

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 535**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2008 E 08706977 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2126052**

54 Título: **Provisión de nuevas células progenitoras de cardiomiocitos y cardiomiocitos derivados de éstas**

30 Prioridad:

09.01.2007 EP 07000374

07.01.2008 EP 08000174

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

17.03.2015

73 Titular/es:

LEAD PHARMA CEL MODELS IP B.V. (100.0%)
Transistorweg 5
6534 AT Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

GOUMANS, MARIE JOSÉ y
DOEVENDANS, PIETER

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 531 535 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

Provisión de nuevas células progenitoras de cardiomiocitos y cardiomiocitos derivados de estas

5 La presente invención se relaciona con las células progenitoras de cardiomiocitos (CMPCs), preferentemente las CMPCs humanas (hCMPCs). Se proporcionan además los métodos para el aislamiento de tales células. La presente invención se relaciona además con el uso de las CMPCs para la provisión de cardiomiocitos, por medio de la diferenciación de las CMPCs obtenidas con un agente de desmetilación. Se proporcionan además composiciones farmacéuticas que comprenden las CMPCs para uso en una terapia de reemplazo de cardiomiocitos y/o para el tratamiento del infarto de miocardio o para mejorar los efectos del infarto de miocardio. Estas composiciones se pueden usar en terapias de reemplazo de cardiomiocitos y/o para el tratamiento del infarto de miocardio o para mejorar los efectos del infarto de miocardio. En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el uso de las CMP obtenibles mediante los métodos de la invención en métodos de selección, por ejemplo, métodos de selección de fármacos.

15 Si no se define de cualquier otra forma, los términos usados en la presente descripción tienen el significado y el alcance que tienen generalmente en la técnica pertinente de la medicina o la bioquímica, particularmente en el campo de la cardiología, inmunología, biología celular, electrofisiología y biología molecular.

20 El infarto de miocardio es un trastorno cardiovascular grave común y la causa principal de la insuficiencia cardíaca y muerte cardíaca. La pobre perfusión tisular y la función defectuosa de los cardiomiocitos son mecanismos fundamentales para el desarrollo de la disfunción del miocardio, y la incapacidad de los cardiomiocitos remanentes para regenerar y compensar la pérdida de masa celular ventricular. Las células madre se han estudiado intensamente como fuente de nuevos cardiomiocitos para mejorar el miocardio lesionado y mejorar la función cardíaca¹⁻⁴. Se investigó el beneficio potencial terapéutico del trasplante de células madre en los modelos animales usando las células de la médula ósea⁵⁻⁷, las células madre cardíacas⁸, las células madre embrionarias (ES)^{9,10} y cardiomiocitos fetales^{11,12} inyectados en el sitio de la lesión cardíaca. Los resultados reportados en los estudios animales ha permitido ya la iniciación de varios ensayos clínicos aunque en la actualidad sólo se han evaluado en ensayos clínicos el uso de células derivadas de la médula ósea y mioblastos esqueléticos¹³⁻¹⁶. La plasticidad del desarrollo de las células de la médula ósea de diferenciarse en cardiomiocitos se ha cuestionado^{17,18} y el efecto predominante *in vivo* de las células de la médula ósea o progenitoras endoteliales puede ser neoangiogénesis pero no la regeneración muscular. El trasplante autólogo de mioblastos esqueléticos se confunde con la inducción de arritmias potencialmente mortales a pesar de la integración parcial, supervivencia y contribución a la contractilidad cardíaca. Otra fuente de cardiomiocitos trasplantables son los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas (hES). Aunque las células hES se pueden dirigir en el linaje de los cardiomiocitos, con un fenotipo fetal¹⁹, la diferenciación no es homogénea a pesar de las mejoras recientes en los protocolos^{20,21}. Además, los problemas inmunogénicos, arritmogénicos y éticos limitarán su uso clínico.

35 Por consiguiente, el problema técnico fundamental en la presente invención fue la provisión de medios y métodos para las terapias de reemplazo de cardiomiocitos.

40 Este problema técnico se resuelve mediante la provisión de las modalidades como caracterizadas en las reivindicaciones.

