar a través de sus receptores correspondientes en la superficie celular de los miocitos cardiacos del EHM. Sin embargo, en una realización preferida, el VEGF es VEGF humano. En otra realización preferida, el FGF es FGF humano. En otra realización preferida más, el IGF1 es IGF1 humano. En otra realización más, el TGF β 1 es TGF β 1 humano. En una realización lo más preferida, todos de VEGF, FGF, IGF1, y TGF β 1 son humanos.

Habitualmente, el cultivo en la etapa (iii) se lleva a cabo durante al menos 3 días, preferiblemente durante aproximadamente 3 a aproximadamente 7 días.

En principio, el cultivo adicional en la etapa (iv) puede llevarse a cabo durante cualquier periodo de tiempo adecuado. Sin embargo, habitualmente, el cultivo adicional en la etapa (iv) se lleva a cabo durante un periodo de al menos 3-60 días, preferiblemente durante 4-30 días, más preferiblemente durante 5-20 días. En una realización lo más preferida, el cultivo adicional se lleva a cabo durante 7 días, ya que este periodo de tiempo representa un equilibrio óptimo de un tiempo de cultivo preferiblemente corto y un periodo de tiempo que es suficiente para resultar en EHM generadores de fuerza.

Habitualmente, la etapa (iv) del método anterior se lleva a cabo en un dispositivo de estiramiento, como se conoce generalmente en la técnica. Preferiblemente, el dispositivo de estiramiento aplica un estiramiento estático, fásico o dinámico al EHM. Más específicamente, el estiramiento mecánico puede ser (i) estático, (ii) dinámico, o (iii) flexible frente a una carga resiliente.

Como se demostrará adicionalmente más adelante, el EHM producido por el método anterior genera más de 0,01 mN de fuerza después de inducción con 3 mM calcio según se determina usando el método descrito en Zimmermann et al. Circ. Res. 90, 223-230 (2002), preferiblemente más de 0,1 mN de fuerza, más preferiblemente más de 0,2 mN de fuerza, y lo más preferiblemente más de 0,3 mN de fuerza después de inducción con 3 mM calcio según se determina usando el método descrito en Zimmermann et al. Circ. Res. 90, 223-230 (2002).

Otro protocolo detallado de la técnica anterior que es adecuado para servir como una base para el método mejorado descrito en la presente memoria se describe por Soong et al. Curr Prot Cell Biol. 55: 23.8.1-23.8.21 (2012), y en particular se hace referencia al "Protocolo Básico 2", y al "Protocolo de Soporte 2".

ES 2 615 396 T3

Componente	Protocolo básico	Protocolo de matriz	Protocolo sin suero
Matriz	Colágeno I de cola de rata (0,4 mg/EHM)	Colágeno bovino de grado médico (0,4 mg/EHM)	Colágeno bovino de grado médico (0,4 mg/EHM)
	Matrigel (10% v/v)		
Medio concentrado (2x)	2x DMEM	2x DMEM	2x DMEM
	20% suero de caballo	40% FBS	8% B27 u 8% B27 menos insulina o suplemento con suero personalizado (2x)
	4% extracto de embrión de pollo		
	200 U/ml de Penicilina 200 mg/ml de Estreptomicina	200 U/ml de Penicilina 200 mg/ml de Estreptomicina	200 U/ml de Penicilina 200 mg/ml de Estreptomicina
Medio de cultivo	Iscove	Iscove	Medio basal (Iscove, α MEM, RPMI), que comprende 1-2 mmoles/L de Ca^{2+}
	20% FBS	20% FBS	4% B27 ó 4% B27 menos insulina o suplemento con suero personalizado
	1% aminoácidos no esenciales	1% aminoácidos no esenciales	1% aminoácidos no esenciales, omitir si α MEM
	2 mmoles/L de L-glutamina	2 mmoles/L de L-glutamina	2 mmoles/L de L-glutamina, omitir si α MEM o si RPMI
	0,3 mmoles/L de ácido ascórbico	0,3 mmoles/L de ácido ascórbico	0,3 mmoles/L de ácido ascórbico, omitir si α MEM
	100 μ moles/l de β -mercaptoetanol	100 μ moles/l de β -mercaptoetanol	0,05% suplemento de ácidos grasos
			20 ng/ml de IGF
			10 ng/ml de VEGF
			10 ng/ml de FGF
			5 ng/ml de TGFb1 día 0-3
	100 U/ml de Penicilina 100 mg/ml de Estreptomicina	100 U/ml de Penicilina 100 mg/ml de Estreptomicina	100 U/ml de Penicilina 100 mg/ml de Estreptomicina

Tabla 1: Comparación de protocolos para la generación de EHM humano.

ES 2 615 396 T3

Sustancia	Concentración final	25x	Proveedor
Albúmina	5 mg/ml	125 mg/ml	Sigma, A9511
Transferrina	10 µg/ml	250 µg/ml	Sigma, T0665
Etanolamina-HCl	2 µg/ml	50 µg/ml	Sigma, E6133
Selenito de sodio	0,032 µg/ml	0,8 µg/ml	Sigma, S5361
L-carnitinaHCl	4 µg/ml	100 µg/ml	Sigma, C0283
Hidrocortisona	1 µg/ml	25 µg/ml	Sigma, H2270
Suplemento de ácidos grasos	0,5 µg/ml	12,5 µg/ml	Sigma, F7050
Triyodo-L-tironina	0,04 µg/ml	0,1 µg/ml	Sigma, T 6397

Preparar 25x en agua cualificada para cultivo celular

Tabla 2: Suplemento personalizado para reemplazar a B27.

Sustancia	Concentración (mg/l)	Sustancia	Concentración (mg/l)
NaCl	4.505	L-serina	42
KCl	330	L-valina	94
NaH ₂ PO ₄	125	L-cisteína	70
MgSO ₄ •7H ₂ O	200	L-asparagina	25
CaCl ₂ •2H ₂ O	218,6	ácido L-aspártico	30
KNO ₃	0,076	L-alanina	25
Na ₂ SeO ₃	0,0173	ácido L-glutámico	75
D-glucosa	4.500	L-prolina	40
HEPES	5.958	Biotina	0,013
NaHCO ₃	3.024	Vitamina B12	0,013
Rojo fenol	15	Amida del ácido nicotínico	4
Na-piruvato	110	Cloruro de colina	4
L-arginina•HCl	84	D-Ca-pantotenato	4
L-histidina•HCl•H ₂ O	42	Piridoxal•HCl	4
Glicina	30	Tiamina•HCl	4
L-isoleucina	105	Riboflavina	0,4
L-lisina•HCl	146	Ácido fólico	4
L-metionina	30	Mio-inositol	7,2
L-fenilalanina	66		
L-leucina	105		
L-treonina	95		

ES 2 615 396 T3

Sustancia	Concentración (mg/l)	Sustancia	Concentración (mg/l)
L-triptófano	16		
L-tirosina•2Na	104,2		

Tabla 3: Formulación del medio basal de Iscove sin glutamina (Biochrom).

Componentes	Peso molecular	Concentración (mg/L)
<i>Aminoácidos</i>		
Glicina	75	10
L-Alanil-Glutamina	217	446
L-Arginina	174	200
L-Asparagina	132	50
Ácido L-Aspártico	133	20
L-Cistina	240	50
Ácido L-Glutámico	147	20
L-Histidina	155	15
L-Hidroxiprolina	131	20
L-Isoleucina	131	50
L-Leucina	131	50
Hidrocloruro de L-Lisina	183	40
L-Metionina	149	15
L-Fenilalanina	165	15
L-Prolina	115	20
L-Serina	105	30
L-Treonina	119	20
L-Triptófano	204	5
L-Tirosina	181	20
L-Valina	117	20
<i>Vitaminas</i>		
Biotina	244	0,2
Cloruro de colina	140	3
D-Calcio pantotenato	477	0,25
Ácido Fólico	441	1
Niacinamida	122	1
Ácido Para-Aminobenzoico	137	1
Hidrocloruro de Piridoxina	206	1

ES 2 615 396 T3

Componentes	Peso molecular	Concentración (mg/L)
Riboflavina	376	0,2
Hidrocloruro de Tiamina	337	1
Vitamina B12	1.355	0,005
i-Inositol	180	35
<i>Sales inorgánicas</i>		
Nitrato de calcio (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236	100
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	246	100
Cloruro de potasio (KCl)	75	400
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	84	2.000
Cloruro de sodio (NaCl)	58	6.000
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	142	800
<i>Otros componentes</i>		
D-Glucosa (Dextrosa)	180	2.000
Glutación (reducido)	307	1
Rojo fenol	376,4	5

Tabla 4: Medio basal RPMI (Invitrogen).

Componentes	Peso Molecular	Concentración (mg/L)
<i>Aminoácidos</i>		
Glicina	75	50
L-Alanina	89	25
L-Alanil-L-Glutamina	203	406
L-Arginina	211	105
L-Asparagina-H ₂ O	132	50
Ácido L-aspártico	133	30
Hidrocloruro de L-cisteína	158	100
L-Cistina	240	24
Ácido L-Glutámico	147	75
L-Histidina	155	31
L-Isoleucina	131	52,4
L-Leucina	131	52,4

ES 2 615 396 T3

Componentes	Peso Molecular	Concentración (mg/L)
L-Lisina	146	58
L-Metionina	149	15
L-Fenilalanina	165	32
L-Prolina	115	40
L-Serina	105	25
L-Treonina	119	4
L-Triptófano	204	10
L-Tirosina	181	36
L-Valina	117	46
<i>Vitaminas</i>		
Ácido Ascórbico	176	50
Biotina	244	0,1
Cloruro de colina	140	1
D-Calcio pantotenato	477	1
Ácido Fólico	441	1
Niacinamida	122	1
Hidrocloruro de piridoxal	204	1
Riboflavina	376	0,1
Hidrocloruro de tiamina	337	1
Vitamina B12	1.355	1,36
i-Inositol	180	2
<i>Sales inorgánicas</i>		
Cloruro de calcio (CaCl ₂ -2H ₂ O)	147	264
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	246	200
Cloruro de potasio (KCl)	75	400
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	84	2.200
Cloruro de sodio (NaCl)	58	6.800
Fosfato de sodio monobásico (Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O)	156	158
<i>Otros componentes</i>		
D-Glucosa (Dextrosa)	180	1.000
Ácido Lipoico	206	0,2
Rojo fenol	376,4	10
Piruvato de Sodio	110	110

Tabla 5: Formulación del medio basal α MEM (Invitrogen).

Sustancia	Concentración	Proveedor
Iscove		Biochrom, F0465
Suplemento B27 o suplemento B27 menos insulina o suplemento personalizado	4%	Invitrogen, 17504044 ó 0050129SA
Aminoácidos no esenciales	1%	Invitrogen, 11140035
L-Glutamina	2 mmoles/L	Invitrogen 25030-081
Penicilina/Estreptomina-	100 U/ml/100 mg/ml	Invitrogen, 15070-063
Ácido ascórbico	0,3 mmoles/L	Sigma, A8960
hFGF	10 ng/ml	Peprtech, AF-100-18B
hIGF	20 ng/ml	Peprtech, AF-100-11
hVEGF	10 ng/ml	Peprtech, AF-100-20
hTGF- β 1, día 0-3	5 ng/ml	Peprtech, 100-21
Colágeno bovino, DM6 soluble en ácido	0,8 mg/ml	Devros Medical

Tabla 6: Medio definido, sin suero, para la generación de EHM.

Sustancia	Concentración	Proveedor
α MEM		Invitrogen, 32561-029
Suplemento B27 o suplemento B27 menos insulina o suplemento personalizado	4%	Invitrogen, 17504044 ó 0050129SA
Penicilina/Estreptomina-	100 U/ml/100 mg/ml	Invitrogen, 15070-063
hFGF	10 ng/ml	Peprtech, AF-100-18B
hIGF	20 ng/ml	Peprtech, AF-100-11
hVEGF	10 ng/ml	Peprtech, AF-100-20
hTGF- β 1, día 0-3	5 ng/ml	Peprtech, 100-21
Colágeno bovino, DM6 soluble en ácido	0,8 mg/ml	Devros Medical

Tabla 7: Medio definido, sin suero, alternativo para la generación de EHM.

5

Descripción de las figuras

Figura 1. Formación de hEHM. hEHM después de 10 días en cultivo (3 días en el molde de vaciado seguido de 7 días en un espaciador personalizado; día de cultivo 3+7). Barra: 1 mm (.

10

Figura 2. Caracterización de la función contráctil de hEHM. (A) Respuesta cronotrópica después de estimulación con compuestos que elevan el AMPc (Iso: estimulación beta-adrenérgica; IBMX: inhibición de fosfodiesterasa, n=6/grupo). (B) Respuesta inotrópica de hEHM a concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de hES2 (n=12), hES3 (n=12) e iPS I2 (n=3) (C) Respuesta inotrópica de hEHM (hES2) a estimulación con isoprenalina (triángulos) y carbacol (cuadrados). Inserto: espasmos normalizados a bajo calcio (gráfico inferior), estimulación con isoprenalina (gráfico superior) y carbacol (gráfico medio). (D) Relajación de hEHM con estimulación con isoprenalina

(triángulos) y carbacol (cuadrados). Inserto: espasmos normalizados * $P < 0,05$ frente a los valores de la línea base (A: ensayo de la *t* de Student apareado, de dos colas; C, D: ANOVA seguido de ensayo *post hoc* de Dunnett).

Figura 3. Importancia de los no miocitos para la formación de EHM. (A) Fuerza normalizada comparada con porcentaje de cardiomiocitos (células actinina+) de EHM generado a partir de la línea hES2 (círculos: protocolo de diferenciación cardiaca en monocapa (Hudson, et al. *Stem Cells Dev* 21: 1513-1523 (2012)), -cuadrados: protocolo de diferenciación cardiaca EB (Yang et al. *Nature* 453: 524-528 (2008))) y línea iPS BJ (triángulos). (B) Fuerza contráctil de hEHM generado con 100% de cardiomiocitos (CM 100%) y una mezcla de 70% de cardiomiocitos y 30% de fibroblastos cardiacos (CM/CF 70/30%), $n=1$.

Figura 4. Matriz de hidrogel compatible con GMP. (A) Fuerza contráctil de hEHM preparados con colágeno de rata (0,4 mg/EHM, $n=12$) o colágeno bovino (0,4 mg/EHM, $n=14$) a una concentración de calcio extracelular de 2 mmoles/L. (B) Fuerza contráctil a 2 mmoles/L de calcio extracelular de hEHM preparados con el "Protocolo original" (colágeno de rata, Matrigel®, $n=12$) y el "Protocolo de matriz" (colágeno bovino, sin Matrigel®, $n=9$). Por favor, refiérase también a la Tabla 1. (C) Fuerza contráctil a 2 mmoles/L de calcio extracelular de hEHM preparados con colágeno bovino (bov.) sólo, colágeno bovino más Matrigel (10% v/v), colágeno bovino más fibronectina (5 µg/EHM), y colágeno bovino más fibronectina (5 µg/EHM) más laminina (5 µg/EHM), $n=4$ /grupo.

