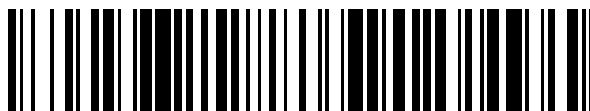


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 401**

51 Int. Cl.:

A61F 2/24 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/33 (2015.01)
A61K 35/34 (2015.01)
A61K 35/44 (2015.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61L 31/00 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013** **E 13182437 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 2842581**

54 Título: **Estructura saquiforme con actividad paracrina y métodos para su preparación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2019

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 y
SOONG, POHLOONG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 706 401 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

Estructura saquiforme con actividad paracrina y métodos para su preparación

La presente invención se refiere a una estructura saquiforme útil para prevenir mecánicamente la distensión y/o resistir la dilatación del corazón y para apoyar la función cardíaca mediante apoyo controlable y paracrino de un corazón con insuficiencia en un mamífero. La estructura saquiforme está compuesta al menos parcialmente por tejido manipulado que comprende células genéticamente manipuladas distintas de miocitos cardíacos, en donde dichas células genéticamente manipuladas distintas de miocitos cardíacos contienen un gen que codifica un factor paracrino, estando dicho gen que codifica el factor paracrino bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo. Además, la presente invención se refiere a un método para la preparación de la estructura saquiforme, p. ej., para aplicaciones terapéuticas, de creación de modelos de enfermedad y desarrollo de fármacos, así como el uso de la misma en métodos para tratar a individuos con la estructura saquiforme según la presente invención. Además, la presente invención se refiere a células diferentes de miocitos cardíacos para el uso en la preparación de la estructura saquiforme que se describe en la presente memoria.

Técnica anterior

La insuficiencia cardíaca es la principal causa de mortalidad en todo el mundo con una incidencia superior en los países desarrollados. La dilatación cardíaca es un fenómeno clínico común observado en varias enfermedades cardíacas, tales como después del infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca. Mientras que en las fases iniciales, solo pueden verse afectadas porciones del corazón, en la fase avanzada, todo el corazón se puede agrandar provocando graves problemas incluyendo arritmias o fuga de la válvulas cardíacas. La dilatación cardíaca es una razón frecuente para someter a un paciente a trasplante de corazón. Actualmente, se han propuesto diversos enfoques para invertir la dilatación cardíaca incluyendo terapia farmacológica, terapia con dispositivos y terapia celular.

La terapia a base de fármacos incluye la administración de bloqueadores de receptores β -adrenérgicos. La terapia farmacológica es un enfoque bastante antiguo para invertir los efectos patológicos de la dilatación cardíaca. Sin embargo, la curación de la dilatación miocárdica o la insuficiencia cardíaca no se pueden conseguir solamente mediante terapia farmacológica.

Un enfoque adicional es la terapia con dispositivos. Por ejemplo, para ayudar al corazón con insuficiencia a hacer frente a su función de bombeo, se pueden implantar dispositivos ventriculares izquierdos. Estrategias con dispositivos alternativos incluyen la implantación de medios que restringen la dilatación adicional incluyendo bolsas. Por ejemplo, el documento WO 2008/058917 describe construcciones saquiiformes para prevenir la distensión cardíaca. Por otra parte, los corazones artificiales completos están progresando pero no obstante no se han conseguido para el uso.

Por otra parte, se describen en la técnica terapias celulares incluyendo la aplicación de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea así como células madre pluripotentes humanas, incluyendo células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre patógenas y células progenitoras cardíacas. Sin embargo, las fuentes y la aplicación de las mismas están limitadas. Por otra parte, los datos experimentales muestran que el apoyo paracrino puede tener un efecto terapéutico en la terapia para la dilatación cardíaca. Por ejemplo, se ha sugerido introducir IGF-1, sin embargo, todavía no se ha demostrado un beneficio terapéutico claro del IGF-1 aplicado sistémicamente.

Bastante recientemente, la manipulación del tejido del músculo cardíaco ha ocupado la atención de los científicos. La manipulación del tejido se ha desarrollado para apoyar biofísicamente el corazón con insuficiencia, pero también para proporcionar pruebas *in vitro* para el desarrollo de fármacos y estudios de organogénesis. Con respecto a la reparación del músculo cardíaco, los principales objetivos son (i) añadir elementos contráctiles al corazón con insuficiencia para un apoyo funcional y (ii) proporcionar una constricción similar a los enfoques en los que se van a poner bolsas sobre el corazón dilatado, restringiendo así la dilatación adicional, pero completamente humanizados. Por ejemplo, se ha utilizado el uso de andamiajes en ambientes bien sintéticos o bien biológicos y la siembra de cardiomiocitos. El documento WO 2008/058917 describe construcciones saquiiformes para prevenir la distensión cardíaca en las que se usa tejido manipulado para obtener una estructura saquiiforme. Se han desarrollado tejidos cardíacos manipulados de mamífero para el cribado de fármacos y aplicaciones terapéuticas, p. ej. Zimmermann et al. *Biotechnol. Bioeng.* (2000), 68(1), 106 a 14. Era posible que los tejidos cardíacos manipulados de mamífero tuvieran latido coordinado con desarrollo de fuerza dirigido y músculo cardíaco como respuestas fisiológicas y farmacológicas. Por consiguiente, una estructura saquiiforme descrita en el documento WO 2008/058917 se basa en dicho tejido cardíaco manipulado de mamífero. Este tejido cardíaco manipulado de mamífero incluye cardiomiocitos. El tejido cardíaco manipulado también se puede obtener a partir de tejido cardíaco diferente de cardiomiocitos. Por ejemplo, se pueden usar fibroblastos, células del músculo liso, etc.

Sin embargo, a pesar del reciente aumento de interés en el desarrollo de modelos avanzados de tejidos manipulados, varios retos clínicos aún deben ser abordados: Las estructuras cardíacas manipuladas deben ser de un tamaño y un grosor clínicamente pertinentes y consistir en poblaciones celulares inmunológicamente tolerables en una matriz similar al corazón del hospedador. Además, estas estructuras también deben ser capaces de conectar con el suministro de sangre del hospedador, propagar impulsos eléctricos que deben estar sincronizados con el miocardio

del hospedador y posteriormente generar suficiente fuerza contráctil para ayudar en la circulación sanguínea.

El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas estructuras saquiformes para aplicaciones en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la creación de modelos de enfermedad, el desarrollo de fármacos y la identificación así como la validación de dianas.

5 **Breve descripción de la presente invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero según se define en la reivindicación 1, dicha estructura saquiforme comprende un tejido manipulado en el que al menos una parte del tejido manipulado comprende células manipuladas genéticamente distintas de cardiomiocitos, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino, estando dicho gen que codifica el factor paracrino bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo según se define en la reivindicación 1.

Por ejemplo, el factor paracrino pueden ser factores proteínicos incluyendo diferentes tipos de factores de crecimiento como IGF-1, pero también otros tipos de compuestos que tienen propiedades cardioprotectoras o inductoras de la regeneración sobre el tejido cardíaco, como moléculas de ácido nucleico incluyendo ARNm.

El sistema promotor inducible o el sistema promotor heterólogo puede ser un sistema promotor inducible químicamente conocido en la técnica.

En una realización preferida, el tejido manipulado presente en la estructura saquiforme contiene adicionalmente cardiomiocitos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero y que comprende tejido manipulado según se define en la reivindicación 10, dicho tejido manipulado comprende células manipuladas genéticamente, que contienen un gen que codifica un factor paracrino y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo, dicho método comprende las etapas de

a) proporcionar una matriz que tiene un rebajo en una superficie de la matriz, rebajo que tiene dimensiones apropiadas para contener un volumen de reconstitución definido para la formación de la estructura saquiforme,

b) proporcionar un cuerpo que tiene dimensiones correspondientes a las dimensiones deseadas del interior de la estructura saquiforme que se va a formar, y colocar el cuerpo en el rebajo de la matriz de modo que el cuerpo esté separado de las paredes del rebajo para formar un espacio entre el cuerpo y las paredes del rebajo correspondiente al volumen de reconstitución necesario para la formación de una estructura saquiforme,

c) depositar una mezcla de reconstitución en el rebajo, mezcla de reconstitución que comprende células de mamífero, como células alogénicas, o células autólogas, y un material de andamiaje adecuado que se puede incubar para formar una estructura de tejido manipulado que comprende dichas células,

d) incubar la mezcla de reconstitución hasta que se forme la construcción tisular dentro del rebajo de la matriz entre el cuerpo y la matriz,

e) cambiar el medio de cultivo una vez que se ha formado la construcción saquiforme alrededor del cuerpo central,

f) retirar el cuerpo con la construcción tisular adherida al mismo del rebajo de la matriz, y

g) separar la construcción tisular del cuerpo,

en donde al menos una parte de las células de mamífero presentes en la estructura de tejido manipulado son células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo según se define en la reivindicación 10.