45 Recientemente, se identificaron en el corazón diferentes poblaciones de células madre cardíacas², es decir, células que expresan el receptor del factor de células madre (c-Kit⁸), antígeno-1 de células madre (Sca-1²²), o factor de transcripción homeodominio (islote-1²³) en su superficie celular, células de la población colateral (SP²⁴) y células capaces de crecer en las cardioesferas²⁵.

50 Aunque poblaciones de células cardíacas de roedores demostraron ser capaces de la diferenciación en cardiomiocitos, ya sea *in vitro* o *in vivo*, hasta la fecha no existe ninguna evidencia indiscutible, de que cualquiera de las poblaciones de células madre cardíacas humanas son capaces de diferenciarse en cardiomiocitos funcionales maduros. Hasta el momento las diferentes poblaciones de células madre cardíacas humanas aisladas, *in vitro* sólo se diferencian en cardiomiocitos cuando se co-cultivan con cardiomiocitos neonatales.

55 Se aislaron las células progenitoras de los cardiomiocitos humanos (hCMPCs) a partir del tejido de corazón humano usando un anticuerpo anti-Sca-1 (Goumans y otros, 2005. *Circulation* 112: U106), aunque se debatió de un determinante genuino de Sca-1 en las células humanas. Las células se seleccionaron usando un anticuerpo Sca-1, tanto de corazón humano fetal como adulto que resultaron susceptibles a la expansión en el cultivo. La población de células progenitoras aislada del corazón humano se definió como inmunofenotípicamente distinta de las células madre y progenitoras cardíacas descritas previamente (revisado en¹⁻³). Lo más destacado en nuestro estudio fue el aislamiento y cultivo de las hCMPCs a partir de biopsias del atrio de pacientes adultos sometidos a cirugía cardíaca, particularmente, injerto de derivación de arteria coronaria (CABG). La alta frecuencia inesperada con la que esto fue

posible abre perspectivas, por ejemplo, para el trasplante autólogo posterior a la fecha de la cirugía inicial si los cultivos se llevaron a cabo en condiciones clínicamente compatibles.

Varios grupos aislaron poblaciones de células del corazón de los roedores y ser humano^{8, 22-25} y todas estas poblaciones derivadas de células madre cardíacas son distintas de las CMPCs descritas en la presente, basado en su origen (es decir, la parte del corazón a partir de la que se aislaron), su perfil de expresión génica, su perfil de expresión de marcadores de superficie celular y sus características de crecimiento. Diferencias significativas se resumen parcialmente en la siguiente Tabla 2 y se explican además más abajo en la presente descripción.

Tabla 2

	CMPC de la invención	c-kit	Isl-1	Sca-1 (ratón)
Expresión del marcador	Sca-1 +/c-kit+/-/CD31 +	Sca-1 +/c-kit+/CD31-	Sca-1-/c-kit-/CD31-	Sca-1+/c-kit-/CD31-
	Nkx2.5+/Gata4+/Mef2c +/(antes de la diferenciación)	Nkx2.5+/Gata4+/Mef2c+ (sólo cuando de cultiva en medio dif.)	Nkx2.5+/Gata4+	Nkx2.5-
	Isl1+	Isl1-	Isl1+	
	CD34-/CD45-	CD34-/CD45-	ND	
Aislamiento	Expresión de Sca-1	Expresión de C-kit	co-cultivo con fibroblastos cardíacos resulta en la formación de Isl1+ agregados	Expresión de Sca-1
Crecimiento	células adherentes cuando se cultivan sobre placa recubierta con gelatina	fracción no-adherente recubierta	co-cultivo con fibroblastos cardíacos	
	Aurícula del corazón;			
Ubicación	Atrio en corazón adulto humano, atrio en corazón fetal, límite AV y dentro del ventrículo	Ventrículo humano	corazón humano post-natal, atrio ventrículo y OFT	Corazón de ratón

Una diferencia aparente que se puede observar entre las células descritas en la técnica y las células aisladas (CMPCs) subyacente en la presente invención es la expresión del epítipo Sca-1, (un término que se explicará más abajo en la presente descripción) y CD31 en la superficie celular.