Figura 5. Cribado de medio basal y suplemento de crecimiento sin suero frente a Iscove con 20% de suero. (A) F.I.t.r.: Cambio en la muerte celular, porcentaje de cardiomiocitos (porcentaje de CM), fluorescencia media de actinina de cardiomiocitos (maduración de CM), tamaño de cardiomiocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de CM) y tamaño de no miocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de NM) de medio sin suero basado en medio basal de Iscove, RPMI y aMEM (véase también la Tabla 2-4) comparado con medio EHM que contiene suero (véase también la Tabla 1).

(B) F.I.t.r.: Cambio en la muerte celular, porcentaje de cardiomiocitos (porcentaje de CM), fluorescencia media de actinina de cardiomiocitos (maduración de CM), tamaño de cardiomiocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de CM) y tamaño de no miocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de NM) de medio sin suero con 2% y 4% de B27 más insulina (B27+) y menos insulina (B27-) comparado con medio EHM que contiene suero (véase también la Tabla 1).

Figura 6. Cribado de factores de crecimiento peptídicos y suplemento de ácidos grasos. (A) Factores considerados para medio EHM definido, sin suero. F.I.t.r.: Cambio en la muerte celular, porcentaje de cardiomiocitos (porcentaje de CM), fluorescencia media de actinina de cardiomiocitos (maduración de CM), tamaño de cardiomiocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de CM) y tamaño de no miocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de NM) por factores de crecimiento indicados y suplemento de ácidos grasos comparado con medio sin suero sin el factor. (B) Factores no considerados para medio EHM definido, sin suero. F.I.t.r.: Cambio en la muerte celular, porcentaje de cardiomiocitos (porcentaje de CM), fluorescencia media de actinina de cardiomiocitos (maduración de CM), tamaño de cardiomiocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de CM) y tamaño de no miocitos basado en el área de dispersión lateral (tamaño de NM) por factores de crecimiento indicados y suplemento de ácidos grasos comparado con medio sin suero sin el factor.

Figura 7. Generación de EHM definida, sin suero a partir de células hESC. (A) Fuerza contráctil de hEHM (hES2) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio que contiene suero (Suero), y medio basado en Iscove sin suero (SF-IMDM, véase también la Tabla 5), medio basado en aMEM sin suero (SF-aMEM, véase también la Tabla 6), y medio basado en RPMI sin suero (SF-RPMI). La CE_{50} respectiva para calcio, $n=15/5/6/7$ para Suero/SF-IMDM, SF-aMEM, SF-RPMI, n.d. no determinada. (B) Inmunotinción de hEHM sin suero, que muestra propiedades típicas de músculo cardíaco (haces musculares). La tinción se realizó con un anticuerpo frente a α -actinina sarcomérica y con DAPI para tinción nuclear. (C) Porcentaje de cambio en fuerza después de estimulación adrenérgica con 1 µM isoprenalina de EHM que contiene suero (Suero), y EHM basado en Iscove sin suero (SF-IMDM), EHM basado en aMEM sin suero (SF-aMEM), $n=15/5/6$, * $p < 0,05$ (D) Porcentaje de cambio en fuerza después de estimulación muscarínica con 10 µM carbacol de EHM que contiene suero (Suero), y EHM basado en Iscove sin suero (SF-IMDM), EHM basado en aMEM sin suero (SF-aMEM), $n=15/5/6$. Barra: 20 µm.

Figura 8. Efecto de calcio en la fuerza de hEHM sin suero. A) Fuerza contráctil de hEHM (hES2) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio RPMI (~0,4 mM calcio, $n=2$), y medio RPMI con la adición de 0,8 mM CaCl (concentración final de calcio libre ~1,2 mM calcio, $n=2$), B) Respuesta a 1 µM isoprenalina de hEHM sin suero cultivado en medio RPMI o RPMI+calcio.

Figura 9. Efecto de TGFb1 en la fuerza de hEHM. (A) Fuerza contráctil de hEHM (IPS BJ) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio sin suero (SF), y medio sin suero con 5 ng/ml de TGFb1 del día de cultivo 0-3 ($n=4$ /grupo, * $p < 0,05$). (B) Comparación de la fuerza contráctil de EHM humano (hES2) en medio sin suero con tratamiento con TGFb1 del cultivo 0-3 (SF+TGFb1 día 0-3) y día de cultivo 0-10 (SF+TGFb1 día 0-10, $n=5$ /grupo).

Figura 10. Efecto de FGF y VEGF en la fuerza de hEHM. Fuerza contráctil de hEHM (hES2) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio sin suero (SF, n=3), medio sin suero con 10 ng/ml de FGF-2 (SF+FGF, n=3), y medio sin suero con 10 ng/ml de VEGF (SF+VEGF, n=3), *p<0,05 SF+FGF frente a SF.

5 Figura 11. Efecto de la concentración del suplemento B27 en la fuerza de hEHM. Fuerza contráctil de hEHM (hES2) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio que contiene suero (Suero), y medio sin suero con 2% B27 (SF-2% B27) y medio sin suero con 4% B27 (SF-4% B27), n=17/9/11, *p<0,05 frente a 2% B27.

10 Figura 12. Efecto de la composición de B27 en la fuerza de hEHM. Fuerza contráctil de hEHM (hES2) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio que contiene suero (n=9), medio sin suero con B27 completo (n=5), medio sin suero con B27 menos antioxidantes (n=5), y medio sin suero con B27 menos insulina (n=5).

15 Figura 13. Reemplazo de B27 por suplemento personalizado en hEHM de células hES e iPS. (A) Fuerza contráctil de hEHM (hES2) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio que contiene suero (n=3), medio sin suero con B27 menos insulina (B27-insulina, n=5), y medio sin suero con suplemento personalizado (CMS; n=3). (B) Fuerza contráctil de hEHM de células iPS (BJ) con concentraciones crecientes de calcio extracelular, comparación de medio que contiene suero (n=8), medio sin suero con B27-insulina (n=8), y medio sin suero con suplemento personalizado (CMS; n=4).

20 Se pretende que los ejemplos siguientes ilustren adicionalmente, pero no limiten, la invención. Los ejemplos comprenden varias características técnicas, y se apreciará que la invención también se refiere a las combinaciones de las características técnicas presentadas en esta sección de ejemplos.

Ejemplos de referencia

Materiales

25 Los materiales usados en la presente memoria están disponibles comercialmente. Por ejemplo, DMEM, RPMI, α MEM (No. de cat. 32561-029), estreptomycin, penicilina, y B27 se pueden obtener de Invitrogen; el colágeno bovino de grado médico está disponible en Devros Medical; el suplemento de ácidos grasos puede pedirse a Sigma (No. de cat. F7050); y los distintos factores de crecimiento están disponibles en Peprotech (FGF2, AF-1 β -18B; IGF-1, AF-100-11; TGF β 1, 100-21).

Métodos

Líneas celulares ESC e iPS humanas y cultivo

30 Los inventores utilizaron H9.2 (Technion, Haifa, Israel), hES3 (Embryonic Stem Cell International, Singapur) y hES3-ENVY transgénica (Costa, M., et al. *Nat Methods* 2: 259-260 (2005)) así como la línea hES2 (McEwen Centre for Regenerative Medicine, Toronto, Canadá; Yang et al. *Nature* 453: 524-528 (2008)) en el presente estudio (aprobación por el Robert-Koch-Institute a W.-H.Z.: permiso #12; número de referencia: 1710-79-1-4-16). Los EB diferenciados se transportaron a Hamburgo/Goettingen a temperatura ambiente y llegaron en 72-96 hrs. Las líneas iPS fueron de Toronto (iPS BJ) y Goettingen (iPS I2, Streckfuss-Bomeke et al. *Eur Heart J* (2012) doi: 10.1093/eurheartj/ehs203, e iPS Sendai).

35 Los EB se digirieron con colagenasa B (1 mg/ml; H9.2), colagenasa I (2 mg/ml) y/o tripsina/EDTA (0,25%/1 mmol/l; hES3, hES3-ENVY, hES2, iPS NJ, iPS I2) como se describe en otro lugar (Kehat et al. *J Clin Invest* 108: 407-414 (2001); Mummery et al. *Circulation* 107: 2733-2740 (2003); Xu et al. *Circ Res* 91: 501-508 (2002); Yang et al. *Nature* 453: 524-528 (2008); Passier et al. *Stem Cells* 23: 772-780 (2005). Los cardiomiocitos se contaron en alícuotas representativas de células enzimáticamente dispersadas después de tinción de tropomiosina o actinina sarcomérica.

Construcción de músculo cardíaco humano preparado por ingeniería (hEHM) básica

45 Los inventores construyeron hEHM usando un protocolo modificado de ingeniería de EHM (Zimmermann et al. *Circ Res* 90: 223-230 (2002)). Brevemente, se prepararon EHM (volumen de reconstitución: 450 μ l) pipeteando una mezcla que contenía derivados ESC recién dispersados (1×10^4 - 15×10^6 células en medio Iscove con 20% suero fetal de ternera, 1% aminoácidos no esenciales, 2 mmoles/l de glutamina, 100 μ moles/l de β -mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomycin), colágeno tipo I con pH neutralizado de colas de rata (0,4 mg/EHM), Matrigel™ (10% v/v; Becton Dickenson o tebu), y medio de cultivo que contenía suero concentrado (2 \times DMEM, 20% suero de caballo, 4% extracto de embrión de pollo, 200 U/ml de penicilina, y 200 mg/ml de estreptomycin) en moldes circulares (diámetro interno/externo: 2/4 mm; altura: 5 mm) (Tabla 1). Los hEHM condensaron rápidamente en los moldes de vaciado y se transfirieron a dispositivos de estiramiento estático (110% de longitud de distensión) (Zimmermann et al. *Nat Med* 12: 452-458 (2006)) en el día de cultivo 3. El medio se cambió cada dos días. El cultivo de hEHM bajo estiramiento se realizó durante 7 días.

Otro protocolo detallado de la técnica anterior que es adecuado para servir como una base para el método mejorado descrito en la presente memoria se describe por Soong et al. *Curr Prot Cell Biol.* 23.8.1-23.8.21 (2012), y, en particular, se hace referencia al "Protocolo Básico 2", y al "Protocolo de Soporte 2".

Retirada y reemplazo de los componentes de la matriz xenogénicos

- 5 Se estableció un protocolo con componentes xenogénicos reducidos (Protocolo de matriz, Tabla 1) para permitir hEHM pre-GMP. Las células se reconstituyeron en una mezcla de colágeno bovino con pH neutralizado (Devros Medical, 0,4 mg/EHM), medio de cultivo que contenía suero concentrado (2× DMEM, 40% suero fetal de ternera, 200 U/ml de penicilina, y 200 mg/ml de estreptomina) y se cultivó en medio Iscove con 20% suero fetal de ternera, 1% aminoácidos no esenciales, 2 mmoles/l de glutamina, 0,3 mmoles/l de ácido ascórbico, 100 μmoles/l de β-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina, y 100 μg/ml de estreptomina.

Retirada y reemplazo de los componentes del medio xenogénicos

- 15 Para generar EHM completamente definido, sin suero, las células se reconstituyeron en una mezcla de colágeno bovino con pH neutralizado (Devros Medical, 0,4 mg/EHM), medio sin suero concentrado (2× DMEM, 8% B27, 200 U/ml de penicilina, y 200 mg/ml de estreptomina) y se cultivaron en medio Iscove con 4% B27 completo, 1% aminoácidos no esenciales, 2 mmoles/l de glutamina, 0,3 mmoles/l de ácido ascórbico, 20 ng/ml de IGF-1, 10 ng/ml de FGF2, 10 ng/ml de VEGF, 5 ng/ml de TGFβ1 (día de cultivo 0-3 sólo), y 100 U/ml de penicilina, y 100 μg/ml de estreptomina (Protocolo sin suero, Tabla 1). El suplemento B27 contiene vitaminas (Biotina, DL Alfa Tocoferol, Acetato DL Alfa-Tocoferol, Vitamina A), proteínas y enzimas (BSA, fracción V sin ácidos grasos, catalasa, insulina humana recombinante, transferrina humana, superóxido dismutasa), y otros componentes que soportan células (corticosterona, D-galactosa, etanolamina, glutatión (reducido), L-carnitina, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina, selenito de sodio, y T3 (triiodo-L-tironina). Cuando se indica, se comparó B27 completo (Invitrogen, A1486701) con B27 sin antioxidantes (Invitrogen, #10889038) y B27 sin insulina (Invitrogen, #0050129SA). El suplemento B27 se reemplazó por un suplemento personalizado que consistía en albúmina, transferrina, etanolamina, selenito de sodio, L-carnitina HCl, hidrocortisona, suplemento de ácidos grasos, y triiodo-L-tironina (Tabla 2).

Análisis de la función contráctil

- 30 Los inventores analizaron la fuerza de contracción y cinéticas de espasmo (tiempo de contracción: tiempo desde 50% a contracción máxima; tiempo de relajación: tiempo desde contracción máxima hasta 50% relajación) bajo condiciones isométricas como se ha descrito anteriormente (Zimmermann et al, *Circ Res* 90: 223-230 (2002)). La frecuencia de contracción se evaluó por microscopía óptica (contracciones espontáneas no estimuladas) inmediatamente después de retirar los EHM del incubador.

Citometría de flujo

- 35 Los EB cultivados en diferentes condiciones de medios se prepararon en una suspensión de células únicas como se ha descrito anteriormente. Las células se fijaron en 70% etanol enfriado en hielo bajo mezclado constante. Las células se tiñeron para actinina sarcomérica (Sigma) para marcar los cardiomiocitos y DAPI para analizar el contenido de ADN nuclear y para excluir los dobletes de células. Las células se operaron en un citómetro LSRII (BD). Se analizaron al menos 10.000 células vivas. Se analizaron los parámetros siguientes, (1) muerte celular (porcentaje de células en la fracción sub-G1), (2) porcentaje de cardiomiocitos y no miocitos (células positivas y negativas para actinina, respectivamente) (3) maduración de cardiomiocitos (fluorescencia media de actinina), (4) tamaño de cardiomiocitos y (5) no miocitos (basado en el área de dispersión lateral, SSC-A).

Análisis morfológicos

- 45 Los hEHM se fijaron en 4% formaldehído/1% metanol tamponado neutro, pH 7,4 para microscopía confocal de barrido láser (CLSM; sistema Zeiss 510 Meta LSM o Zeiss 710 LSM) respectivamente como se ha descrito anteriormente (Zimmermann et al. *Circ Res* 90: 223-230 (2002)). Para CLSM, los inventores prepararon secciones de vibratomo (100 μm; Leica VT1000 S) y las sometieron a marcaje fluorescente inmune con anticuerpos dirigidos frente a α-actinina sarcomérica (Sigma clon EA-53, 1:800; con anticuerpos secundarios apropiados). Los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 1 μg/ml).