Los presentes inventores identificaron que células manipuladas genéticamente distintas de cardiomiocitos, que contienen un gen que codifica un factor paracrino, son adecuadas para promover el injerto de la estructura saquiforme y para mejorar la actividad de apoyo sobre el tejido cardíaco. La estructura saquiforme según la presente invención es distinta del documento WO 2008/058917 en primer lugar en cuanto a su principio de diseño que permite una fácil adaptación al tamaño y en segundo lugar en cuanto a su actividad paracrina controlable para apoyar por una parte la generación de estructuras saquiformes del tamaño del corazón humano *in vitro* y el injerto *in vivo* (mediante la liberación de, por ejemplo, factores de prosupervivencia [p. ej. IGF-1], angiogénicos [p. ej. VEGF] y cardiogénicos/regenerativos [p. ej. IGF-1, miR133] y por otra parte mejorar el comportamiento del miocardio adyacente. Es posible mejorar la supervivencia del injerto usando factores apropiados que se secretan, p. ej. factores antiapoptóticos, angiogénicos, moduladores de la inflamación, cardioangiogénicos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Confirmación de la actividad biológica de IGF-1 expresado transgénicamente. IGF-1 liberado de fibroblastos de prepucio humano (HFF) modificados genéticamente induce la fosforilación de Akt en cardiomiocitos. Análisis de transferencia Western de pAkt, Akt y GAPDH en cardiomiocitos derivados de hESC expuesto al sobrenadante procedente de HFF^{wt} (silvestre) y HFF^{IGF1+TetOn} (estimulación con ± 10 ng/ml de doxiciclina). Compendio de transferencia Western (n = 3 por grupo). * p < 0,05 frente HFF^{wt} (± doxiciclina; prueba de la t de Student desapareada bilateral).

Figura 2. Confirmación de que IGF-1 expresado transgénicamente e inducido farmacológicamente apoya el comportamiento del músculo cardíaco. La eficacia de la liberación de IGF-1 inducida por fármaco (doxiciclina) se confirmó en músculos cardíacos manipulados (EHM) mediante medidas de la fuerza isométrica de contracción. Se confirmó la superioridad del grupo de "HFF^{IGF1+TetOn} + 10 ng/ml de doxiciclina" sobre los grupos de "HFF^{IGF1+TetOn} sin doxiciclina", "HFF^{wt}" y "HFF^{wt} + 10 ng/ml de doxiciclina". Las ordenadas presentan la tensión de fasciculación en mN. Las abscisas indican concentraciones extracelulares de calcio. * p < 0,05 frente a EHM HFF^{wt}; ANOVA bidireccional.

Figura 3. Confirmación de la respuesta cardiomiocítica y no miocítica a la liberación de IGF-1. El IGF-1 liberado inducía hipertrofia cardiomiocítica (A) y no miocítica (B) en EHM. El tamaño celular se midió mediante citometría de flujo. *p<0,05 frente a HFF^{wt}.

Figura 4. Prueba de viabilidad para el injerto cardíaco de la construcción saquiiforme manipulada proporcionada mediante determinación histológica después de la implantación de un paraBioVAD (indicado como BioVAD) en un corazón de rata. (A) Zonas de injerto de BioVAD al corazón de rata (flechas). Escala gráfica 100 µm. (B y C) Zona de injerto ampliada con miocardio de rata que muestra supervivencia de cardiomiocitos que contienen BioVAD. Escala gráfica 50 µm. (D-F) Vascularización del injerto de BioVAD. Las flechas en D y E destacan la vasculatura en desarrollo. Escalas gráficas 100 µm. (F) Imagen ampliada de vasos que contienen eritrocitos en el injerto de BioVAD. Este hallazgo proporciona evidencia de una conexión establecida del sistema circulatorio de los receptores al injerto. Escala 50 µm.

Descripción detallada de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una estructura saquiiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero según se define en la reivindicación 1, dicha estructura saquiiforme comprende un tejido manipulado caracterizado por que al menos parte del tejido manipulado comprende células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino, estando dicho gen que codifica el factor paracrino bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo.

En relación con esto, el término "estructura saquiiforme" se refiere a una estructura que soporta al menos una parte del corazón. Por ejemplo, la estructura saquiiforme es una estructura con conformación de bolsa que tienen una abertura y preferiblemente una sola abertura. En una realización, la estructura está conformada de tal modo que sea adecuada para envolver y comprender al menos una parte del corazón de un mamífero.

Esto es, la estructura saquiiforme está adaptada para recibir el corazón de un mamífero de tal modo que dicha estructura sea capaz de aplicar una ligera presión sobre la superficie del corazón, presión que previene la extensión y/o resiste la dilatación durante la actividad sistólica y diastólica del corazón. La estructura saquiiforme es capaz de ajustarse a la dimensión de la parte.

En una realización de la presente invención, la estructura abarca los ventrículos del corazón, lo que significa que cuando se aplica a la superficie del corazón la estructura alcanza desde el ápice cardíaco hasta el surco coronario que es la hendidura anular situada entre los ventrículos y la aurícula. La estructura se puede aplicar a la superficie externa del corazón de un modo que esté en contacto directo con el epicardio. Este procedimiento requiere una retirada del pericardio. En otra realización, el pericardio puede permanecer intacto y la estructura saquiiforme se puede aplicar sobre su superficie externa. En una realización preferida, la estructura es capaz de integrarse estructuralmente en el miocardio.

El término "mamífero", según se usa en la presente memoria, incluye todos los tipos de mamíferos, como roedores incluyendo ratones y ratas así como perros, gatos, ovejas, primates o seres humanos.

El término "tejido manipulado" se refiere a un tejido obtenido *in vitro*. Típicamente, el tejido manipulado comprende material de soporte también denominado un andamiaje, así como células. El tejido manipulado es un tejido generado mediante técnicas de manipulación tisular *in vitro*. El término "tejido cardíaco manipulado" o EHT significa un tejido de origen de mamífero, como origen de ser humano o primate, que comprende células derivadas de corazón de mamífero obtenidas mediante técnicas de manipulación tisular, por ejemplo músculo cardíaco manipulado (EHM).

Los términos "miocito cardíaco" y "cardiomiocito" se usan intercambiamente y se refieren a una célula excitable compuesta por miofibrillas que proporcionan fuerza contráctil cuando se estimulan, pero es distinguible de una célula de músculo esquelético.

El "tejido cardíaco" también puede comprender fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, leucocitos incluyendo macrófagos y otras células típicamente mononucleares además de miocitos cardíacos.

5 Por otra parte, el término "factor paracrino" identifica factores, p. ej. péptidos, proteínas así como moléculas pequeñas y moléculas basadas en ácido nucleico incluyendo ARNm. Los factores paracrinos se difunden a lo largo de una distancia corta relativa que representa una forma de comunicación célula-célula por la que una célula produce un cambio inducido distintivo en células vecinas. Los factores paracrinos se secretan en el ambiente extracelular inmediato de las células productoras, actuando así localmente de forma adyacente, pero potencialmente también en remoto, dependiendo de la fuerza del gradiente paracrino establecido por una célula dada.

10 Ejemplos típicos de factores paracrinos son miembros de la familia de factores de crecimiento incluyendo factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores promotores del crecimiento, factores angiogénicos o factores antiapoptóticos. Según la presente invención, dichos factores incluyen pero no se limitan a VEGF, HGF, PLGF, SDF-1, IGF-1. Estos factores pueden inducir la angiogénesis, apoyar la supervivencia de células cardíacas, inducir la proliferación celular o el crecimiento hipertrófico.

15 Otros compuestos adecuados como factores paracrinos incluyen moléculas de efecto local, en particular moléculas de ARNm según se define en las reivindicaciones. Una molécula de ARNm adecuada incluye miR-133, miR-1, miR-499, miR-208, miR-199A-3p, miR-590-3p, miR-1825, miR-33b.

Los factores paracrinos según la presente invención tienen actividad cardioprotectora y/o inductora de la cardioregeneración. El experto está al tanto de factores paracrinos adecuados.

20 Los términos "comprender" o "que comprende" o los términos "contener" o "que contiene" incluyen las realizaciones de "consistir" o "que consiste en".

Por otra parte, el término células madre pluripotentes se refiere a células madre pluripotentes en donde dichas células madre no se producen usando un procedimiento que implique la identidad genética de la línea germinal de seres humanos o que implique el uso de embriones humanos con propósitos industriales o comerciales.

25 El término "célula o células manipuladas genéticamente", según se usa en la presente memoria, se refiere a una célula modificada que incluye una o más actividades distintas de una actividad presente en una célula utilizada como un punto de partida. Una célula manipulada genéticamente incluye un polinucleótido heterólogo en algunas realizaciones y, en ciertas realizaciones, una célula manipulada genéticamente se ha sometido a condiciones selectivas que alteran una actividad, o introducen una actividad con relación a la célula de partida.

30 En relación con esto, se apunta que el término "manipulación genética" o "manipulado genéticamente" se refiere a una adición, retirada o alteración adecuada de un ácido nucleico que facilite la producción de un producto elegido en la célula manipulada.

35 El sistema promotor inducible según la presente invención puede ser un sistema promotor que se puede inducir por medios químicos. Alternativamente, la inducción del sistema inducible se puede alcanzar mediante luz, radiación, hipoxia, hipo- así como hipertermia y similares. Sistemas adecuados para la inducción temporal y/o espacial se describen, p. ej., en Guo Z., et al., Trends in Molecular Medicine, 14, 9, 410-418, 2008.

Una realización del sistema promotor inducible según la invención incluye un sistema promotor inducible químicamente, seleccionado del sistema basado en tetraciclina, el sistema basado en rapamicina, el sistema basado en progesterona y el sistema basado en ecdisona. En relación con esto, el sistema basado en tetraciclina puede ser un sistema TetOn o TetOff. Según esto, el experto está al tanto de los sistemas.

40 En otra realización, el sistema promotor puede ser un sistema promotor heterólogo. El término "sistema promotor heterólogo" se refiere a un sistema promotor que no está presente naturalmente en la célula, p. ej. no está presente en el cromosoma de la célula manipulada.