La presente invención, generalmente se refiere así, a las células progenitoras de cardiomiocitos aislados (CMPCs) que se caracterizan por el epítipo Sca-1 y CD31 en su superficie celular. "Aislado" se refiere al material extraído de su medio ambiente original, y se altera así de su estado natural "por la mano del hombre".

Además, se proporciona la primera evidencia de la diferenciación funcional de las células progenitoras derivadas del miocardio humano en cardiomiocitos. Messina y otros²⁵ estimularon con cardiotropina los explantes cultivados a partir de biopsias cardíacas y generaron las cardioesferas. Mientras que las cardioesferas de ratón comenzaron a pulsar espontáneamente, con las células primitivas en el interior y miocitos pulsátiles en los bordes, las cardioesferas humanas sólo se diferenciaron cuando se co-cultivaron con los cardiomiocitos de rata. Células progenitoras de ratón Isl-1⁺, se diferenciaron en cardiomiocitos cuando se co-cultivaron con cardiomiocitos neonatales²³ como se mostró además para células cardíacas de ratón SP³².

Las células progenitoras de cardiomiocitos (CMPCs) que se describen en la presente, son capaces de diferenciarse en cardiomiocitos en la ausencia de cardiomiocitos neonatales co-cultivados, por ejemplo, en ausencia de los cardiomiocitos neonatales de rata.

El término "en ausencia de cardiomiocitos neonatales co-cultivados" significa que las células progenitoras de cardiomiocitos humanos aislados (hCMPCs) no tienen que cultivarse en presencia de cardiomiocitos añadidos exógenamente como se describe en la técnica, para diferenciarse en cardiomiocitos. La "ausencia", sin embargo no excluye que pequeñas porciones de cardiomiocitos endógenos están presentes todavía. En este sentido, pequeñas porciones incluye hasta aproximadamente 5, 4, 3, 2, 1 o 0,5% del total de la población de células que se aíslan por los métodos de la invención como se describe en la presente, consiste de cardiomiocitos endógenos, es decir, los que se aislaron junto con las CMPCs previstas. Estos cardiomiocitos endógenos co-aislados, sin embargo, están regularmente

ausentes después de aproximadamente 2 pases. Para excluir una contaminación de cardiomiocitos co-aislados, normalmente es suficiente usar un pase de CPMC > 8. Además, se prefiere que las CMPCs que se aislaron por ejemplo, por los métodos de la invención contengan normalmente < 5, 4, 3, 2, 1, o 0.5% de contaminación con otros tipos de células, por ejemplo con fibroblastos. Si se desea la calidad de las CMPCs se puede observar por los métodos de tinción estándar que excluyen la contaminación con, por ejemplo, fibroblastos.

Las CMPCs de origen humano.

"Células progenitoras de cardiomiocitos humanos (hCMPCs)" son las células que pueden caracterizarse de la siguiente manera:

(A) Morfológicamente, las hCMPCs presentan menos de (aproximadamente) 40 μm de diámetro y muestran una alta relación de núcleo-por-citoplasma. La "alta" relación núcleo por citoplasma significa en este sentido de que al menos aproximadamente 50, 60, 70 o 80% del volumen de la célula está llena por el núcleo. Las células tempranamente aisladas (es decir las células de los primeros pases, por ejemplo pase 5) son células redondeadas/cuboidal que se alargarán a una forma de fibroblasto pequeño.

(B) Características de crecimiento : Las hCMPCs se pueden expandir clonalmente y, después de una fase de latencia inicial de (aproximadamente) de 3-10 días, dividir (aproximadamente) una vez cada 18-26 horas. Cuando se cultivan en placas recubiertas de gelatina, las hCMPCs crecen como cultivos adherentes.