Análisis estadístico

- 50 Los datos se presentan como media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron usando ensayos de la *t* de Student de dos colas apareados y no apareados o ANOVA seguido de ensayo *post-hoc* de Dunnett como se indica. Un valor de *P* < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Generación de músculo cardíaco humano preparado por ingeniería (hEHM)

Los EB-preparados en Haifa (H9.2;), Singapur (hES3 y hES3-ENVY; Costa et al. Nat Methods 2: 259-260 (2005)), y Toronto (hHES2; iPS)-se enviaron a Hamburgo/Göttingen por correo urgente a temperatura ambiente en un contenedor hermético relleno con medio de cultivo. La entrega se aseguró en 72-96 h. Después de la llegada, los EB se transfirieron a medio de cultivo fresco y se dejó que se recuperaran durante 24-48 h. En este tiempo, los EB recuperaron la actividad contráctil espontánea. Los EB fueron EB enzimáticamente dispersados y las suspensiones de células únicas resultantes se asignaron para la generación de hEHM o citohistología. Una serie inicial de experimentos exploró el número de cantidad de células necesaria por hEHM (1×10^4 - 15×10^6 células) y la utilidad de diferentes líneas de ESC (H9.2, hES2, hES3, hES3-ENVY) y líneas iPS (I2, BJ, Sendai) para la construcción de hEHM (n=67). El latido espontáneo de áreas con tamaño variable pudo observarse en todos los cultivos en las 48 h de vaciado de hEHM. Sin embargo, los hEHM generadores de fuerza sólo se formaron si se utilizaban $1,25$ - 15×10^6 células/EHM (Fig. 1). Dependiendo del tamaño del EHM, la densidad celular puede adaptarse fácilmente.

Función organotípica de hEHM

Los hEHM se contrajeron de forma estable y rítmica ($0,8 \pm 0,05$ Hz a 37°C ; n=14) durante al menos 3 semanas en cultivo. Los inventores realizaron una caracterización funcional detallada a los 10 días. La incubación con isoprenalina incrementó la frecuencia de latido espontáneo hasta $1,2 \pm 0,1$ Hz (n=6; $P < 0,01$ Fig. 2A). La inhibición adicional de fosfodiesterasa con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; $100 \mu\text{moles/l}$) causó un incremento adicional de la tasa de latido espontáneo hasta $1,6 \pm 0,1$ Hz (n=6; $P < 0,001$ Fig. 2A). Los hEHM desarrollaron fuerzas medias de espasmo máximas de $130 \pm 13 \mu\text{N}$ a $2,4 \text{ mmoles/l}$ de calcio (CE_{50} : $0,8 \pm 0,04 \text{ mmoles/l}$, n=17; Fig. 2B). La estimulación β -adrenérgica con $1 \mu\text{mol/l}$ de isoprenalina a sub- CE_{50} de calcio extracelular ($0,4 \text{ mmoles/l}$) incrementó la fuerza de contracción un $47 \pm 12\%$ (n=12; Fig. 2C) y acortó la relajación hasta $113 \pm 2,3 \text{ ms}$ (n=12; Fig. 2D).

Importancia de los no miocitos en la formación de EHM

Todas las líneas ESC y líneas iPS utilizadas aquí parecían ser adecuadas para la generación de hEHM. Para ensayar qué contenido de cardiomiocitos es óptimo para un tejido generador de fuerza, los inventores representaron gráficamente la fuerza desarrollada frente al porcentaje de cardiomiocitos. De forma interesante, se encontró una distribución en forma de campana con las fuerzas más altas desarrolladas a un porcentaje de cardiomiocitos de 40-80% (Fig. 3A).

Esta observación sugiere un papel crítico de los no miocitos para la formación de tejido apropiado. Para investigar esto, los inventores realizaron un experimento con cardiomiocitos humanos que se purificaron por el marcador de superficie CD172a (SIRP α) (Dubois et al. Nat Biotechnol 29: 1011-1018 (2011)). Los EHM generados a partir de cardiomiocitos purificados no formaron tejido generador de fuerza (Fig. 3B). El suplemento con 30% de fibroblastos cardiacos humanos, sin embargo, rindió un tejido más firme con una buena producción de fuerza. Estos resultados enfatizan que los no miocitos son vitales para la formación de tejido cardiaco y que estas células también necesitan el soporte bajo condiciones sin suero.

Generación de hEHM con matriz compatible con GMP

Los inventores construyeron inicialmente hEHM basados en un protocolo que los inventores habían desarrollado en un modelo de célula cardiaca de rata neonatal (Zimmermann et al. Biotechnol Bioeng 68: 106-114 (2000)). Este protocolo incluye varios componentes no humanos (incluyendo colágeno de rata, Matrigel, suero de caballo, suero fetal de ternera, y extracto de embrión de pollo) que son incompatibles con una "aplicación terapéutica" *in vivo*. Para abordar este problema, se realizó en primer lugar una serie de experimentos que ensayaban directamente si los componentes no humanos de la matriz de hEHM podían reducirse. El colágeno de rata se reemplazó por colágeno bovino de grado médico (GMP) sin pérdida de rendimiento (Fig. 4A). También, el Matrigel®, suero de caballo y extracto de embrión de pollo pudieron excluirse sin un impacto negativo en la formación y función de hEHM ("Protocolo de matriz", Fig. 4B, Tabla 1). El complementar el colágeno bovino con otras proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina y laminina, uno de los componentes principales de Matrigel®, no rindió un beneficio adicional (Fig. 4C).

Definición de medio sin suero para soportar la formación de hEHM

Para definir adicionalmente el cultivo de EHM humano y hacerlo compatible con GMP, los inventores consideraron reemplazar todos los componentes de suero no definidos con suplementos químicamente definidos. Para cribar para estos suplementos, los inventores introdujeron un algoritmo de cribado simplificado basado en cultivos 3D de cuerpo embrioide (EB) humano. Las ESC para este cribado se cultivaron en condiciones sin suero (Yang et al. Nature 453: 524-528 (2008); Kattman et al. Cell Stem Cell 8: 228-240 (2011)). La referencia para los cribados fue nuestro medio EHM que contenía suero (Tabla 1): (1) de Iscove, (2) 2 mmoles/L de L-glutamina, (3) 20% FBS, (4) 1% aminoácidos no esenciales, (5) $0,3 \text{ mmoles/L}$ de ácido ascórbico, (6) $100 \mu\text{moles/l}$ de β -mercaptoetanol, (7) 100 U/ml de penicilina/ 100 mg/ml de estreptomina. Como lecturas para el papel beneficioso o perjudicial del medio de cultivo basal y suplementos, se estableció un protocolo basado en citometría de flujo (Tiburcy et al. Circ Res 109: 1105-1114 (2011); incorporado en la presente memoria por referencia) para determinar (1) muerte celular (basado en contenido de ADN sub-G1), (2) contenido de cardiomiocitos (basado en la expresión de actinina), (3) maduración de

cardiomiocitos (basado en la fluorescencia media de actinina por cardiomiocito), (4) tamaño de los cardiomiocitos, y (5) tamaño de los no miocitos (basado en el área de dispersión lateral).

Los inventores cribaron en primer lugar tres formulaciones de medio basal (de Iscove, RPMI, α MEM: Tabla 3-5) con y sin suplemento con B27. B27 ha sido usado por varios grupos para la diferenciación de ESC e iPSC humanas (Burridge et al. *Cell Stem Cell* 10: 16-28 (2012)). El cribado demostró que B27 era esencial para la formación de EB independientemente del medio basal ensayado. El de Iscove y RPMI mostraron resultados comparables mientras α MEM pareció causar una muerte celular ligeramente más alta. Por otra parte, α MEM fue superior para la expresión de actinina de los cardiomiocitos (Fig. 5A).

Dados nuestros descubrimientos preliminares que muestran un rendimiento subóptimo de los EHM cultivados en presencia de RPMI basal (Fig. 7), los inventores continuaron el cribado con Iscove o α MEM como medio basal. Los inventores escrutaron a continuación la utilidad de B27 en su formulación estándar con y sin insulina. El suplemento con 4% B27 con insulina (concentración final 10 μ g/ml) mostró la muerte celular más baja y posiblemente un soporte de no miocitos mayor (el menor porcentaje de cardiomiocitos sugiere un desplazamiento a más no miocitos) comparado con B27 sin insulina y concentración más baja de suplemento B27 (2%) (Fig. 5B). Los inventores cribaron a continuación la utilidad de 6 factores de crecimiento peptídicos a concentraciones por encima de la CE_{50} y suplementos de ácidos grasos. PDGF-BB, CT-1 y Neuregulina-1 causaron una muerte celular sustancial mientras IGF-1 pareció proteger de muerte celular (Fig. 6A,B). TGF β 1, VEGF y los suplementos de ácidos grasos aumentaron la expresión de actinina de los cardiomiocitos individuales. FGF-2 soportó el crecimiento de los no miocitos e incrementó el tamaño celular de los cardiomiocitos (Fig. 6A). TGF β 2 no tuvo ningún efecto beneficioso (Fig. 6B). Todos los compuestos o combinaciones de éstos ensayados estaban implicados en el desarrollo cardíaco y generación de EHM (Naito et al. *Circulation* 114: 172-78 (2006); Shimajo et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H474-481 (2007); Vantler et al. *J Mol Cell Cardiol* 48: 1316-1323 (2010); Odiote et al. *Circ Res* 111: 1376-1385 (2012); Wollert y Chien *J Mol Med (Berl)* 75: 492-501 (1997); Price et al. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272: 424-433 (2003); Molin et al. *Dev Dyn* 227: 431-444 (2003); Corda et al. *Circ Res* 81: 679-687 (1997); Lopaschuk y Jaswal *J Cardiovasc Pharmacol* 56: 130-140).

El desarrollo de EHM se caracteriza por dos estadios. Inicialmente, hay una "fase de condensación" en la que las células aisladas se "asientan" en la matriz, reorganizándose éstas y la matriz lo que también puede estar acompañado de muerte celular sustancial. Este estadio se ve influido en gran medida por los no miocitos. El segundo estadio es la maduración del tejido bajo carga mecánica. Esta fase se caracteriza por crecimiento hipertrófico y maduración de los cardiomiocitos, alineamiento, desarrollo de fuerza incrementado, y estabilización de la matriz (Tiburcy et al. *Circ Res* 109: 1105-1114 (2011)).

Los inventores razonaron que según el estadio, pueden requerirse diferentes condiciones del medio. Para prevenir la muerte celular durante la fase de condensación, los inventores eligieron una combinación de componentes del medio que eran neutros o incluso redujeron la muerte celular en el cribado inicial. Éste es medio basal de Iscove, 4% B27, e IGF-1. También, la reorganización de la matriz y la condensación a través de no miocitos fue soportada por factores que incrementan el número y/o tamaño de los no miocitos (IGF-1, TGF-beta1, FGF-2, en el primer estadio). VEGF se añade para soportar la maduración de los cardiomiocitos (Tabla 5). Este medio se ensayó para su capacidad de soportar la formación de EHM generador de fuerza. Los EHM sin suero latieron de forma coherente a una frecuencia de latido espontáneo de 113 ± 12 bpm, n=7. Los EHM que contenían suero latieron significativamente más rápido (199 ± 8 bpm, n=8). Los inventores encontraron un desarrollo de fuerza máxima similar y sensibilidad a calcio comparado con el control que contenía suero (Fig. 7A). Ambos, el medio basal de Iscove y α MEM soportaron la formación de EHM con resultados comparables en fuerza contráctil. RPMI no soportó el tejido generador de fuerza (Fig. 7A, Tabla 5, 6). Morfológicamente, EHM sin suero contenía haces musculares bien desarrollados con cardiomiocitos alineados anisotrópicamente (Fig. 7B). De forma importante, el EHM sin suero respondió a estimulación adrenérgica y muscarínica como se esperaba para músculo cardíaco. De hecho, el α MEM EHM respondió significativamente mejor que los controles que contenían suero. (Fig. 7 C, D).

Los inventores establecieron la hipótesis de que un rendimiento insuficiente de medio RPMI era debido a la concentración de calcio libre menor de la fisiológica del medio RPMI (0,424 mmoles/L, Tabla 4). Para ensayar si esto era cierto, los inventores realizaron un experimento adicional para comparar el medio RPMI con medio RPMI con 0,8 mM CaCl añadido (concentración final de calcio libre 1,242 mmoles/L). Aunque EHM con RPMI apenas se contraían, el suplemento de calcio dio lugar a una fuerza máxima mensurable y a una capacidad de respuesta mejor a isoprenalina (Fig. 8). De hecho, la producción de fuerza máxima con RPMI suplementado fue comparable a medio IMDM o α MEM (Fig. 7A) lo que sugiere que se requiere un intervalo de ~1-2 mmoles/L de calcio para la función apropiada del tejido.

Para verificar los resultados del cribado inicial, los inventores ensayaron adicionalmente la influencia de factores críticos en la formación de EHM funcional. La adición de TGF β 1 desde el día 0 a 3 fue esencial, pero el tratamiento prolongado con TGF β 1 no rindió un beneficio adicional (Fig. 9A, B). Tanto FGF como VEGF fueron capaces de aumentar la generación de fuerza lo que confirma una contribución importante en la formación de tejido (Fig. 10).

El incremento en la concentración de suplemento B27 hasta 4% fue superior a 2% B27 (Fig. 11). Para ensayar qué componentes de B27 son esenciales para la función de EHM, los inventores realizaron en primer lugar un

5 experimento con diferentes formulaciones de B27 disponibles comercialmente. Los inventores compararon B27 completo con B27 sin insulina, y B27 menos antioxidantes. B27 menos antioxidantes tuvo un rendimiento comparable a B27 completo lo que sugiere que los antioxidantes no se requieren. De forma sorprendente, B27 menos insulina tuvo un rendimiento mejor que B27 completo, lo que implica que el suplemento con insulina tampoco se requiere (Fig. 12).

10 Tomando como base estos resultados, los inventores desarrollaron un suplemento de suero personalizado para reemplazar a B27 (Tabla 7). Cuando los inventores ensayaron este suplemento de suero personalizado frente a medio que contenía suero y medio sin suero con B27 menos insulina, los inventores encontraron un desarrollo de fuerza máxima comparable, lo que sugiere que B27 puede omitirse del cultivo de EHM sin suero y reemplazarse por suplemento de suero personalizado (Fig. 13A). Estos descubrimientos se confirmaron con hEHM de iPSC, demostrando utilidad para la generación de músculo cardíaco preparado por ingeniería definida a partir de diferentes fuentes de células madre pluripotentes. (Fig. 13B).

Conclusión

15 Este estudio demuestra por primera vez que puede generarse músculo cardíaco humano diferenciado, generador de fuerza, *in vitro* bajo condiciones sin suero completamente definidas. El protocolo funciona para músculo cardíaco derivado de células madre embrionarias (ESC) y pluripotentes inducidas (iPS).