45 Según la presente invención, la estructura saquiforme es una estructura que comprende tejido de manipulación en el que las células manipuladas genéticamente son células seleccionadas de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células mesenquimales, células madre cardíacas y pericitos o células precursoras de dichas células o células madre pluripotentes, en donde dichas células madre pluripotentes no se producen usando un procedimiento que implique modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos o que implique el uso de un embrión humano con propósitos industriales o comerciales. Se prefiere usar fibroblastos o células mesenquimales o células precursoras. Por ejemplo, se pueden obtener células adecuadas a partir de biopsias cutáneas o gingivales, material de liposucción, biopsias cardíacas, médula ósea o sangre.

50 En una realización de la presente invención, las células manipuladas genéticamente son células alogénicas. En una realización, se prefiere que las células manipuladas sean células autólogas del sujeto que se espera que reciba la estructura saquiforme según la presente invención.

5 Esto es, las células manipuladas se obtienen por adelantado del sujeto, se manipulan genéticamente *in vitro* al introducir el gen que codifica el factor paracrino, en donde dicho gen que codifica el factor paracrino está bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo según se define en las reivindicaciones. El sistema puede requerir introducir un segundo plásmido en las células, por ejemplo, según se describe para el sistema basado en tetraciclina.

10 En otra realización, el tejido manipulado comprende adicionalmente miocitos, como miocitos cardíacos y/u otras células del tejido cardíaco distintas de miocitos cardíacos. Los miocitos se pueden derivar de células progenitoras o células precursoras obtenidas preferiblemente del sujeto que se espera que reciba la estructura saquiiforme. Dichos miocitos pueden ser miocitos no modificados o miocitos manipulados genéticamente. Sin embargo, también es posible que estén presentes células no miocíticas o precursoras en la estructura saquiiforme según la presente invención.

Cuando están presentes miocitos en el tejido manipulado de la estructura saquiiforme según la presente invención, la estructura tiene propiedades contráctiles.

El tejido cardíaco puede comprender fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, leucocitos incluyendo macrófagos y otras células de origen mononuclear además de miocitos cardíacos.

15 En general, las estructuras saquiiformes de la invención se pueden generar a partir de células musculares y no musculares así como a partir de mezclas de células musculares y no musculares. Las células musculares pueden incluir miocitos cardíacos derivados de células primarias y madre así como células esqueléticas y del músculo liso derivadas de células primarias y madre. Se prefiere usar miocitos cardíacos derivados de células madre o reprogramación para manipular la estructura de tejido cuando estén presentes dichos miocitos cardíacos.

20 Para manipular la estructura saquiiforme que incluye el tejido manipulado, una sustancia de andamiaje, como colágeno, se mezcla con medio de cultivo y el pH se ajusta según esto. Se puede añadir Matrigel a dicha solución, p. ej. con una concentración final de 5 a 15%. A continuación, la mezcla se añade a una suspensión celular de las células que van a estar presentes en el tejido manipulado para obtener una mezcla de reconstitución en condiciones de cultivo adecuadas.

25 Según la presente invención, la mezcla de reconstitución incluye células manipuladas genéticamente que contienen el gen que codifica factores paracrinos.

30 La invención proporciona además un método para la preparación de una estructura saquiiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero según se define en la reivindicación 10 y que comprende tejido manipulado, comprendiendo dicho tejido manipulado células manipuladas genéticamente que contienen un gen que codifica un factor paracrino y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo, dicho método comprende las etapas de

a) proporcionar una matriz que tiene un rebajo en una superficie de la matriz, rebajo que tiene dimensiones apropiadas para contener un volumen de reconstitución definido para la formación de la estructura saquiiforme,

35 b) proporcionar un cuerpo que tiene dimensiones correspondientes a las dimensiones deseadas del interior de la estructura saquiiforme que se va a formar, y colocar el cuerpo en el rebajo de la matriz de modo que el cuerpo esté separado de las paredes del rebajo para formar un espacio entre el cuerpo y las paredes del rebajo correspondiente al volumen de reconstitución necesario para la formación de una estructura saquiiforme,

40 c) depositar una mezcla de reconstitución en el rebajo, mezcla de reconstitución que comprende células de mamífero, como células alogénicas, o células autólogas, y un material de andamiaje adecuado que se puede incubar para formar una estructura de tejido manipulado que comprende dichas células,

d) incubar la mezcla de reconstitución hasta que se forme la construcción tisular dentro del rebajo de la matriz entre el cuerpo y la matriz,

e) cambiar el medio de cultivo una vez que se ha formado la construcción saquiiforme alrededor del cuerpo central,

f) retirar el cuerpo con la construcción tisular adherida al mismo del rebajo de la matriz, y

45 g) separar la construcción tisular del cuerpo,

en donde al menos una parte de las células de mamífero presentes en la estructura de tejido manipulado son células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo según se define en la reivindicación 10.

50 Así, según el método de la presente invención, se proporcionan una matriz con un rebajo en una superficie y un cuerpo, el cuerpo se dispone en el rebajo y una mezcla de reconstitución se introduce en el rebajo a fin de formar la construcción saquiiforme a partir de las células tisulares de la mezcla de reconstitución en el espacio entre la superficie externa del cuerpo y la superficie interna de las paredes de la matriz que definen el rebajo. La matriz junto con la

5 superficie del cuerpo es un molde. Según se usa en la presente memoria, el término matriz designa cualquier cuerpo que tenga un rebajo o cavidad usado para conformar un objeto o material y, p. ej., es un molde o una parte de un molde. En una realización preferida, la matriz es un material sólido no poroso. Esto tiene la ventaja de no impedir el desborde de la mezcla de reconstitución desde el rebajo a la matriz porosa según se describe en el documento WO 2008/058917. Por otra parte, no se necesita añadir medio de cultivo adicional aparte del medio contenido. Así, al vencer dichos problemas técnicos, el método de la presente invención proporciona un método fácilmente ampliable a escala.

10 Dentro del significado de la presente invención, el término "mezcla de reconstitución" indica una mezcla que comprende células de mamífero que incluyen células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino y dicho gen está bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo junto con material de andamiaje adecuado que se puede incubar para formar una estructura de tejido manipulado. La mezcla de reconstitución es para generar el tejido manipulado, como tejido cardíaco manipulado, y se describe p. ej. en el documento WO 2008/058917.

15 En otra realización, múltiples capas de mezclas de reconstitución se cuelean alrededor de la estructura saquiforme nuclear consolidada para formar tejidos manipulados más gruesos.

20 Esto es, la presente invención permite estructuras saquiformes fácilmente ampliables a escala. En una realización de la presente invención, el método según la presente invención se efectúa usando un cuerpo de matriz sólida no porosa, así, no se requiere medio de cultivo adicional aparte del medio de cultivo contenido en la mezcla de reconstitución. Al usar el cuerpo de globo inflable y desinflable, es posible una estimulación mecánica controlada y las células manipuladas modificadas genéticamente permiten liberar factores paracrinos adecuados para el tratamiento terapéutico, cardiogénico y regenerativo del corazón.

25 Por ejemplo, el cuerpo es una estructura inflable tal como un globo inflable que está conectado con medios para efectuar un inflado controlado precisamente del cuerpo. Al controlar el inflado, por ejemplo al usar una bomba adecuada, la dimensión del globo que forma el cuerpo se puede ajustar de forma precisa de modo que el espacio entre el cuerpo y las paredes del rebajo y, finalmente, el grosor de la pared y las dimensiones interiores de la estructura de tejido manipulado se puedan adaptar a la aplicación particular. El globo se puede inflar y desinflar durante o después de la formación de la estructura a una velocidad y un ritmo, p. ej. el ritmo sinusal, dados. Esto permitiría la estimulación de la carga y la descarga fisiológicas de un ventrículo y puede mejorar las propiedades morfológicas y funcionales de la estructura de tejido y permitir la medida de la fuerza mediante la técnica de cambio de presión en el globo desarrollada por esta estructura de tejido espontáneamente construida.

30 Esto es, la estructura de la presente invención se puede someter a una fuerza de tracción, por ejemplo, dicha fuerza de tracción es estrés estático, fásico o auxónico o una combinación de los mismos. Métodos adecuados se describen, p. ej., en los documentos WO 2008/058917 o WO 01/55297 que se incorporan en la presente memoria mediante referencia.

35 Además, en el método según la presente invención, la etapa b) se puede realizar antes o después que la etapa c) según se describe anteriormente.

40 Además, la presente invención se refiere al uso de una estructura saquiforme según la presente invención en un método para tratar una enfermedad que está asociada con la dilatación y el deterioro funcional del corazón de un mamífero o que está asociada con células cardíacas enfermas, el remodelado patológico del estroma cardíaco incluyendo pero no limitado a la matriz extracelular y la vasculatura. El tratamiento comprende las etapas en las que la estructura saquiforme según la presente invención se aplica a la superficie del corazón a fin de prevenir la distensión y/o resistir la dilatación del corazón y/o soportar la regeneración de células cardíacas enfermas por factores paracrinos. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano. El tratamiento puede incluir la retirada del pericardio por adelantado.

45 Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de la estructura saquiforme según la presente invención para la creación de modelos de enfermedad, el desarrollo de fármacos y la identificación así como la validación de dianas farmacológicas.