(C) Bioquímica: Inmunología:

(a) Carecen de CDH b₁, CD13, CD14, CD29, CD34, CD45, CD68, CD71, CD133, SSEA-3 y SSEA-4 cuando se determina en el análisis FACS; "carecer"

significa que en un FACS estándar no se detectan ninguno de los niveles significativos significa que en un análisis de FACS estándar no se detectan ninguno de los niveles significativos

(b) Expresan Sca-1, CD105, CD31, CD59 y bajos niveles de c-kit, cuando se determinan en análisis FACS;

(c) Expresan Islote-1 (Isl-1), Nkx2.5, Gata-4 y bajos niveles de MEF2C en RT-PCR (por ejemplo, cuando se usan los iniciadores como se muestra en la Tabla 1 en los ejemplos adjuntos y cuando se usa el protocolo de PCR ejemplificado en el Ejemplo 3)

(d) Carecen de la expresión de célula endotelial, de músculo liso, o genes específicos a cardiomiocitos (VE-cadherina, factor de Von Willebrand para las células endoteliales; desmina o cadena pesada de la célula de músculo liso miosina para células musculares lisas y actina cardiaca, MLC2v para cardiomiocitos). "Carecen de la expresión" significa en este sentido, que las células no expresan niveles significativos de los genes cuando se evalúan con técnicas de transferencia o de microarreglo.

(e) que expresan los rectificadores internos de potasio Kir2.1 y 2.2 como se determina por RT-PCR. Kir2.x modula la corriente I_{k1}, implicado en la repolarización tardía y de importancia para estabilizar el potencial de membrana en reposo de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos inmaduros frecuentemente carecen o tienen bajas corrientes I_{k1}, resultando en mayores potenciales de membrana en reposo, potenciales de acción más cortos, y aumento de la excitabilidad.

(f) expresan la proteína de unión TGF β latente 4 (ARNm por ejemplo, en RT-PCR y proteína por inmunoelectrotransferencia), receptor del factor de crecimiento de fibroblasto 4 (ARNm por ejemplo, en RT-PCR y proteína por inmunoelectrotransferencia), y receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2 (ARNm por ejemplo, en RT-PCR y proteína por FACS).

Los "Cardiomiocitos" son células que se caracterizan, entre otras, por la formación de estrías transversales, la expresión de proteínas sarcoméricas (α -actinina, troponina I, β -MHC, titina, desmina, MLC-2V), y el factor natriurético auricular (ANF). Los cardiomiocitos se caracterizan además por la expresión de conexinas en la membrana celular, mediante el acoplamiento excitación-contracción. Los cardiomiocitos normalmente tienen un diámetro de más de 120 μm .

Los cardiomiocitos descritos en la presente (es decir, los derivados de las CMPCs humanas y/o obtenibles por los métodos de la invención) se caracterizan además, por los siguientes aspectos técnicos que los hace únicos en comparación con los cardiomiocitos descritos en la técnica. Se describe que hasta ahora son más maduros que los cardiomiocitos derivados de la célula madre, basado en su bajo potencial de membrana máximo diastólico que es mucho menor que el de las células madre de embriones humanos o cardiomiocitos derivados de Isl-1 de ratón. El potencial de membrana máximo diastólico o de reposo se origina por la diferencia en la carga iónica a través de la membrana de la célula durante la fase 4 del potencial de acción. El potencial de membrana normal en reposo en el miocardio ventricular adulto es de aproximadamente -85 a -95 mV. Este potencial se determina por la permeabilidad selectiva de la membrana celular para varios iones. Hasta la fecha, el único potencial de membrana en reposo de los cardiomiocitos derivados de células madre humanas es aquel a partir de células madre embrionarias.

Los cardiomiocitos derivados de las células madre embrionarias tienen un potencial de membrana máxima diastólico de

aproximadamente -48 mV, mientras que los cardiomiocitos derivados CMPC tienen un potencial de membrana máximo en reposo de aproximadamente -67 mV o inferior.

5 La presente descripción se refiere además a los cardiomiocitos como se describe en la presente invención. Estos cardiomiocitos son obtenibles mediante la diferenciación de las

CMPC por vía de los métodos descritos en la presente. Estos cardiomiocitos pueden estar comprendidos en una composición farmacéutica y/o de diagnóstico que se ejemplificará con más detalle más abajo.