20 Éste es un logro importante que permite futuros estudios *in vitro* para investigar, por ejemplo, la maduración e hipertrofia sin factores del suero distorsionadores pero también aplicaciones y estrategias terapéuticas potenciales *in vivo* bajo regulaciones GMP.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir músculo cardíaco preparado por ingeniería (EHM), comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (i) proporcionar una mezcla de reconstitución sin suero en uno o más moldes, comprendiendo dicha mezcla de reconstitución (a) un medio esencial mínimo sin suero; (b) un suplemento sin suero que resulta en una concentración final de 0,5-50 mg/ml de albúmina, 1-100 µg/ml de transferrina, 0,1-10 µg/ml de etanol amina, 0,003-0,3 µg/ml de selenito de sodio, 0,4-40 µg/ml de L-carnitina HCl, 0,1-10 µg/ml de hidrocortisona, 0,05-5 µg/ml de suplemento de ácidos grasos, 0,0001-0,1 µg/ml de triyodo-L-tironina (T3) y 0,2-2 mg/ml de colágeno; y (c) una mezcla de miocitos cardíacos humanos y no miocitos humanos, en el que 20 a 80% de la mezcla celular total son miocitos cardíacos;
- 10 en el que los miocitos cardíacos no se producen usando un proceso que implica modificar la identidad genética de la línea germinal de los seres humanos o que implica el uso de un embrión humano para propósitos industriales o comerciales;
- en el que la mezcla de reconstitución tiene un pH de 7,2 a 7,6;
- 15 (ii) cultivar la mezcla de reconstitución sin suero en dicho uno o más moldes, mediante lo cual se permite que la mezcla de reconstitución sin suero se condense durante al menos 15 min;
- (iii) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (ii) en dicho uno o más moldes en un medio de cultivo EHM sin suero hasta que la mezcla se condensa hasta al menos 50% de su espesor original, en el que dicho medio de cultivo EHM comprende (a) un medio basal que comprende 0,5-3 mmoles/L de Ca^{2+} ; (b) un suplemento sin suero como se define en (i)(b); (c) 0,5-10 mmoles/L de L-glutamina; (d) 0,01-1,0 mmoles/L de ácido ascórbico; (e) 1-100 ng/ml de IGF-1; y
- 20 (f) 1-10 ng/ml de TGFβ1;
- (iv) cultivar la mezcla obtenida en la etapa (iii) bajo estiramiento mecánico en un medio de cultivo EHM sin suero como se define en la etapa (iii) (a)-(f), mediante lo cual se forma EHM generador de fuerza.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el medio esencial mínimo en la etapa (i) y/o en la etapa (iii) se selecciona de medio de Iscove, αMEM, DMEM, y RPMI, preferiblemente en el que el medio basal es medio de Iscove o αMEM, más preferiblemente en el que el medio basal es medio de Iscove.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el suplemento sin suero de la etapa (i) y/o etapa (iii) comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en vitamina A, D-galactosa, ácido linoleico, ácido linoléico, progesterona, y putrescina.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el suplemento sin suero en el componente (b) de la etapa (i) y/o en el componente (b) de la etapa (iii) es suplemento B27® o suplemento B27® menos insulina, preferiblemente en el que el suplemento sin suero en el componente (b) es 2-6% (v/v) suplemento B27® o suplemento B27® menos insulina, más preferiblemente en el que el suplemento sin suero en el componente (b) es 4% (v/v) suplemento B27® o suplemento B27® menos insulina.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha mezcla de reconstitución de la etapa (i) comprende 0,3-0,5 mg de colágeno por $1,5 \times 10^6$ mezclas de células de miocitos cardíacos y no miocitos, preferiblemente en el que dicha mezcla de reconstitución de la etapa (i) comprende aproximadamente 0,4 mg de colágeno por $1,5 \times 10^6$ mezclas de células de miocitos cardíacos y no miocitos.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que en el componente (c) de la mezcla de reconstitución de la etapa (i) dicho colágeno es de grado médico y se selecciona del grupo que consiste en colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo V, y una mezcla de éstos, preferiblemente en el que en el componente (c) de la mezcla de reconstitución de la etapa (i) al menos 90% de dicho colágeno es colágeno tipo I, y preferiblemente en el que en el componente (c) de la mezcla de reconstitución de la etapa (i) dicho colágeno comprende además uno o más componentes de la matriz extracelular seleccionados del grupo que consiste en elastina, laminina, entactina, nidógeno, proteoglicano, y fibronectina.
- 40 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la mezcla de reconstitución de la etapa (i) tiene un pH de 7 a 7,8, preferiblemente en el que la mezcla de reconstitución de la etapa (i) tiene un pH de aproximadamente 7,4.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que los miocitos cardíacos son miocitos cardíacos humanos.
- 50 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que los miocitos cardíacos se proporcionan mezclados con células de una o más clases de células seleccionadas del grupo de no miocitos tales como fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, y células madre mesenquimales, en el que la mezcla de miocitos cardíacos contiene 20-80% de miocitos cardíacos, preferiblemente en el que los miocitos cardíacos se proporcionan en la etapa (i) en una concentración celular de al menos $2,7 \times 10^6$ por ml.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el cultivo en la etapa (ii) se lleva a cabo durante 0,25-3 h, preferiblemente durante 0,5-1,5 h.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el medio de cultivo de EHM sin suero comprende (i) aproximadamente 20 ng/ml de IGF1 humano; (ii) aproximadamente 5 ng/ml de TGFβ1 humano; y/o (iii) aproximadamente 5-20 ng/ml de VEGF humano y/o aproximadamente 5-20 ng/ml de FGF humano.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el medio de cultivo de EHM sin suero en la etapa (iii) comprende adicionalmente 750 mg/L de glicina, 890 mg/L de L-alanina, 1.320 mg/L de L-asparagina, 1.330 mg/L de ácido L-aspártico, 1.470 mg/L de ácido L-glutámico, 1.150 mg/L de L-prolina, y 1.050 mg/L de L-serina.
- 10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el cultivo en la etapa (iii) se lleva a cabo durante al menos 3 días, preferiblemente durante aproximadamente 3 a aproximadamente 7 días.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el cultivo en la etapa (iv) se lleva a cabo durante un periodo de al menos 3-60 días, preferiblemente durante 4-30 días, más preferiblemente durante 5-20 días, aún más preferiblemente 6-10 días, y lo más preferiblemente durante 7 días,
- 15 en el que la etapa (iv) se lleva a cabo en un dispositivo de estiramiento, preferiblemente en el que el dispositivo de estiramiento aplica un estiramiento estático, fásico o dinámico.