50 Finalmente, la presente invención se refiere a las células distintas a miocitos cardíacos que se definen en la reivindicación 14, para el uso en la preparación de una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero, en donde dichas células no cardíacas son células manipuladas genéticamente que contienen un gen que codifica un factor paracrino y/o un gen que codifica ARN como ARNm, y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible.

55 Por ejemplo, las células distintas de miocitos cardíacos para el uso según la presente invención son células seleccionadas de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células madre mesenquimales, células madre cardíacas y pericitos o células precursoras de dichas células o células madre pluripotentes, en donde dichas células madre pluripotentes no se producen usando un procedimiento que implique modificar la identidad genética de la línea germinal de seres humanos o que implique el uso de un embrión humano con propósitos industriales o comerciales.

Las células manipuladas pueden ser células manipuladas que incluyen los sistemas promotores inducibles, por ejemplo un sistema promotor inducible químicamente según se describe en la presente memoria. El experto está totalmente al tanto de sistemas adecuados aplicados en seres humanos u otros mamíferos.

5 Las células distintas de miocitos cardíacos para el uso según la presente invención son particularmente células alogénicas o autólogas del sujeto que se espera que reciba la estructura saquiforme según la presente invención.

La presente invención se describirá mediante ejemplos adicionalmente sin limitar la misma a estos.

Ejemplos

Preparaciones de células

10 Para la construcción de tejido cardíaco manipulado como EHM humano (como por ejemplo se describe en Soong et al. Current Protocols in Cell Biology (2012) 23.8.1-23.8.21) y BioVADs (dispositivo biológico de asistencia ventricular, Yildirim et al. Circulation (2007), 116:1-16-1-23) con actividad paracrina (paraBioVAD), se necesitan cardiomiocitos y células no miocíticas. Para la construcción de tejido saquiforme no contráctil con actividad paracrina (paraPouch) solamente se necesitan células no miocíticas. Los cardiomiocitos se derivan típicamente de células madre pluripotentes o programación directa. Las células no miocíticas (es decir, típicamente células mesenquimales) procedente de biopsias cutáneas o gingivales, material de liposucción, biopsias cardíacas, médula ósea o sangre. 15 Aquí, se usaron cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes humanas y fibroblastos de prepucio con y sin modificación genética (es decir, expresión de IGF-1 inducible por Tet) como un ejemplo y se mezclaron en un hidrogel de colágeno con medio de cultivo (2x DMEM) para formar una mezcla de reconstitución de EHM, paraBioVAD o paraPouch (Tabla 1).

20 Tabla 1: Composición de la mezcla de reconstitución

Mezcla de reconstitución*	4x EHM	1x paraBioVAD	1x paraPouch
Colágeno-hidrogel (3,2 mg/ml)	440 µl	2.200 µl	2.200 µl
2X DMEM	535 µl	2.675 µl	2.675 µl
**NaOH 0,1 N	95 µl	475 µl	475 µl
***Matrigel®	200 µl	-	-
****Número de células (volumen adaptado)	6x10 ⁶	26x10 ⁶	10x10 ⁶
*****VOLUMEN TOTAL	2.100 µl	8.400 µl	8.400 µl

*Se puede adaptar según la dimensión buscada del EHM, paraBioVAD (tamaño de corazón de rata) o paraPouch (tamaño de corazón de rata).

25 **Se añade NaOH 0,1 N hasta que el indicador de pH (rojo fenol) sugiere un pH de 7,2-7,6. Los volúmenes dados necesitan adaptarse según la lectura del indicador, pero están típicamente dentro de más/menos 20 µl de los volúmenes indicados.

***Matrigel se puede omitir completamente sin compromiso en la función de EHM, paraBioVAD o paraPouch.

30 ****La suspensión celular contiene cardiomiocitos y HFF (75%:25%; EHM, paraBioVAD) o 100% de HFF. El número de células se puede adaptar según sea necesario. El volumen de la suspensión celular se tiene que adaptar según el VOLUMEN TOTAL buscado.

*****El VOLUMEN TOTAL se puede incrementar o disminuir según sea necesario con la condición de que los constituyentes se incrementen o disminuyan proporcionalmente.

Construcción de tejido manipulado

35 Las células como suspensión monocelular se mezclaron a fondo con colágeno, 2X DMEM, NaOH y en el caso de EHM con Matrigel en un tubo de centrifuga de 15 ml preenfriado en consecuencia (Tabla 1). Se añadió NaOH gota a gota hasta que el indicador de color rojo fenol cambia de amarillo (ácido) a rosa. Para EHM, se distribuyeron rápidamente 450 µl de mezcla de reconstitución (Tabla 1) en moldes de colada individuales y se pusieron en una incubadora

humidificada a 37°C con CO₂ al 5% durante 1 hora. Después de eso, 6 ml de medio de EHM completo precalentado se superpusieron hasta que todos los EHM se cubrían completamente con medio y a continuación se incubaron durante 24 horas más y el medio se cambió posteriormente cada dos días. Después de que los EHM se hubieran condensado progresivamente, típicamente después de 3 días, se transfirieron sobre soportes de silicona resilientes (Soong et al. *Current Protocols in Cell Biology* (2012) 23.8.1-23.8.21).

Antes de la transferencia de EHM condensados, el número necesario de soportes de silicona se puso en primer lugar en una placa de cultivo tisular rellena con medio de EHM. Posteriormente, la parte superior del tubo de silicona retirable de un plato moldeador de colada se sujetó suavemente con unas pinzas curvadas y se retiró lentamente del plato de colada. A continuación, el tubo de silicona se puso sobre uno de los polos de silicona emparejados de un soporte de silicona y el EHM se liberó mediante agitación o empujón suaves con una punta de pipeta. Con la ayuda de otra punta de pipeta estéril, el otro polo de silicona se curvó suavemente para suspender el EHM entre los 2 polos. El EHM en contracción curvará los soportes de silicona induciendo una carga dinámica para trabajar contra el EHM. El medio se cambió cada 2 días a lo largo de los 7 días siguientes de maduración de EHM. Los EHM estaban listos para los análisis de los criterios de valoración el día 10 de cultivo.

Medidas de la fuerza isométrica

Las medidas de la fuerza de EHM se realizaron en baños orgánicos termostatzados (FMI GmbH) según se describe previamente. Brevemente, después del día 7 de cultivo de EHM sobre extensores de silicona, los EHM se retiraron cuidadosamente y se pusieron sobre los ganchos de un transductor de fuerza en un baño orgánico cargado con solución de Tyrode (Zimmermann et al. *Biotechnol. Bioeng.* (2000) 68(1):106-14). Los EHM se estimularon con campo a través de dos electrodos de platino a 2 Hz (impulsos monofásicos de 5 ms, 200 mA) y se precargaron hasta la longitud de producción máxima de fuerza (L_{máx}). A continuación, los datos de respuesta a concentraciones de calcio crecientes (de 0,2 a 4 mmol/l) se adquirieron usando el software BMON y se analizaron mediante el software AMON (ambos Jäckel; Hanau, Alemania).

Disociación de EHM para citometría de flujo

Para obtener células a partir de EHM para citometría de flujo, cada EHM se cortó por la mitad y se incubó en 1 ml de colagenasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los fragmentos grandes restantes se desgarraron suavemente con dos agujas de 27G para obtener fragmentos menores en el pocillo de cultivo tisular. A continuación, se realizó una disociación enzimática adicional de los fragmentos. Después de que se obtuvieran células individuales a partir de la disociación de los EHM, las células se fijaron en EtOH al 70% y se mantuvieron a 4°C hasta citometría de flujo.

Construcción de moldes de paraBioVAD y paraPouch

Se requerían modificaciones de los protocolos BioVAD de rata originales (Yildirim et al. *Circulation* (2007), 116:1-16-1-23) para crear un molde de colada ampliable a escala para la generación de paraBioVAD y paraPouches humanos grandes. Además, para conferir un formato de cultivo biomimético con acción pulsátil regular, se requiere diseñar una estructura interna inflable.

Una serie de cubos de colada de Makrolon® (Bayer MaterialScience) se ahuecaron a máquina esféricamente para generar moldes de colada de 18 mm, 20 mm y 30 mm. Se vertió 10% de agarosa fundida en el molde de colada de 18 mm y se enfrió para formar una bola de agarosa esférica solidificada y se atravesó con una púa de madera central. Posteriormente, la bola y la barra se retiró, se colocó centradamente en un molde de colada de 20 mm y se vertió silicona líquida (relación de Silicone 2000 y agente de curado 9:1) alrededor de la bola de agarosa de 18 mm y se dejó curar uniformemente durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, la bola y la barra revestidas solidificadas se retiraron y se pusieron en agua hirviendo hasta que la agarosa interna se disolvía, dando una esfera inflable con un diámetro externo de 20 mm y un grosor de la pared de 1 mm. Esta esfera inflable de 20 mm se colocó a continuación en un molde de colada de 30 mm y se conectó a un catéter urinario de silicona de 10 G (BARD, EE. UU.).