10 Para aislar las CMPCs de tejido cardíaco (adulto o fetal), biopsias del atrio, por ejemplo, derivadas de la aurícula del corazón se cortaron en pequeños pedazos que se incubaron a continuación en solución de colagenasa/proteasa en PBS con 0.5% de suero ya sea 2 horas a 37 grados centígrados o durante la noche a 4 grados centígrados. Esto se siguió por centrifugación diferencial (50 g durante 5 min) para separar los cardiomiocitos grandes de las pequeñas fracciones de no miocitos en las que las CMPCs son residentes. En este sentido la colagenasa que se puede usar es, por ejemplo de tipo I de Sigma (1 mg/ml) o Worthington tipo II (0.5 mg/ml). Este procedimiento resultó en un residente

15 En este sentido la colagenasa que se puede usar es, por ejemplo de tipo I de Sigma (1 mg/ml) o Worthington tipo II (0.5 mg/ml). Este procedimiento resultó en una suspensión de células nucleadas prácticamente agotada de cardiomiocitos. El uso de un anticuerpo anti Sca-1 acoplado a perlas magnéticas (obtenibles por ejemplo, de Miltenyi Biotec, Sunnyvale, California) se aisló una fracción de células con un diámetro de aproximadamente <50 µm y alto potencial de crecimiento mediante clasificación celular magnética (MACS, Miltenyi Biotec, Sunnyvale, California), siguiendo el protocolo de los fabricantes. (Fig. 1b). Células Sca-1 positivas se eluyeron de la columna lavando con PBS suplementado con 2% de suero fetal de ternero (FCS) y se cultivaron en placas recubiertas con 0.1% de gelatina en M199 (Gibco)/EGM (3: 1) suplementado con 10% de FCS (Gibco), 10 ng/factor de crecimiento de fibroblastos básico ml (bFGF), 5 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 5 ng/ml de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) y 5 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Después de una fase de latencia de 3 días, las células empezaron a proliferar y se formaron colonias a partir de pequeñas células en forma de husillo con una alta relación núcleo-por-citoplasma (Fig. 1a). hCMPCs se pueden expandir clonalmente. Después de la dilución limitada, las células individuales cultivadas en una placa de 96 pocillos generaron colonias con una eficiencia de 5-25%.

30 Se usan además los siguientes métodos para aislar CMPCs:

- (a) la suspensión de células nucleadas prácticamente agotadas de cardiomiocitos se incubó con anticuerpo Sca-1 a partir de R & D (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y se volvieron a aislar células positivas a Sca-1 con el anticuerpo secundario de rata acoplado a perlas magnéticas; o
- 35 (b) se usa además un anticuerpo Sca-1 marcado con FITC y las células ya sean clasificadas por FACS, o usando un anticuerpo anti-FITC acoplado a perlas magnéticas para aislar células Sca-1 positivas.

A continuación se ejemplifican los "anticuerpos Sca-1" que se pueden usar de acuerdo con la presente invención pero debe entenderse que los métodos de la invención no se limitan a estos anticuerpos específicos:

40 Anticuerpo monoclonal Sca1 de rata clon D7(Abcam), anti Ly6a/e de ratón en rata clon D7 (cederlane, eBioscience), monoclonal de Sca1 de rata clon 177228 (R&D system), anticuerpo monoclonal anti-(Ly-6A / E) Sca-1 de ratón, clon 38/42 Leinco Technologies (anticuerpo monoclonal anti-Ly-6A / E de rata, clon E13-161.7 (Pharmingen, Stemcell technologies). Estos anticuerpos pueden estar ya sea conjugados, o no conjugados con biotina, FITC, TRITC u otras etiquetas notorias conocidas en este campo (Inmunología) y etiquetas para que se pueda realizar una etapa de aislamiento secundario. Tales etiquetas y etapas de aislamiento secundario se mencionan en la presente descripción y son bien conocidas además para el experto. Por ejemplo, es posible usar un anticuerpo Sca-1 marcado con FITC. Las células Sca-1 positivas por lo tanto se clasifican por ejemplo, mediante FACS. Las explicaciones dadas en la presente descripción se aplican igualmente a otros anticuerpos que se pueden usar alternativamente o en combinación con Sca-1, por ejemplo, anticuerpos CD31 o fragmentos funcionales de estos. Así, es posible además clasificar las CMPCs con anticuerpos CD31 o una combinación de CD31 y anticuerpos Sca-1.