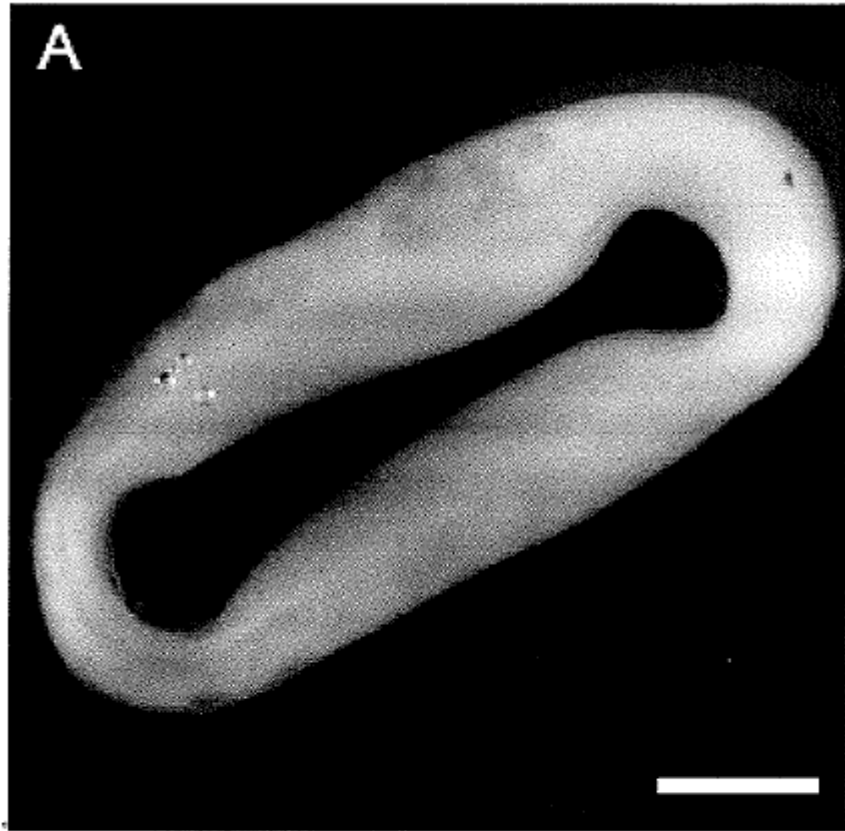


Figura 1

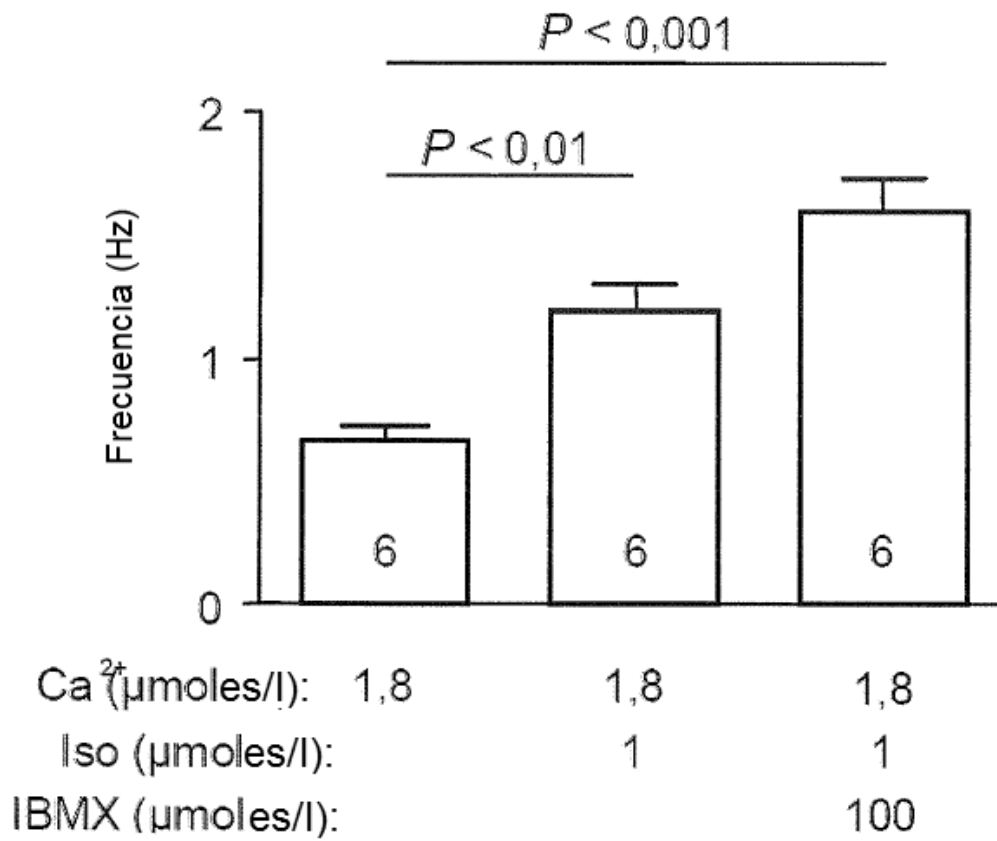


Figura 2A

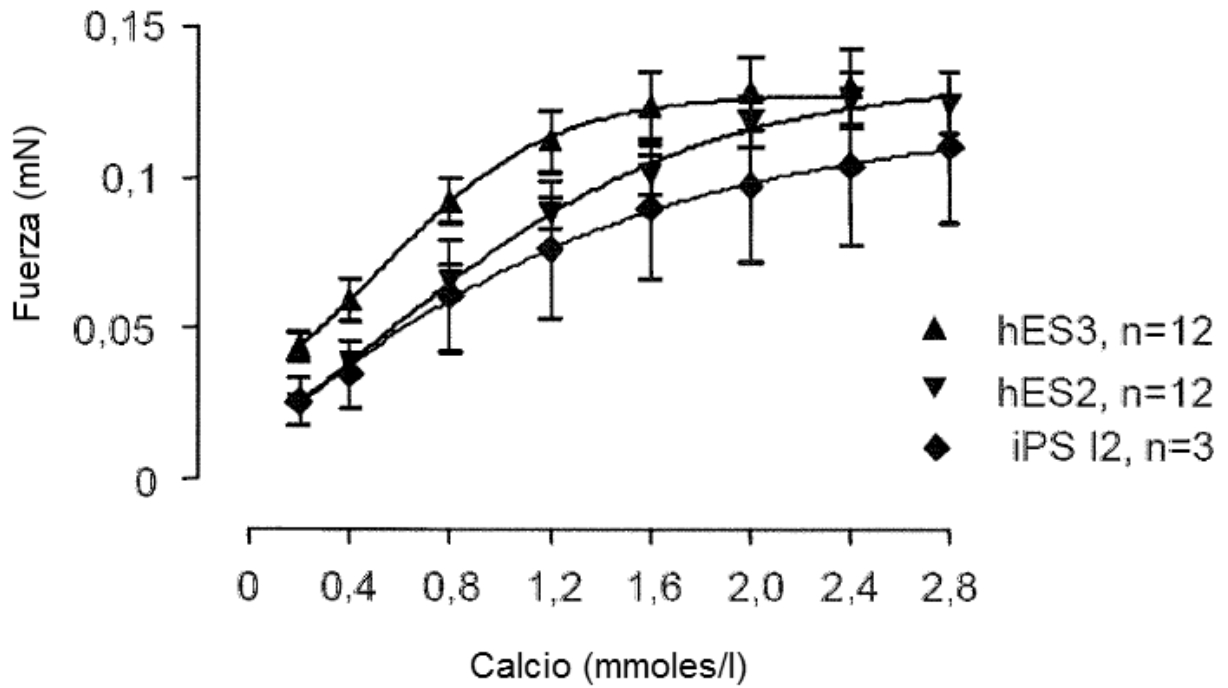


Figura 2B

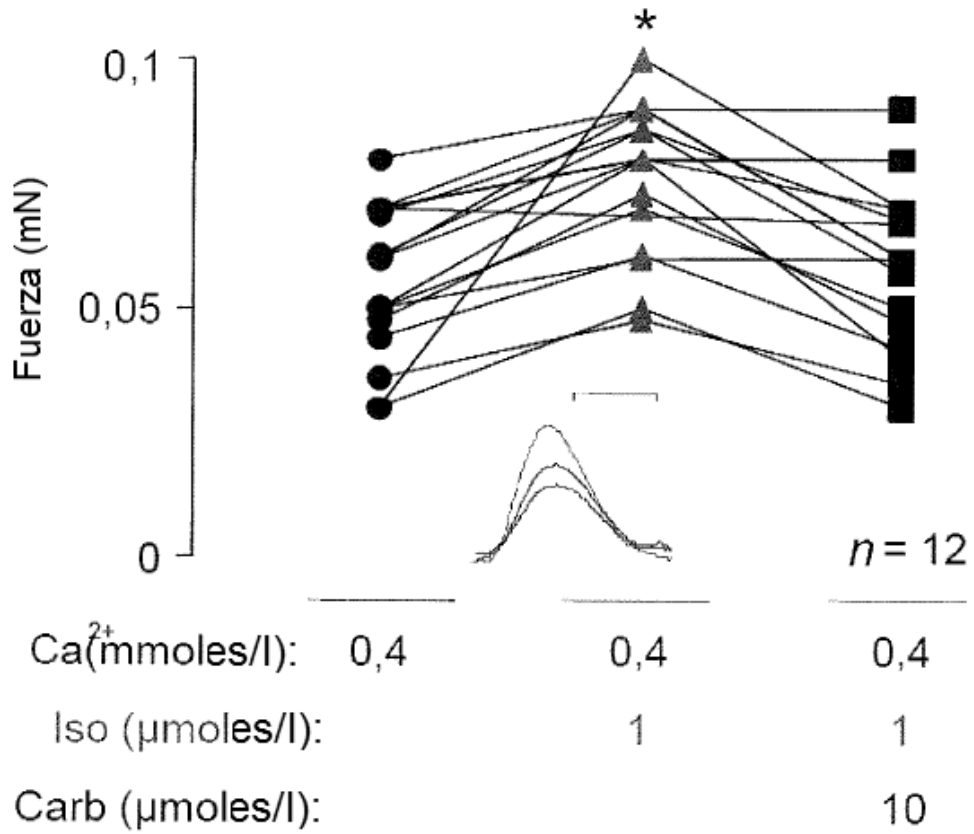


Figura 2C

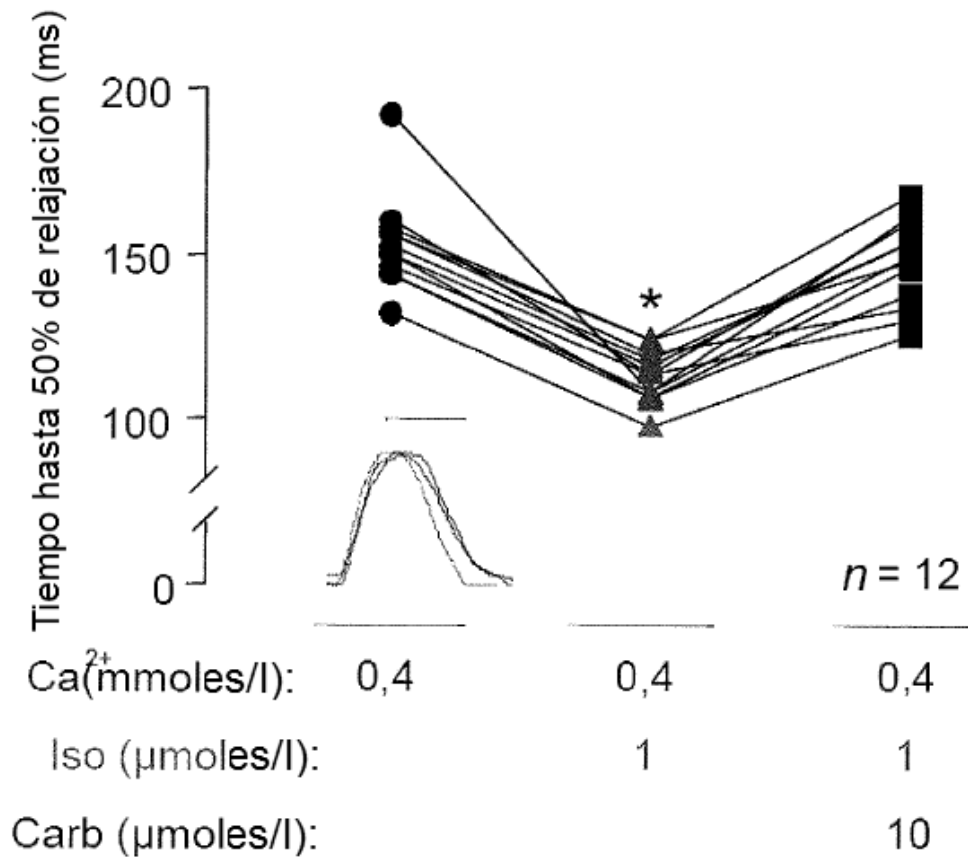


Figura 2D

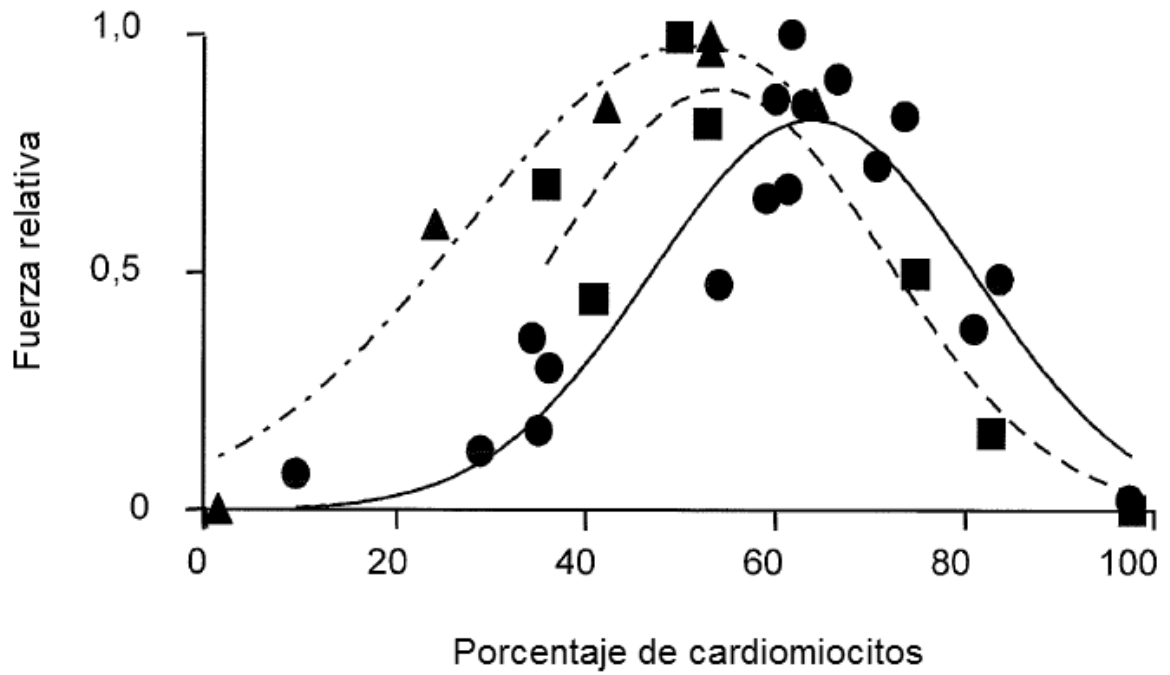


Figura 3A

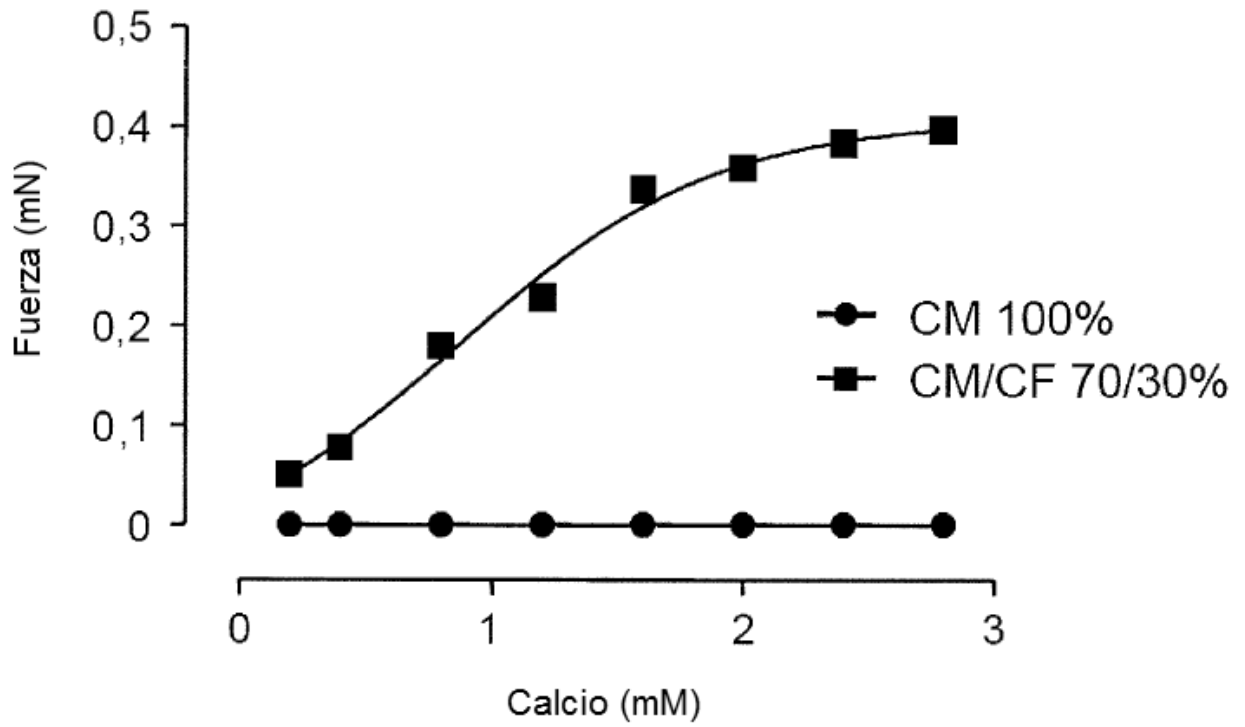