Preparación de moldes de colada para soporte biométrico

En primer lugar, la esfera de silicona se conectó a un respirador mecánico para animales (FMI, GmbH) y se infló para comprobar desgarros superficiales a fin de asegurar una función pulsátil apropiada. Posteriormente, los bloques de colada con esferas de silicona unidas se hirvieron, se drenaron y se trataron en autoclave para esterilizar todo el aparato. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el molde de colada BioVAD se podía usar entonces para la siembra de la mezcla de reconstitución.

paraBioVAD y paraPouch humanos

Se combinaron mezclas monocelulares con medio de cultivo (2x DMEM) y colágeno con pH neutralizado (Tabla 1). La mezcla de reconstitución enfriada con hielo (4°C) se trituró a fondo sobre hielo y a continuación se transfirió rápidamente a los moldes para facilitar la formación de una construcción tisular saquiforme (similar para paraBioVAD y paraPouch). Se añadió medio de cultivo adicional después de 24 h y a continuación se cambió cada dos días. Desde

los días de cultivo 3 a 8, se inició una extensión pulsátil uniforme (10% de deformación, 90 latidos por minuto) usando un respirador mecánico para inflar y desinflar la esfera central. Las condiciones no pulsátiles servían como control (0% de deformación).

Histología

5 Se prepararon secciones de parafina después de la fijación de tejido en formaldehído al 4% (Histofix, Roth) durante la noche. Esto se siguió por tinción con hematoxilina y eosina siguiendo protocolos estándar (Zimmermann et al. *Circulation Research* (2002) 90(2):223-30).

Construcción de lentivirus que codifica IGF-1

10 Se adquirieron los plásmidos pCMV-XL4 (SC119792; Origene), pLVx-Tight-Puro y pTetOn (ambos Lenti-X™ TetOn® Advanced inducible expression system, 632162; Clontech) y se usaron en el desarrollo de la secreción de IGF-1 basada en células. pCMV-XL4 consiste en el transcrito de IGF-1 humano de longitud completa; pLVx-Tight-Puro es un vector de respuesta de expresión que consiste en un promotor CMV modificado (PTight) con elementos reguladores de las secuencias operativas de tetraciclina e incluye un gen de resistencia a puomicina; pTet-On-Advanced es el plásmido transactivador que contiene una versión mejorada de la proteína transactivadora controlada por tetraciclina inversa (rtTA), y también incluye un gen de resistencia a neomicina. En primer lugar, el plásmido pLVx-Tight-Puro se digirió con las enzimas de restricción NotI y XbaI (ambas FastDigest®, Fermentas) en una reacción de doble digestión para generar un plásmido linealizado (linpLVx-Tight-Puro). La mezcla de reacción de restricción incluía: 1,0 µl de NotI, 1,0 µl de XbaI, 2 µl de tampón FastDigest®, 1 µg/µl de plásmido pLVx-Tight-Puro. Esto se incubó a 37°C durante 4 horas y posteriormente se termoinactivó a 85°C durante 5 minutos. El producto de digestión por restricción se separó sobre un gen de agarosa al 1%, se visualizó mediante tinción con EtBr, se cortó y se purificó. El vector linpLVx-Tight-Puro linealizado purificado se almacenó a -20°C hasta que se requiriera.

25 Posteriormente, una reacción de mezcla madre que contenía 250 ng de producto amplificado de IGF-1 humano purificado, 100 ng de linpLVx-Tight-Puro, 4 µl de tampón de ligación rápido (5X), 1 µl de ADN ligasa de T4 (5 unidades/µl) se ensambló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para generar el plásmido pLVx-Tight-hIGF1-Puro recombinante.

30 A continuación, una cepa de *E. coli* negativa para ADN metilasa (dam-) químicamente competente (One Shot® INV110; Invitrogen) se transformó químicamente con 2 µl de plásmido pLVx-Tight-hIGF1-Puro según el protocolo del fabricante. Se seleccionaron colonias positivas que contenían el plásmido ligado mediante resistencia a ampicilina y se confirmaron adicionalmente mediante PCR de colonias con los cebadores de hIGF-1 listados anteriormente. Brevemente, una colonia de *E. coli* transformada se recogió y se inoculó en un tubo que contenía la misma mezcla madre de PCR y se amplificó por PCR. A continuación, se realizó la amplificación de una colonia de *E. coli* transformada positivamente que contenía el plásmido mediante inoculación con presilla estéril de una sola colonia en un matraz cónico de vidrio de 2 l que contenía 250 ml de medio LB complementado con 100 µg/ml de ampicilina en una incubadora de remoción a 37°C (Innova 4300) con agitación constante a 200 rpm durante 24 horas. 35 Posteriormente, el plásmido pLVx-Tight-hIGF1-Puro amplificado se extrajo y se purificó según el protocolo del fabricante para la recuperación máxima de plásmido puro (NucleoBond® Xtra Maxi; Macherey-Nagel). El plásmido ligado purificado se almacenó a -20°C hasta que se requiriera.

Producción de lentivirus

40 Para generar lentivirus que codifica IGF-1, células TSA se transfectaron con 3 µg de pLVx-Tight-hIGF1-Puro, 2 µg de plásmidos pCMV2.1 y 3 µg de pMD2G (Trono Lab, EPFL, Suiza) usando lipofección con Polyfect (Qiagen). El medio de cultivo celular se cambió después de 16 horas y se recogió medio que contenía partículas lentivirales de IGF-1 recombinantes 48 horas más tarde. El Len-tiX™ Go Stix™ (Clontech) se usó según el protocolo del fabricante para determinar el título de $>5 \times 10^6$ IFU/ml de las partículas lentivirales.

45 Para generar el virus que contiene el transactivador Tet-On, también se usaron células TSA como células hospedadoras y se transfectaron con la misma técnica que se describe anteriormente. De nuevo, el medio de cultivo celular se cambió después de 16 horas y el medio que contenía partículas lentivirales Tet-On recombinantes se recogió 48 horas más tarde. A continuación los lentivirus tanto hIGF-1 como Tet-On se almacenaron en un congelador a -80°C hasta que se requirieran.

Transducción lentiviral de fibroblastos de prepucio humano

50 Antes de las transducción de HFF con los lentivirus, medio de cultivo celular reciente con 0,5% de FBS se intercambió y se complementó con 10 µg/ml de bromuro de hexadimetrina (polibreno, Millipore) a 37°C durante 10 minutos. El polibreno es un polímero catiónico, que neutraliza las cargas de las membranas celulares e incrementa la eficacia de transducción de virus cuando se añade a medio de cultivo celular. Posteriormente, el medio de cultivo celular acondicionado procedente de células TSA que contenían lentivirus IGF-1 recombinante se estratificó gota a gota sobre 55 células HFF cultivadas en una placa de cultivo celular de 100 mm y a continuación se incubó en una incubadora celular de 37°C, 5% de CO₂, durante 72 horas. Posteriormente, medio HFF reciente con 15% de FBS se intercambió y se complementó con 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Miltenyi) y 1 µg/ml de puomicina

(Invitrogen). Después de 7 días, las células supervivientes se seleccionaron con células HFF^{hIGF1+}.

5 Para generar una secreción inducible estable de IGF-1 humano a partir de células HFF, las células HFF^{hIGF1+} se transdujeron a continuación con lentivirus pTet-On-Advanced según se esboza anteriormente, seguido por cultivo extendido en medio que contenía 1 µg/ml de puomicina y 800 µg/ml de neomicina (Invitrogen) durante 7 días. Las células que sobrevivían a la doble selección con antibiótico se consideraban satisfactoriamente transducidas con virus tanto hIGF-1 como Tet-On para generar la línea celular de IGF-1 humano inducible: HFF^{hIGF1+TetOn+}. Estas células se amplificaron hasta una cantidad deseada y se congelaron como cultivos celulares de reserva a -80°C hasta que se requirieran.

Análisis de la expresión y la secreción de IGF-1

10 Los sobrenadantes de células transfectadas y no transfectadas se recogieron y se almacenaron a -20°C hasta un uso adicional. Para obtener lisados celulares de estos cultivos, las células se enjuagaron a fondo con PBS para evitar la contaminación del sobrenadante. Posteriormente, se estratificaron sobre las células 400 µl de tampón de extracción de proteína CytoBuster (Novagen) y se dejó incubar sobre hielo durante 30 minutos. Posteriormente, con la ayuda de un rascador de células, los lisados se recogieron individualmente en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se centrifugaron a 12.000 x g durante 30 minutos para nodulizar el residuo celular. El sobrenadante por encima de este residuo celular se recogió a continuación en tubos de microcentrifuga estériles y se designaron como residuos celulares y se almacenaron a -20°C hasta que se requirieran adicionalmente.

Detección por ELISA de IGF-1

20 La concentración de IGF-1 en sobrenadantes de cultivo celular se midió con un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) tipo sándwich siguiendo el protocolo del fabricante (IGF-1 humano Quantikine®; R&D systems). Los resultados se registraron a 450 nm y se analizaron con un lector de microplacas (FlexStation 3; Molecular Devices).

Detección por transferencia Western de AKT y fosfoAKT

25 Los lisados celulares se cuantificaron con un ensayo de proteínas de Bradford estándar para estandarizar las concentraciones de proteína de carga y se procesaron usando protocolos de transferencia Western estándar. Brevemente, las proteínas se resolvieron en un gel de SDS al 10%-poliacrilamida seguido por una transferencia isofóretica de 400 mA a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 - 0,4 µm (Protran, Whatman) a 400 mA durante 1 hora. Todas las transferencias de membrana se bloquearon con tampón de bloqueo (suero caprino al 5% en PBS) durante 1 hora seguido por incubación con anticuerpos primarios contra AKT y fosfo(Ser473)-AKT (ambas Cell Signalling; 1:1.000) y GAPDH (Santa Cruz, 1:1.000) durante la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana se lavó a fondo con tampón de TBST al 1% (Appendix) y se incubó con anticuerpos secundarios (anti-IgG de ratón) caprina, 1:20.000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Para visualizar las bandas de proteína, la membrana se incubó con sustrato de peroxidasa de rábano picante (estuche SuperSignal West Femto; Pierce, Thermo Scientific) y se reveló con un sistema de detección de membranas (VersaDoc; BioRad) y se analizó con software Quantity One (BioRad).

35 Ensamblaje de paraBioVAD humano (paraBioVAD)

Para conferir la modalidad paracrina al hBioVAD, se mezclaron entre sí 18,2 x 10⁶ cardiomiocitos derivados de hESC y 7,8 x 10⁶ células HFF^{hIGF1+TetOn+} para generar un paraBioVAD según se destaca en la Tabla 1 y se dejaron condensar durante la noche. Posteriormente, el paraBioVAD se dejó condensar adicionalmente durante otros 9 días antes de la implantación.

40 Implantación de paraBioVAD humano en rata Wistar

45 El paraBioVAD se implantó en una rata Wistar macho de 450 g (Charles River). La implantación se realizó bajo anestesia con isoflurano (4%). El corazón se expuso después de esternotomía mediana y refracción cuidadosa del pericardio. Posteriormente, el paraBioVAD se deslizó sobre los corazones, envolviendo el ápice, los ventrículos izquierdo y derecho y se aseguró con 2 suturas (proleno 6-0, Ethi-con). Después del cierre de las suturas, se administraron ciclosporina A (5 mg/kg) y metilprednisolona (2 mg/kg) diariamente de forma subcutánea para suprimir la respuesta inmunitaria.

Estadística

50 Se usó software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc; San Diego) para convertir los grupos de datos en gráficas (presentadas como media ± SEM) y se sometieron a la prueba de la t de Student, la prueba de ANOVA unidireccional o bidireccional cuando fuera apropiado. Se consideraba que P < 0,05 era significativa.

Resultados

Para demostrar la viabilidad y la funcionalidad después de la transducción de células HFF con este sistema de transducción lentiviral Tet-On, los inventores cuantificaron los niveles de proteína de IGF-1 humano en los sobrenadantes acondicionados de 72 horas y los lisados celulares recogidos de HFF^{wt} y HFF^{hIGF1+TetOn} transducidas

con y sin exposición a doxiciclina. Se probaron diferentes concentraciones de doxiciclina (10 - 100 ng/ml). Los inventores observaron que en los sobrenadantes de células HFF^{hIGF1+TetOn} no estimuladas se secretaban niveles de proteína de IGF-1 humano en aproximadamente 2,8 ng/ml de medio mientras que las células HFF^{wt} secretaban solamente 0,4 ng/ml de proteína de IGF-1. En los lisados celulares procedentes de células HFF^{wt} y HFF^{hIGF1}, se detectó proteína de IGF-1 humano mínima (0,16 ng/ml y 0,23 ng/ml, respectivamente). La exposición a estimulación con doxiciclina conducía a un incremento de 10 veces de proteína de IGF-1 humano en los sobrenadantes y los lisados celulares de células HFF^{hIGF1+TetOn}, mientras que se detectaba proteína de IGF-1 mínima a partir de células HFF^{wt} (Tabla 2). Incrementar las concentraciones de doxiciclina no incrementaba significativamente la producción de proteína de IGF-1.

5

10

Tabla 2: Cuantificación de proteína de IGF-1 humano (en ng/ml) a partir de células HFF^{wt} y HFF^{hIGF1+TetOn} establemente transducidas con y sin exposición a doxiciclina.

Doxiciclina (ng/ml)		0	10	30	100
HFF^{wt}	Sobrenadante	0,39	0,40	0,39	0,38
	Lisado celular	0,16	0,16	0,17	0,16
HFF^{-hIGF1+TetOn}	Sobrenadante	2,77	20,29	19,58	20,07
	Lisado celular	0,23	20,35	20,38	20,04

Se examinaron los mediadores aguas abajo de la acción paracrina de IGF-1 secretado sobre la ruta de señalización de hipertrofia en cardiomiocitos derivados de hESC. El medio acondicionado libre de suero de 72 horas procedente de células HFF^{wt} y HFF^{hIGF1+TetOn} no estimuladas y estimuladas con doxiciclina se recogió y se estratificó sobre cardiomiocitos derivados de hESC del día 16 durante 30 minutos. A continuación, los cardiomiocitos se recogieron y se sometieron a lisis. Los análisis de transferencia Western de los lisados de cardiomiocitos hESC revelaban que las proteínas de Akt fosforilada (pAkt) eran superiores en células HFF^{hIGF1+TetOn} no estimuladas y estimuladas en comparación con células HFF^{wt} (Figura 1).

15

20

Para probar la eficacia específica de liberación de IGF-1 inducida por doxiciclina sobre el músculo cardíaco, los inventores complementaron los EHM con 20% de células bien HFF^{wt} o bien HFF^{hIGF1+TetOn}. Posteriormente, los EHM se transfirieron a polos de silicona flexibles el día 3 de cultivo. El día 7 de cultivo, se añadieron 10 ng/ml de doxiciclina al medio de EHM para inducir la secreción de hIGF-1 de células HFF. Los EHM de control se dejaron sin doxiciclina. Los EHM se sometieron a medidas de fuerza 72 horas más tarde. Los análisis de las fuerzas revelaban que, a pesar de la ausencia de estimulación con doxiciclina, los EHM generados con células HFF^{hIGF1+TetOn} desarrollaban fuerzas de contracción más intensas en comparación con los EHM generados con células HFF^{wt}. Sin embargo, el EHM complementado con doxiciclina con células HFF^{hIGF1+TetOn} desarrollaba las fuerzas más intensas en comparación con todos los otros grupos de EHM (Figura 2) a través de concentraciones de calcio variables, con una fuerza máxima a 3,2 mmol/l de Ca²⁺.

25

30

A continuación, los inventores digirieron enzimáticamente estos EHM humanos, aislaron células individuales y analizaron los tamaños de las células de cada grupo usando citometría de flujo y observaron que las células eran mayores en presencia de IGF-1 humano (Figura 3). El tamaño aumentado de las células no miocíticas se puede deber a la adición de HFF^{-hIGF1+TetOn} "grandes". En contraste, la hipertrofia de los cardiomiocitos parece estar estimulada por la actividad paracrina de HFF. Los inventores realizaron tinción inmunofluorescente de toda la preparación microscópica en ambos grupos de EHM y observaron que los cardiomiocitos eran generalmente alargados y estaban alineados anisótricamente y forman haces cardíacos. Sin embargo, los EHM generados a partir de cardiomiocitos mezclados con HFF^{hIGF1+TetOn} parecían contener haces musculares más gruesos y cardiomiocitos alargados.

35

Para preparar finalmente el BioVAD con liberación de IGF-1 paracrina, se añadió 20% de HFF^{-hIGF1+TetOn} a la mezcla de reconstitución de BioVAD. Esto daba paraBioVAD con apariencia similar al BioVAD "simple".

40

Un paraBioVAD individual se implantó en una rata Wistar inmunosuprimida y se recogió después de 3 semanas. Se observó que el explante se había contraído hacia el ápice pero permanecía unido y todavía abarcaba los ventrículos. A continuación, los inventores realizaron tinciones habituales con hematoxilina y eosina (H&E) y rojo sirio para estudiar la morfología del paraBioVAD explantado con relación al corazón de rata y observaron que el paraBioVAD generalmente permanecía intacto sobre el corazón de rata.

45

Se observaba una clara zona fronteriza entre el corazón y el paraBioVAD (Figura 4). Generalmente, un hueco de 50-100 µm distingue el corazón del paraBioVAD. Sin embargo, en varias partes, existían claras "zonas de contacto" entre

el paraBioVAD y el miocardio receptor (Figura 4A, B, C). También se observaban células alargadas de "tipo miocárdico" (Figura 4 C). De forma interesante, varias partes mostraban estructuras vasculares en desarrollo (Figura 4D, E, F), sugiriendo una vascularización temprana.

5 Los inventores razonaron que la secreción paracrina controlada farmacológicamente de IGF-1 podría conferir un beneficio terapéutico adicional a la tecnología BioVAD. Para conseguir esto, se generó una línea celular de fibroblastos con secreción de IGF-1 estable bajo el control del dominio activador Tet-On. Sin embargo, ya bajo condiciones no estimuladas, la liberación de IGF-1 se mejoraba, pero se podía mejorar adicionalmente mediante complementación con doxiciclina. En estas células, la secreción de IGF-1 alcanzaba una concentración máxima ya bajo 10 ng de doxiciclina. Esto era inesperado y aboga bien por una activación de todo o nada, bien por la necesidad de probar concentraciones de doxiciclina incluso inferiores o bien por una linealidad insuficiente del ELISA de IGF-1. Finalmente, se puede necesitar explotar sistemas inducibles farmacológicamente alternativos para permitir un control total de la liberación de IGF-1.

15 La activación semimáxima (EC50) de receptor de IGF-1 está en 2 ng/ml de IGF-1. Las células transducidas con IGF-1 complementaban el medio de cultivo con 20,3 ng/ml de IGF-1 en 30 minutos. Los inventores también observaron hipertrofia en fibroblastos que expresan IGF-1, que podría ser bien un efecto indirecto del enfoque transgénico o bien deberse a estimulación autocrina.