Figura 3B

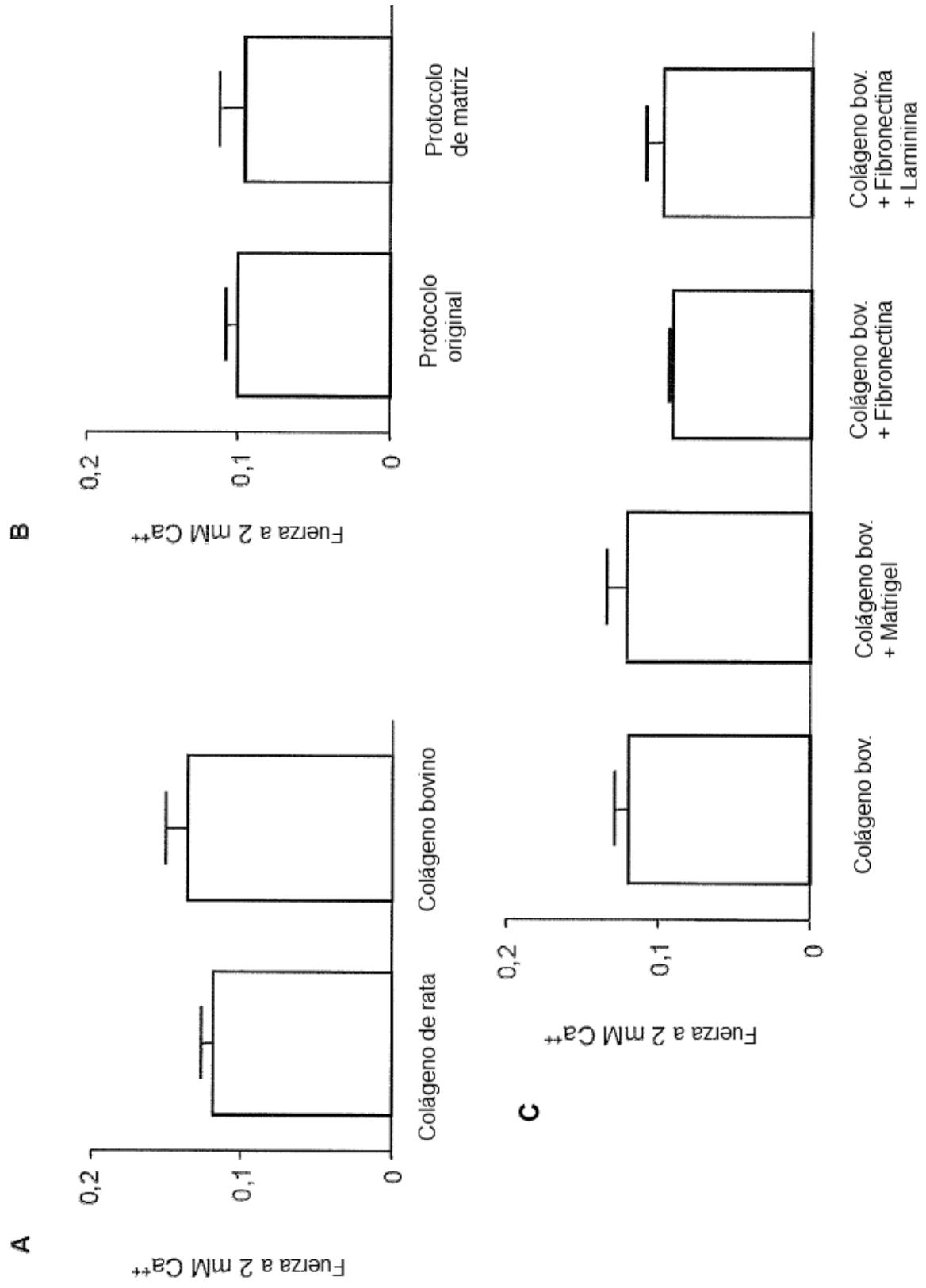


Figura 4

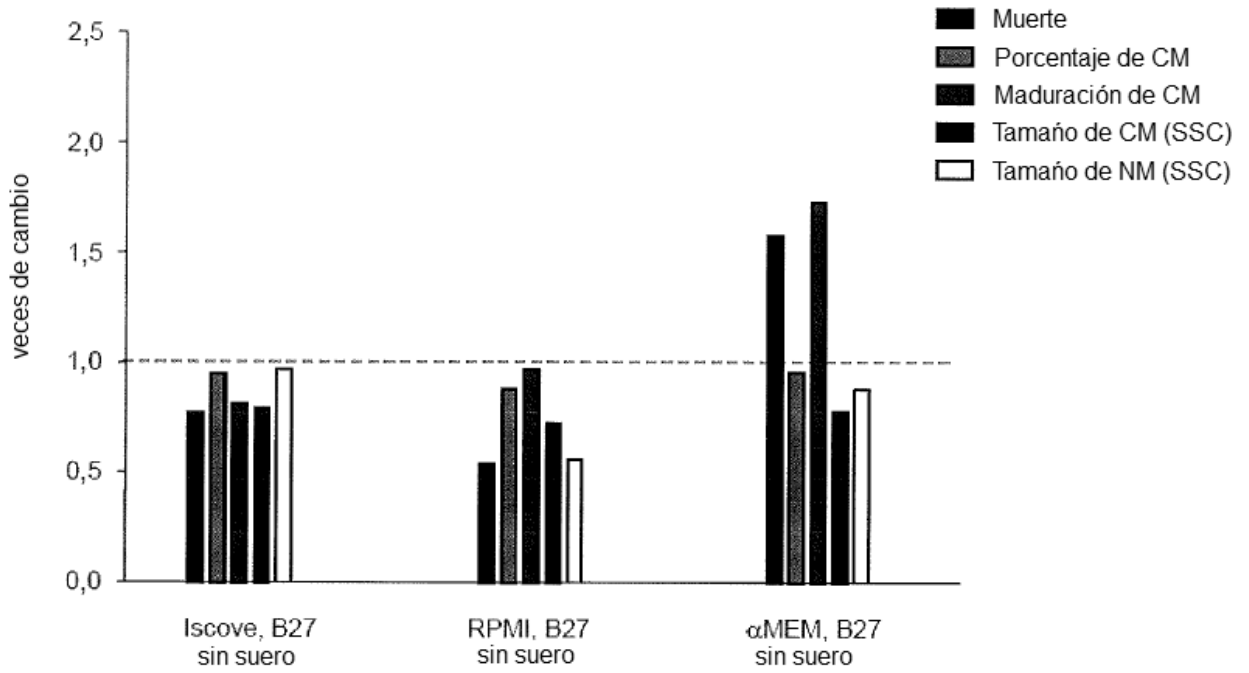


Figura 5A

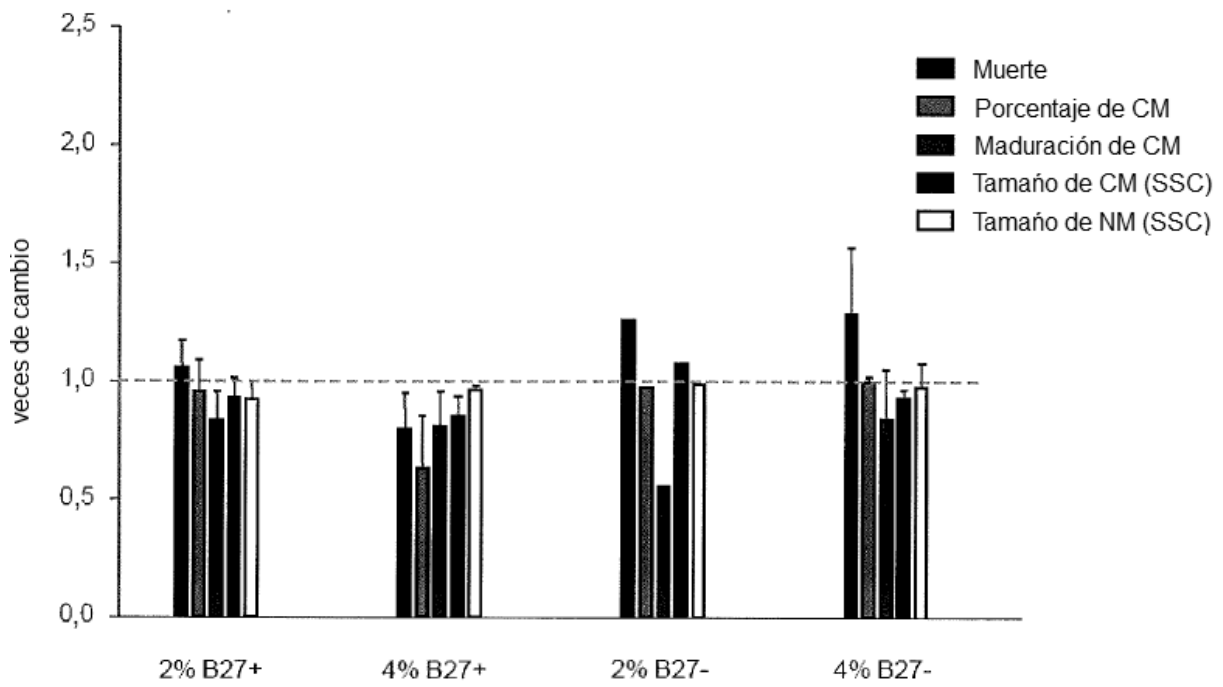


Figura 5B

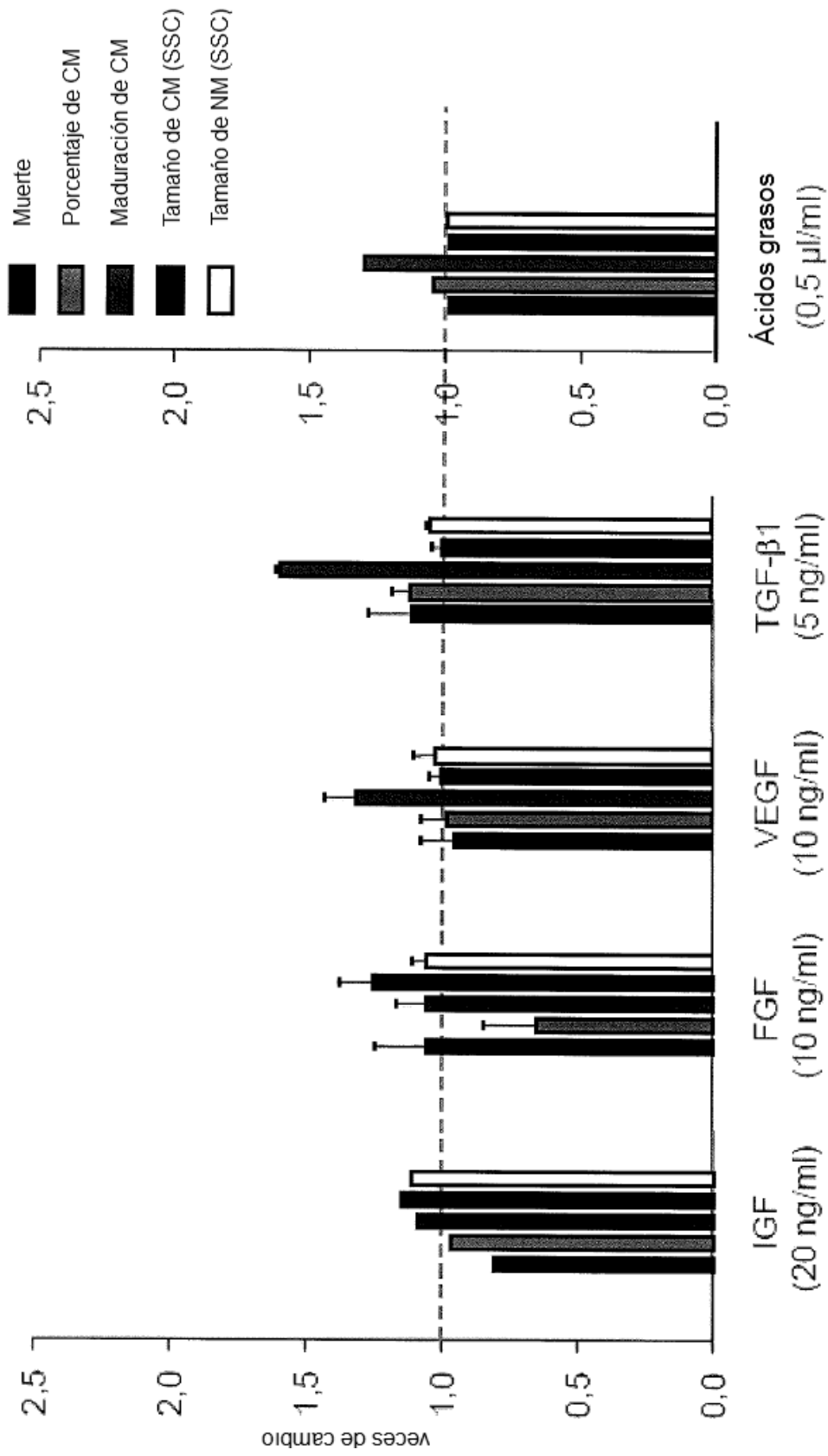


Figura 6A

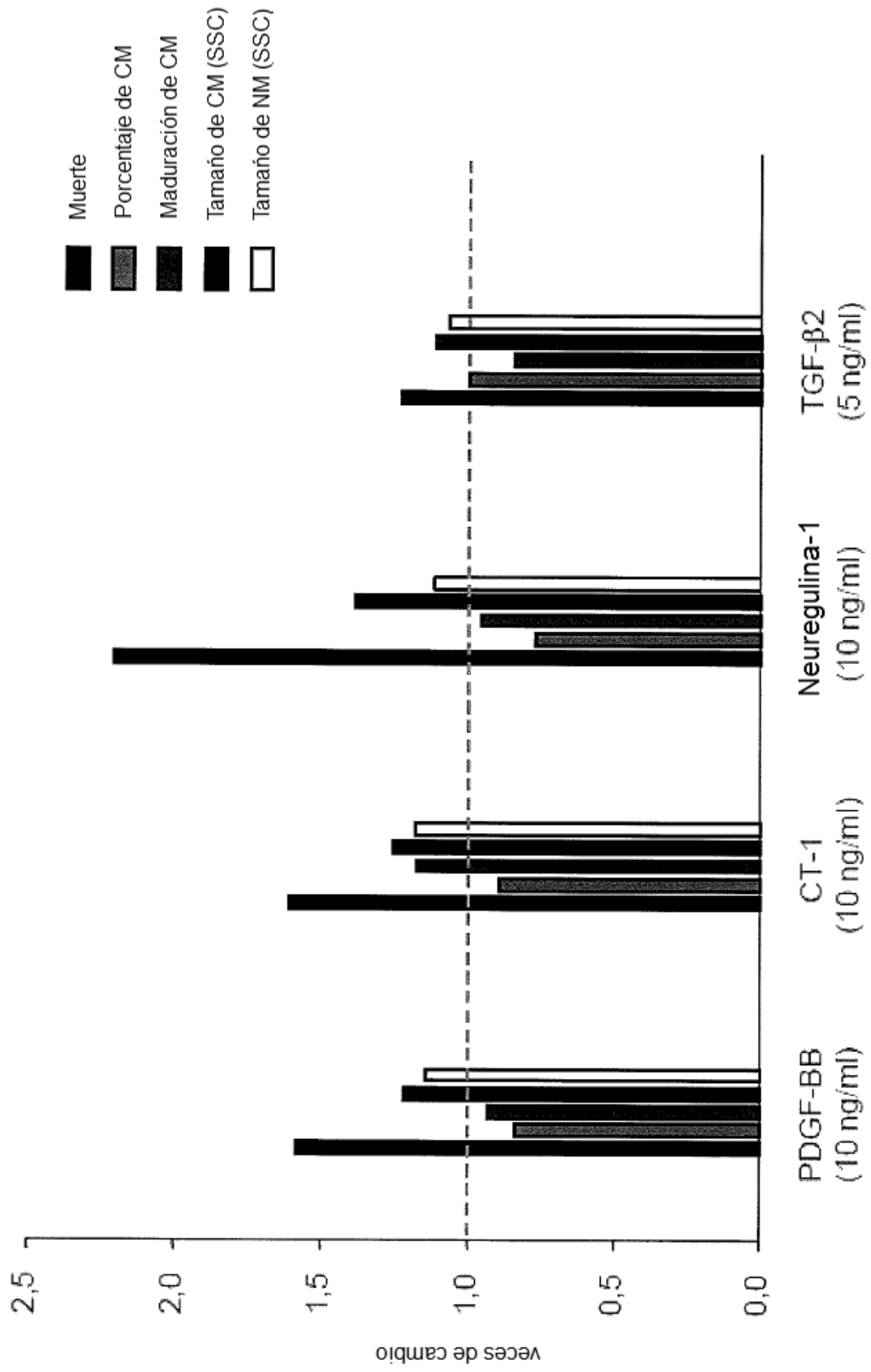


Figura 6B

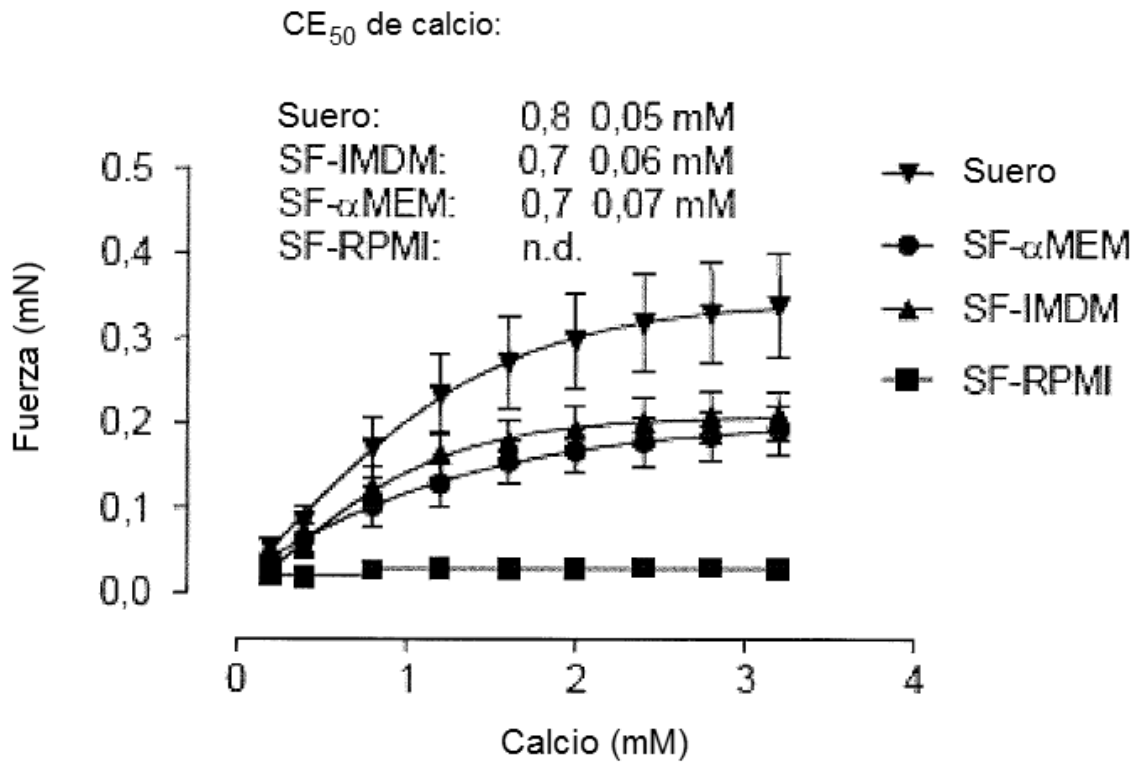


Figura 7A

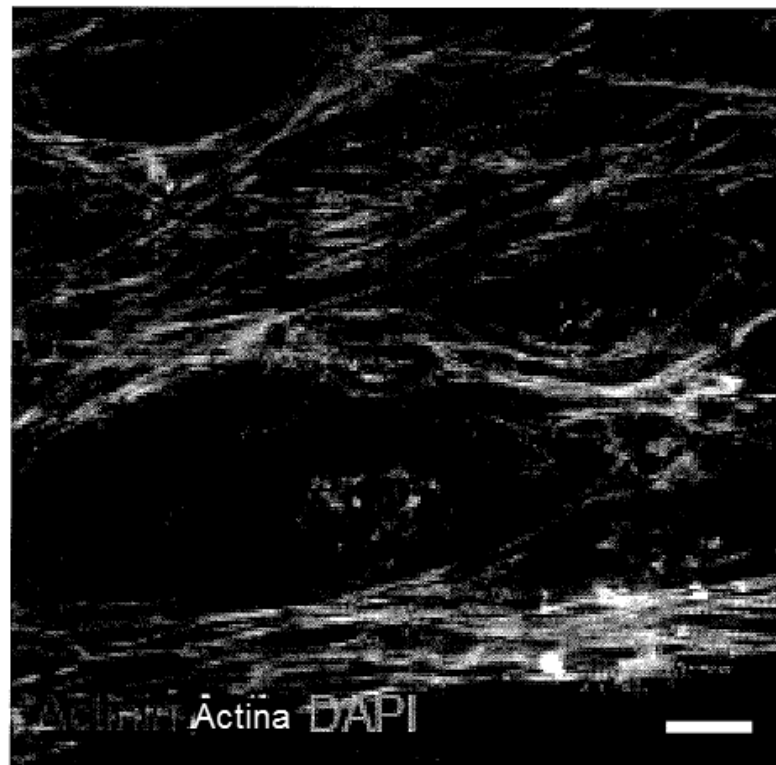