20 El IGF-1 se ha estudiado intensivamente en la biología del músculo esquelético y sus efectos sobre el envejecimiento. El IGF-1 circulatorio producido a partir del hígado típicamente activa las rutas de PI3K/Akt/mTOR y MAPK. Sus efectos sobre los cardiomiocitos son principalmente supervivencia mejorada e hipertrofia; ambas son probablemente en respuesta a la activación de AKT. Diferentes isoformas de IGF-1 se han relacionado con la biología de los cardiomiocitos. En este estudio, la variante 4 de IGF-1 se sobreexpresaba para activar la hipertrofia de prosupervivencia y fisiológica en EHM. El medio acondicionado procedente de fibroblastos que secretan IGF-1 humano incrementaba la fosforilación de Akt en cardiomiocitos derivados de hESC de un modo paracrina. Estos cardiomiocitos también eran significativamente mayores que los no expuestos a IGF-1, sugiriendo un programa de activación génica hipertrófica.

25 En construcciones de tejido cardíaco humano tridimensionales, los resultados de los inventores demostraban que los EHM enriquecidos en IGF-1 desarrollaban fuerzas contráctiles mejoradas en comparación con EHT no enriquecidos en IGF-1. Aquí, la adición de doxiciclina para mejorar la liberación de IGF-1 mejoraba en efecto adicionalmente la fuerza contráctil. Este modelo refleja mejor que un experimento de cultivo en monocapa clásico (como el realizado para el primer cribado con respecto a la actividad biológica; Fig. 1) el ambiente in vivo complejo con sus problemas de difusión considerable y unión a péptidos inespecífica. Así, los datos de EHM presentados (Figura 2) proporcionan un primer estudio demostrativo preliminar para el concepto de soporte de tejido cardíaco propuesto a través de paraBioVADs o paraPouches.

30 Dado que IGF-1 representa un papel en muchas rutas de señalización incluyendo la proliferación, la diferenciación y la hipertrofia, no sería sorprendente que los niveles de IGF-1 puedan ser responsables de la regulación de las fuerzas de contracción. En efecto, varios estudios han demostrado que IGF-1 se une a tirosina cinasa receptora y activa Akt a través de PI3K, y mejora los canales de corrientes de Ca²⁺ de tipo L. Por otra parte, los estudios de sobreexpresión de Akt en el miocardio también sugieren un incremento de la actividad de canales de calcio en miocitos ventriculares.

35 Finalmente, los inventores integraron los fibroblastos liberadores de IGF-1 en el sistema BioVAD humano para probar la viabilidad de la implantación de paraBioVAD. Los paraBioVAD se generaron con 20% de células HFF^{hIGF1+TetOn}. De forma importante, la rata receptora sobrevivía a la operación sin evidencia de constricción pericárdica u otras complicaciones. No se detectaron formaciones de teratomas.

40 Después de la explantación del corazón de rata, las tinciones histológicas revelaban zonas de paraBioVAD que se asemejaban a estructuras miocárdicas. Había una clara supervivencia de células dentro del injerto que eran alargadas y estaban alineadas en la zona fronteriza, confirmando que estas construcciones cardíacas manipuladas pueden sobrevivir después de los trasplantes de acuerdo con otros estudios.

45 Los inventores se sintieron alentados por la observación de vascularización en varias zonas dentro del paraBioVAD. En efecto, la vascularización es un punto crítico en los intentos de generar construcciones de tejido cardíaco humanizado.

REIVINDICACIONES

1. Una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero, dicha estructura saquiforme comprende un tejido manipulado *in vitro*, caracterizada por que al menos una parte del tejido manipulado comprende un material de andamiaje y células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino, estando dicho gen que codifica el factor paracrino bajo el control de un sistema promotor inducible químicamente seleccionado de un sistema basado en tetraciclina, un sistema basado en rapamicina, un sistema basado en progesterona y un sistema basado en ecdisona, o un sistema promotor heterólogo que no está presente naturalmente en la célula, en donde las células manipuladas genéticamente son células seleccionadas de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células madre mesenquimales, células madre cardíacas, pericitos y leucocitos, y en donde el factor paracrino es un factor paracrino seleccionado de IGF-1, VEGF, HGF, PDGF, SDF-1 o ARNm, que tiene actividad cardioprotectora y/o inductora de la cardiorregeneración.
2. La estructura saquiforme según la reivindicación 1, en la que las células manipuladas genéticamente son células alogénicas o células autólogas.
3. Una estructura saquiforme según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el tejido manipulado comprende adicionalmente miocitos y/u otras células del tejido cardíaco distintas de miocitos cardíacos.
4. La estructura saquiforme según la reivindicación 3, en la que los miocitos adicionales son miocitos cardíacos.
5. La estructura saquiforme según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el factor paracrino se selecciona de miR133, miR1, miR499, miR-208, miR-199a-3p, miR-590-3p, miR1825, miR33b.
6. La estructura saquiforme según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la estructura tiene propiedades contráctiles.
7. La estructura saquiforme según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el gen que codifica un factor paracrino está bajo el control del promotor heterólogo que no está presente naturalmente en la célula.
8. Una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero, dicha estructura saquiforme comprende un tejido manipulado caracterizado por que al menos una parte del tejido manipulado comprende células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino, estando dicho gen que codifica el factor paracrino bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo que no está presente naturalmente en la células, en donde las células manipuladas genéticamente son células seleccionadas de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células madre mesenquimales, células madre cardíacas, pericitos y leucocitos, y en donde el factor paracrino es un factor paracrino seleccionado de IGF-1, VEGF, HGF, PDGF, SDF-1 o ARNm, que tiene actividad cardioprotectora y/o inductora de la cardiorregeneración, en particular, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para el uso en aplicaciones terapéuticas.
9. El uso de una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero en aplicaciones de creación de modelos de enfermedad y desarrollo de fármacos, dicha estructura saquiforme comprende un tejido manipulado caracterizado por que al menos una parte del tejido manipulado comprende células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino, estando dicho gen que codifica el factor paracrino bajo el control de un sistema promotor inducible o un sistema promotor heterólogo que no está presente naturalmente en la célula, en donde las células manipuladas genéticamente son células seleccionadas de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células madre mesenquimales, células madre cardíacas, pericitos y leucocitos, y en donde el factor paracrino es un factor paracrino seleccionado de IGF-1, VEGF, HGF, PDGF, SDF-1 o ARNm que tiene actividad cardioprotectora y/o inductora de la cardiorregeneración, en particular, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Un método para la preparación de una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero y que comprende tejido manipulado, comprendiendo dicho tejido manipulado un material de andamiaje y células manipuladas genéticamente, que contienen un gen que codifica un factor paracrino y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible químicamente seleccionado de un sistema basado en tetraciclina, un sistema basado en rapamicina, un sistema basado en progesterona y un sistema basado en ecdisona, o un sistema promotor heterólogo que no está presente naturalmente en la célula, dicho método comprende las etapas de
- proporcionar una matriz que tiene un rebajo en una superficie de la matriz, rebajo que tiene dimensiones apropiadas para contener un volumen de reconstitución definido para la formación de la estructura saquiforme,
 - proporcionar un cuerpo que tiene dimensiones correspondientes a las dimensiones deseadas del interior de la estructura saquiforme que se va a formar, y colocar el cuerpo en el rebajo de la matriz de modo que el cuerpo esté separado de las paredes del rebajo para formar un espacio entre el cuerpo y las paredes del rebajo correspondiente al volumen de reconstitución necesario para la formación de una estructura saquiforme,

c) depositar una mezcla de reconstitución en el rebajo, mezcla de reconstitución que comprende células de mamífero, como células alogénicas, o células autólogas, y un material de andamiaje adecuado que se puede incubar para formar una estructura de tejido manipulado que comprende dichas células,

5 d) incubar la mezcla de reconstitución hasta que se forme la construcción tisular dentro del rebajo de la matriz entre el cuerpo y la matriz,

e) cambiar el medio de cultivo una vez que se ha formado la construcción saquiforme alrededor del cuerpo central,

f) retirar el cuerpo con la construcción tisular adherida al mismo del rebajo de la matriz, y

g) separar la construcción tisular del cuerpo,

10 en donde al menos una parte de las células de mamífero presentes en la estructura de tejido manipulado son células manipuladas genéticamente, en donde dichas células manipuladas genéticamente contienen un gen que codifica un factor paracrino y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible seleccionado de un sistema basado en tetraciclina, un sistema basado en rapamicina, un sistema basado en progesterona y un sistema basado en ecdisona, o un sistema promotor heterólogo que no está presente naturalmente en la célula, en donde las células manipuladas genéticamente son células seleccionadas de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células madre mesenquimales, células madre cardíacas, pericitos y leucocitos o células precursoras de dichas células y en donde el factor paracrino es un factor paracrino seleccionado de IGF-1, VEGF, HGF, PDGF, SDF-1 o ARNm, que tiene actividad cardioprotectora y/o inductora de la cardiorregeneración.

15 11. El método para la preparación de la estructura saquiforme según la reivindicación 10, en el que el cuerpo es una estructura inflable.

20 12. El método según la reivindicación 10 u 11, en el que después de la etapa h) la estructura se somete a estrés por tracción.

13. El método según la reivindicación 12, en el que dicho estrés por tracción es estrés estático, fásico o auxotónico o una combinación de los mismos.

25 14. El uso de células manipuladas genéticamente, en la preparación de una estructura saquiforme adecuada para envolver al menos una parte del corazón de un mamífero, en donde dichas células son células manipuladas genéticamente que contienen un gen que codifica un factor paracrino y/o un gen que codifica ARN, como ARNm, y estando dicho gen bajo el control de un sistema promotor inducible químicamente seleccionado de un sistema basado en tetraciclina, un sistema basado en rapamicina, un sistema basado en progesterona y un sistema basado en ecdisona, en donde las células manipuladas genéticamente son células seleccionadas de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células madre mesenquimales, células madre cardíacas, pericitos y leucocitos o células precursoras de dichas células y en donde el factor paracrino es un factor paracrino seleccionado de IGF-1, VEGF, HGF, PDGF, SDF-1 o ARNm, que tiene actividad cardioprotectora y/o inductora de la cardiorregeneración.

30 15. El uso de células manipuladas genéticamente, según la reivindicación 14, en donde dichas células son células alogénicas o autólogas del sujeto que se espera que reciba dicha estructura saquiforme.

35

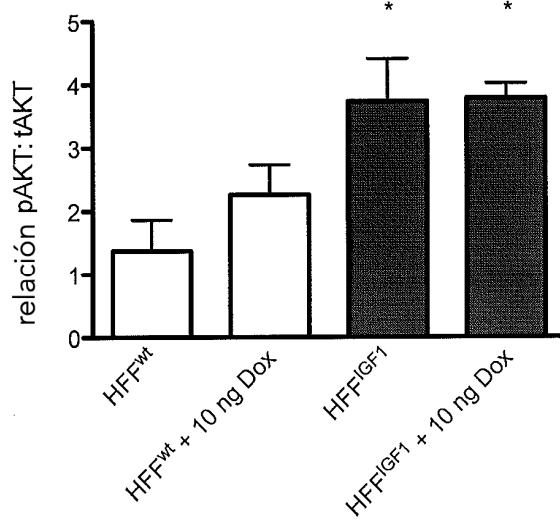


Figura 1

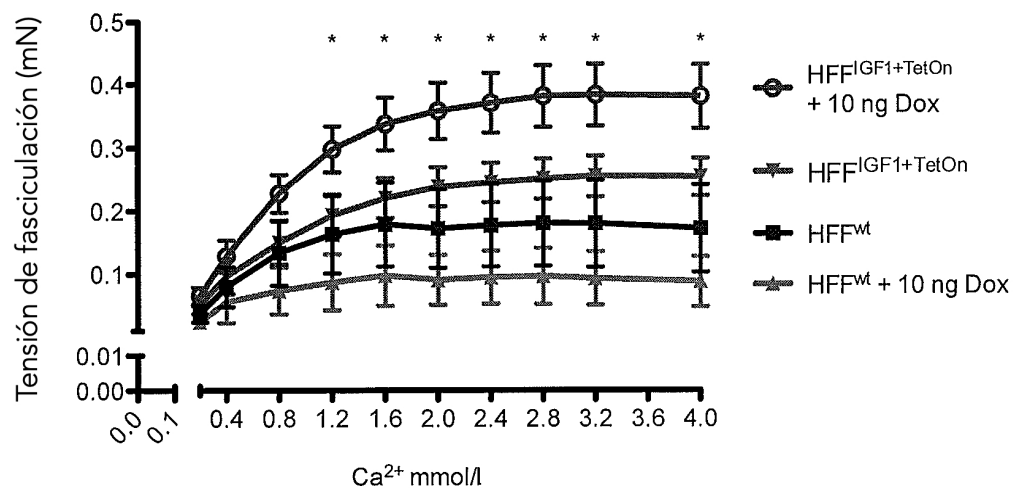


Figura 2

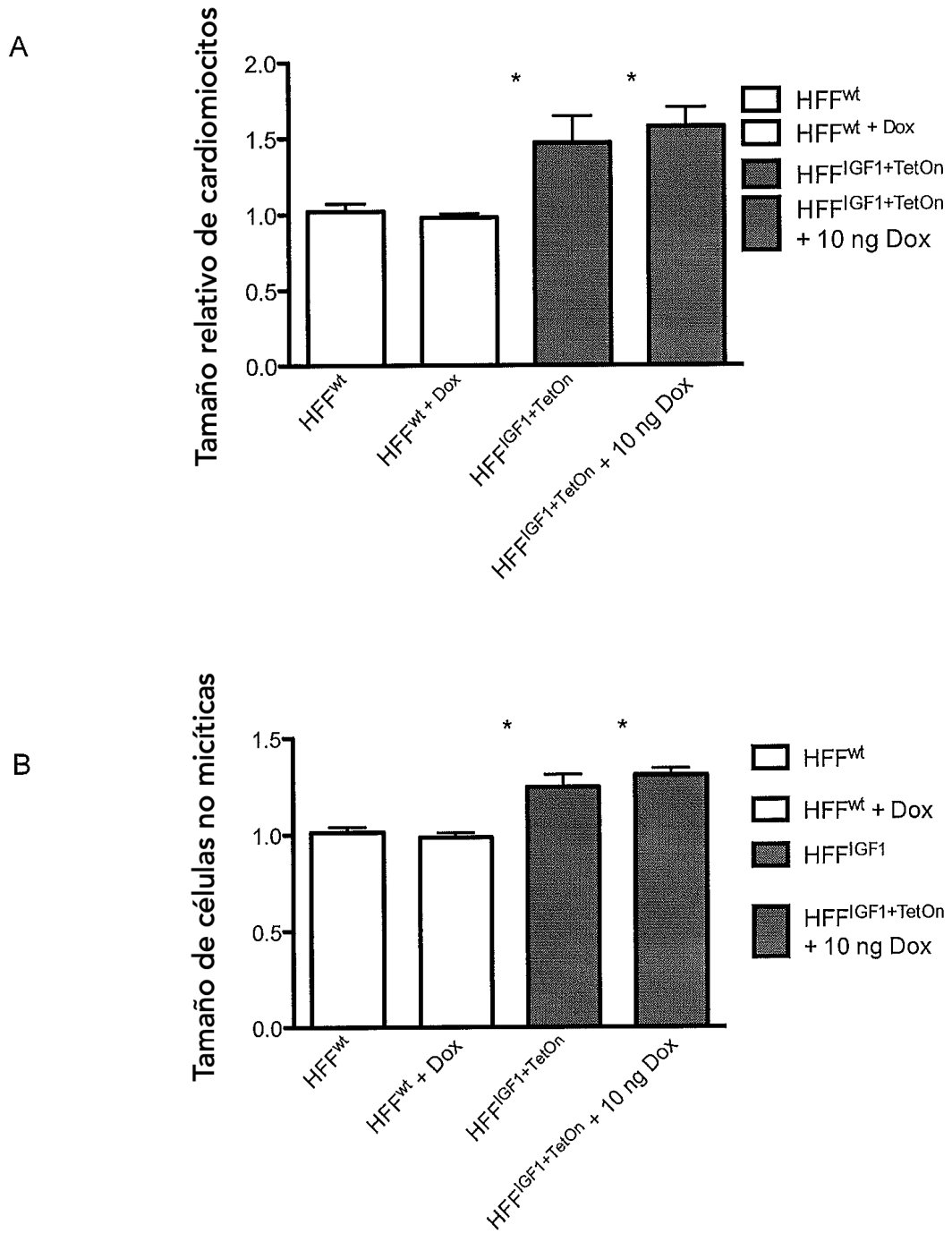


Figura 3.

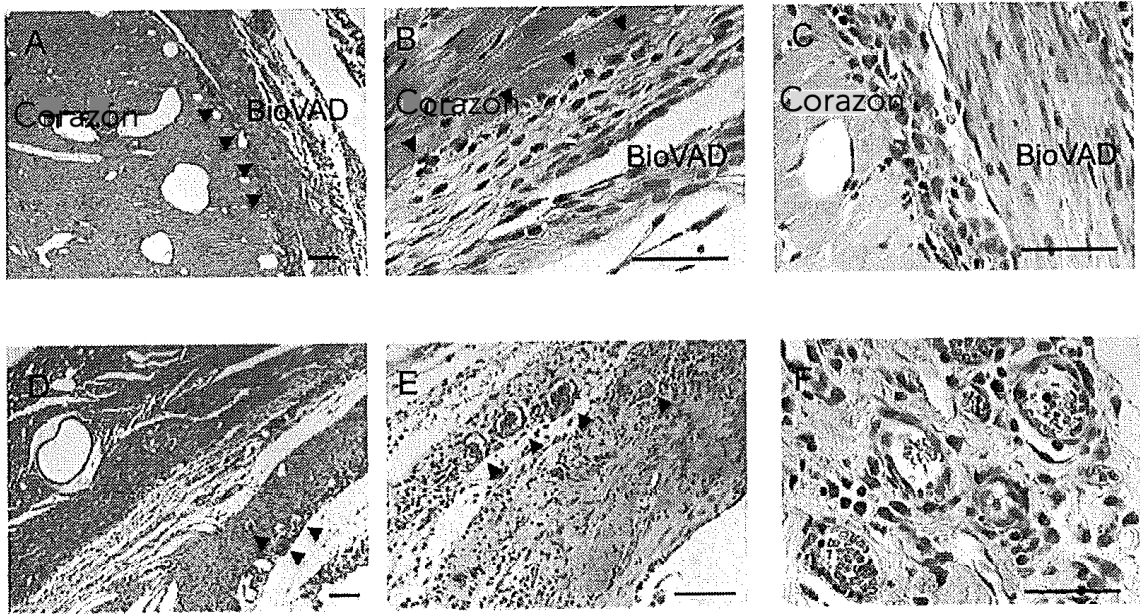


Figura 4.