Figura 7B

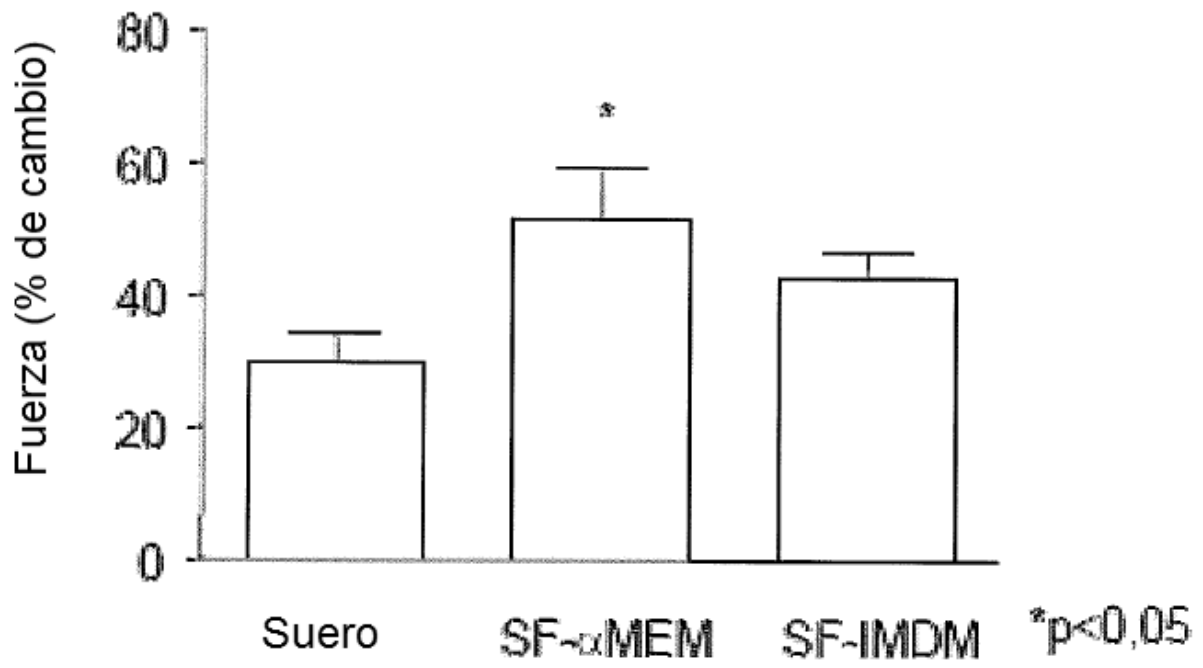


Figura 7C

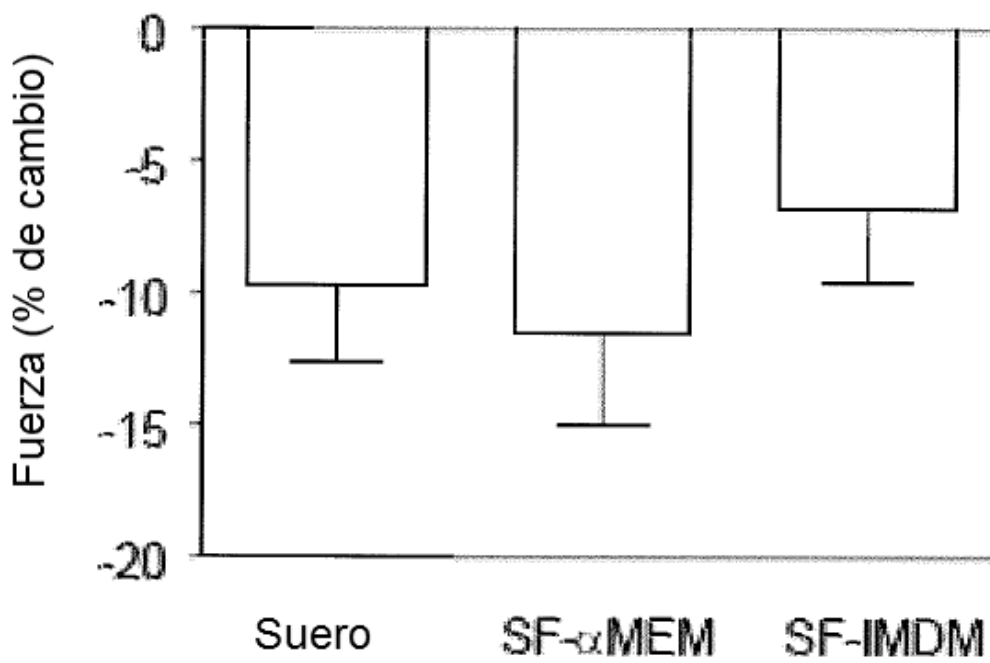


Figura 7D

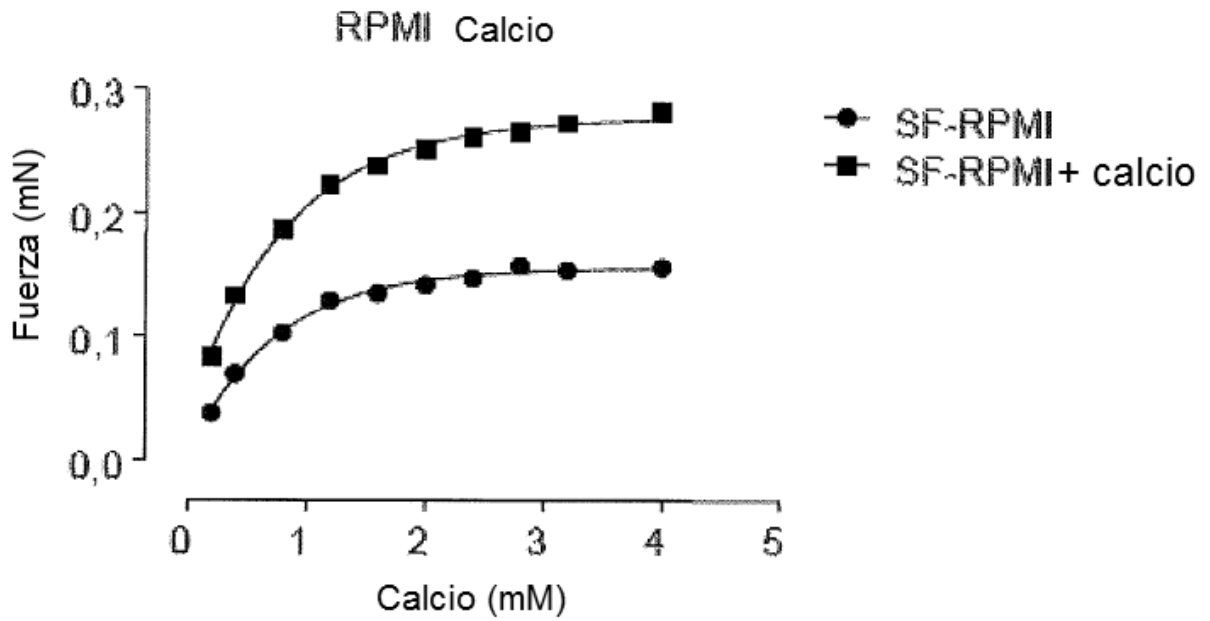


Figura 8A

Respuesta a isoprenalina (1 μ M)

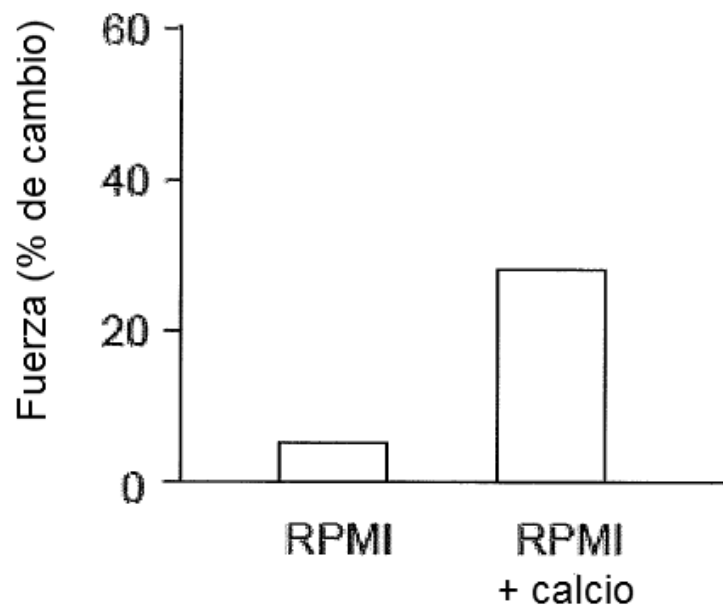


Figura 8B

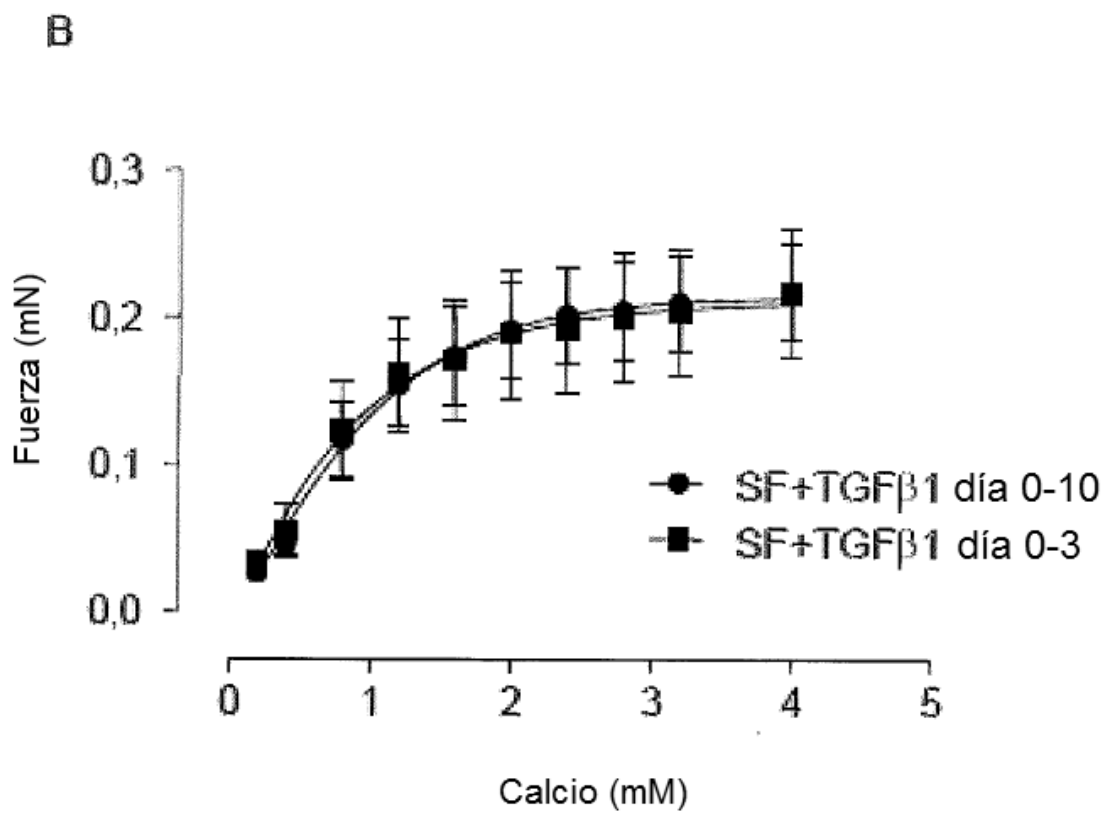
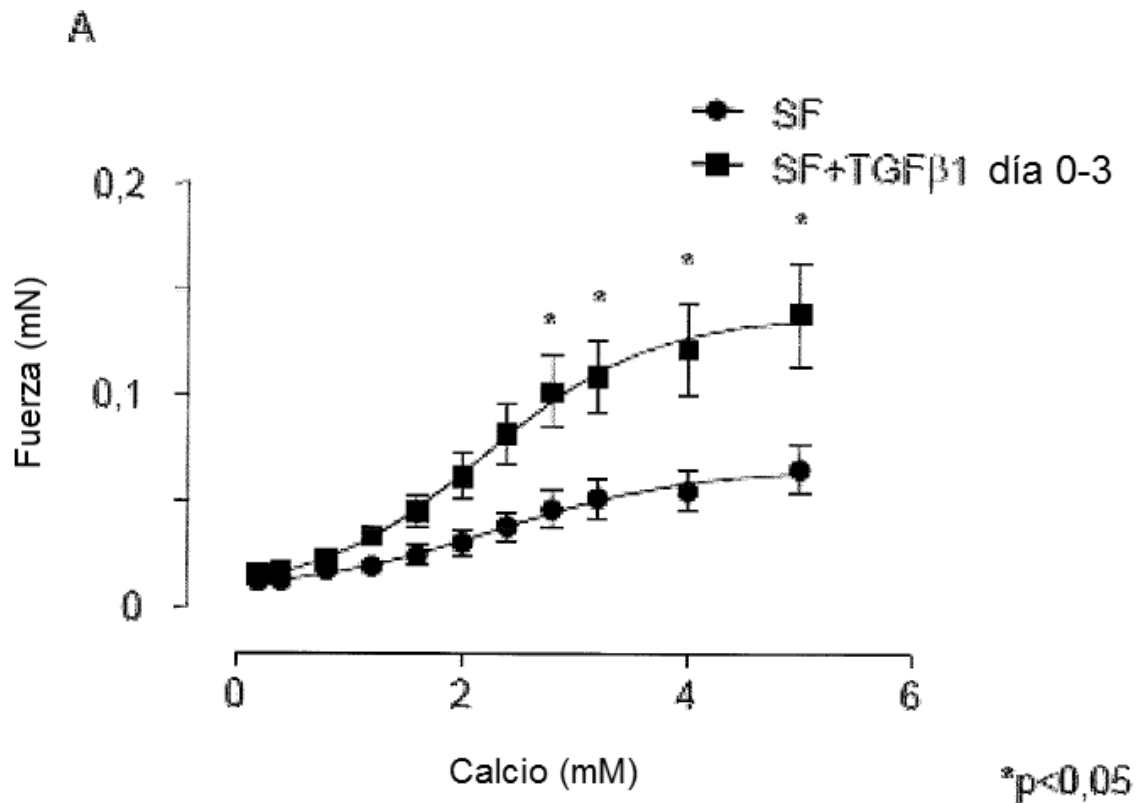


Figura 9

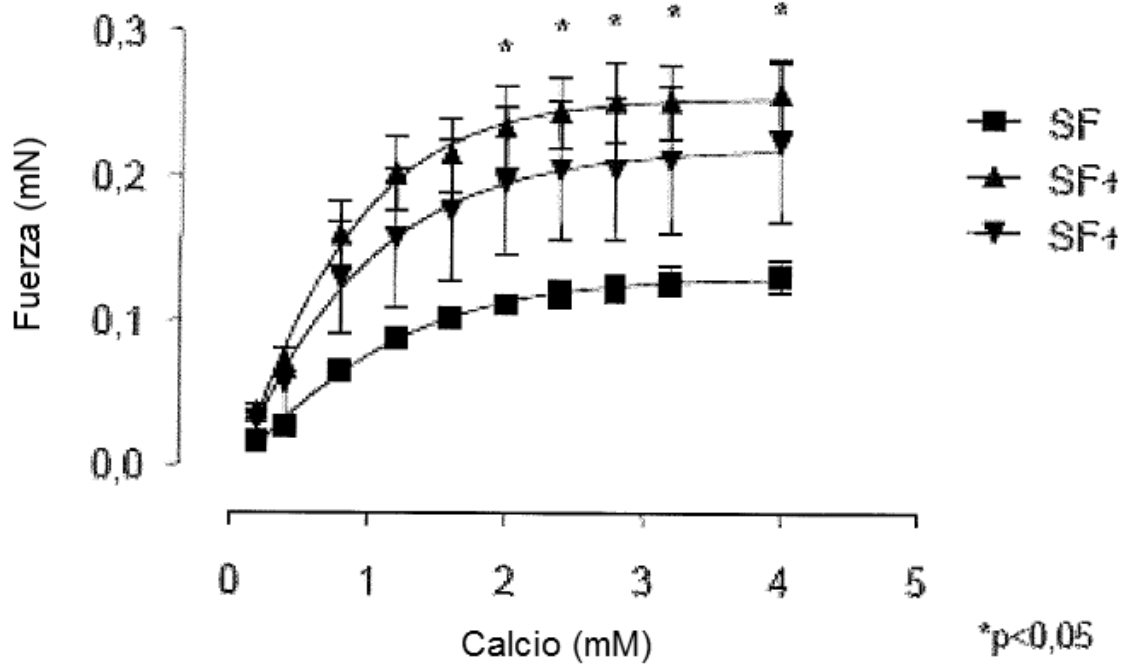


Figura 10

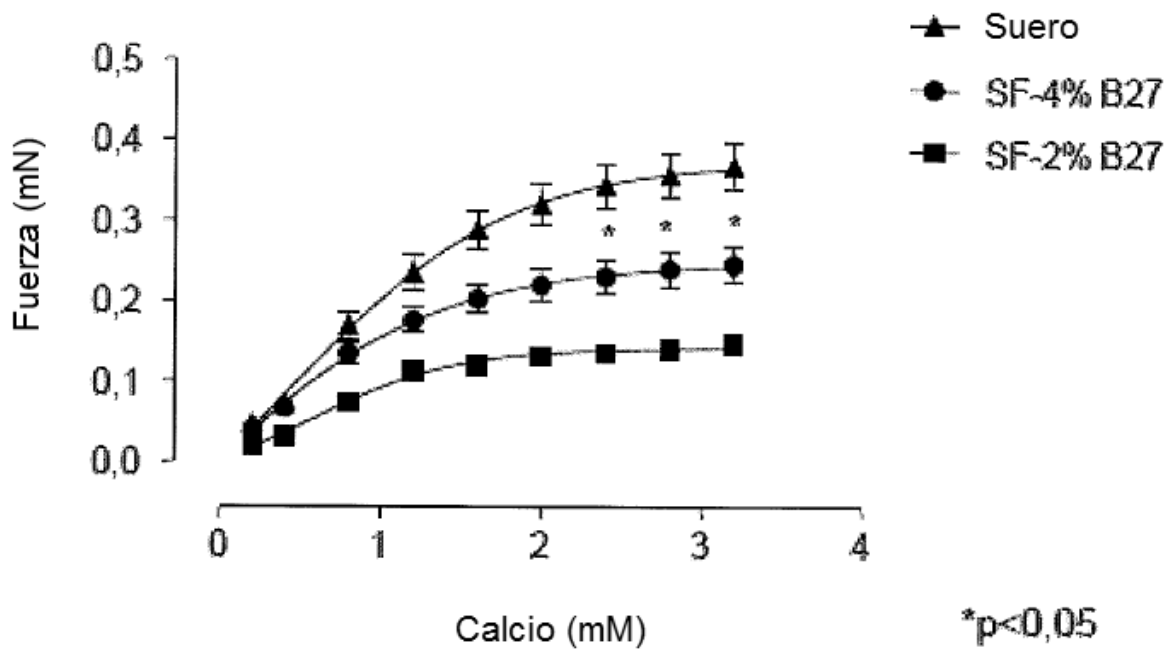


Figura 11

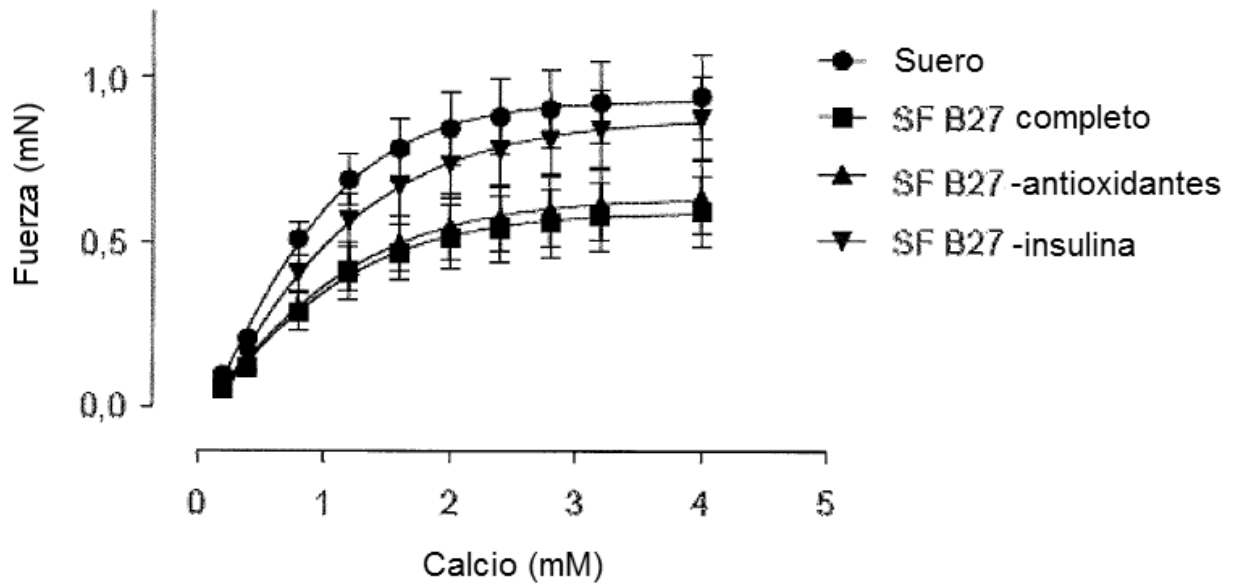


Figura 12

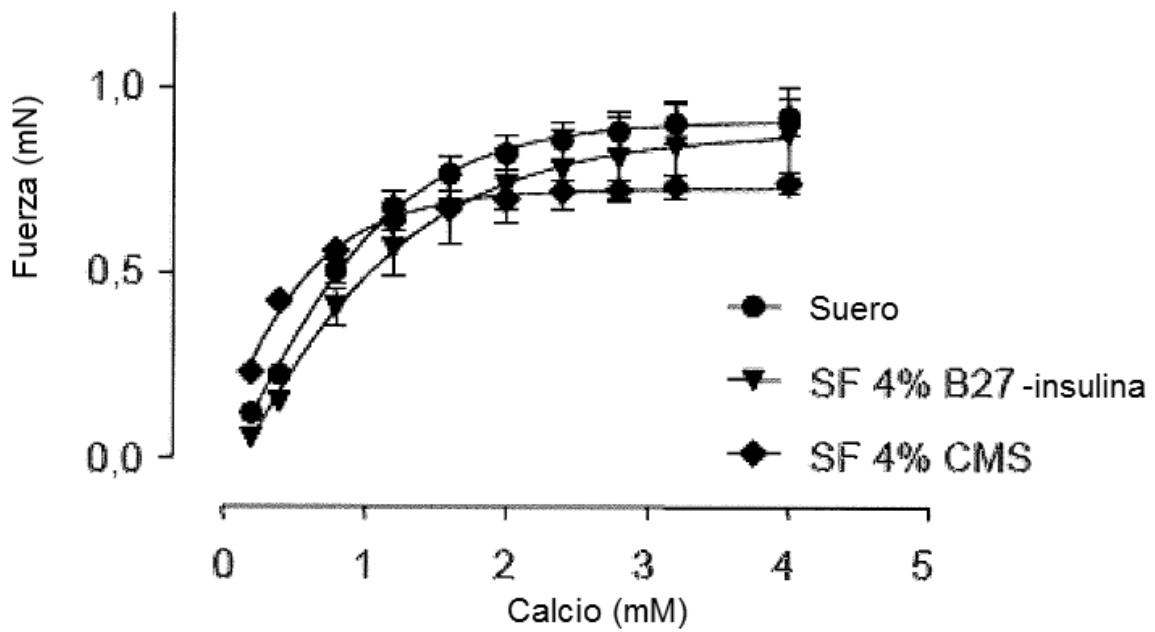


Figura 13A

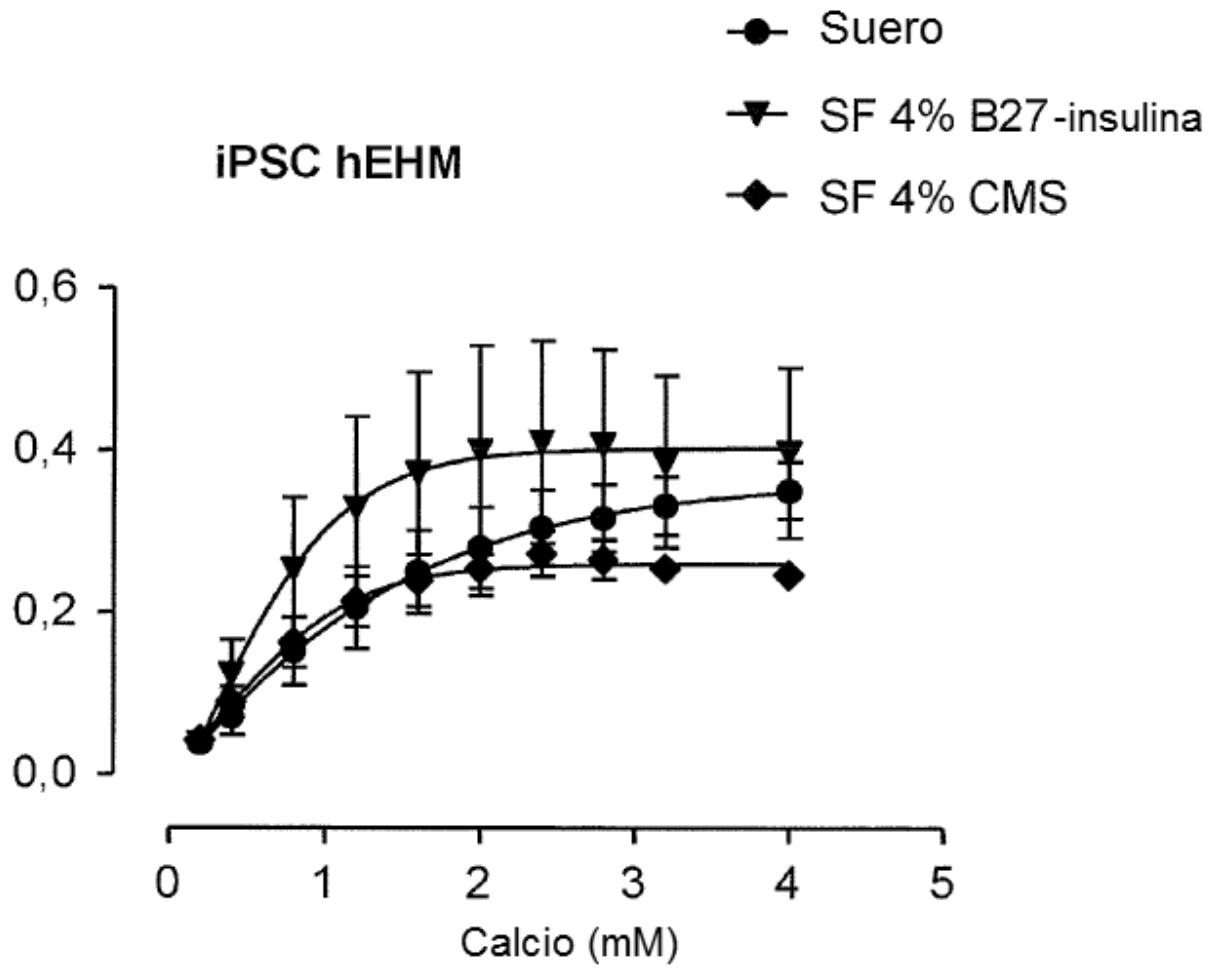


Figura 13B