55 En un aspecto adicional la presente invención se refiere a un método para el enriquecimiento de las células progenitoras de cardiomiocitos (por ejemplo CMPCs humanas), dicho método que esencialmente comprende o consistente de las etapas de:

- (a) disociación del tejido cardíaco por ejemplo derivado del atrio; y
- 60 (b) enriquecimiento de las CMPCs con un agente de unión de Sca-1 y un agente de unión de CD31.

"Tejido cardíaco" incluye todas las partes del corazón que comprenden las CMPCs. Dicho tejido cardíaco preferentemente se deriva del atrio o partes del atrio del corazón, por ejemplo la aurícula. El término "aurícula" se relaciona con una pequeña bolsa cónica que se proyecta desde cada atrio del corazón.

La etapa de disociación del tejido cardíaco como se describe en cualquier parte de la presente, que es preferentemente enzimática pero puede ser mecánica, opcionalmente está seguida de una etapa de centrifugación diferencial o métodos comparables, como por ejemplo, una centrifugación en un gradiente de Percoll. Tales métodos son bien conocidos para el experto y se explican en detalle en los manuales de laboratorio estándar como Sambrook y otros. Una centrifugación diferencial o un método comparable provoca la separación de mezclas tales como partículas celulares en un medio a varias fuerzas centrípetas para separar las partículas entre sí de diferente densidad, tamaño y forma. Tal etapa resultará en una suspensión de células nucleadas prácticamente agotadas de cardiomiocitos. La centrifugación diferencial que se puede usar en los métodos de la invención se puede realizar a modo de ejemplo con una fuerza de aproximadamente 50 g durante aproximadamente 5 min. "Prácticamente agotada" significa en este sentido que pequeñas porciones de otras células, tipo cardiomiocitos, pueden estar presentes en la fracción de no miocitos, donde las CMPCs también están presentes. En este sentido, porciones pequeñas incluyen hasta aproximadamente < 5, 4, 3, 2, 1, o 0.5% de la población total de células que se aísla por los métodos de la invención que consiste en otras células, es decir, no las CMPCs previstas. Después de la separación, las CMPCs se clasificarán a partir de la fracción de no-miocito. Como se mencionó anteriormente, se prefiere que las CMPCs que se aislaron por ejemplo, por los métodos de la invención contengan normalmente < 5, 4, 3, 2, 1, o 0.5% de contaminación con otros tipos de células, por ejemplo con fibroblastos. Si se desea, la calidad de las CMPCs se puede observar por los métodos de tinción estándar que excluyen la contaminación con, por ejemplo, fibroblastos.

Métodos para disociar el tejido cardíaco, por ejemplo la aurícula del corazón, ya sea enzimáticamente o mecánicamente, son bien conocidos para el lector experto y para el más ilustrativo de los ejemplos anexos.

En métodos preferidos, se usa la disociación enzimática, y la enzima es preferentemente una colagenasa aunque otras proteasas pueden emplearse también. El tejido, por ejemplo, puede disociarse además con una combinación de colagenasa (Worthington) y pancreatina (Alkemi A0585,0100 Applichem). El epítipo Sca-1 es, sin embargo, sensible a la tripsina y por lo tanto se debe evitar la tripsina si se pretende aislar las células con agentes de unión anti-Sca-1 como se describe en cualquier parte de la presente invención. Se entenderá, sin embargo, que se conocen también otros métodos de disociación enzimática que se pueden usar alternativamente, por ejemplo, basado en las instrucciones del fabricante y/o basado en los manuales de laboratorio estándar. Protocolos para disociaciones de tejido se conocen en la técnica y publican frecuentemente por ejemplo en los manuales de laboratorio. Estos métodos de disociación se incluyen además siempre y cuando los métodos resultan en suspensiones de células disociadas, que comprenden las células progenitoras de cardiomiocitos (CMPCs).

"Sca-1" es un antígeno de ratón, particularmente una proteína de 18 kDa anclada a fosfatidilinositol que es un miembro de la familia Ly-6 de proteínas de superficie unidas a GPI. La familia Ly-6 está implicada en la regulación y función de la activación de células T. Sca-1 es un importante marcador fenotípico de célula madre/progenitor hematopoyético de ratón (HSC) y se ha usado como un marcador de HSC en ratones de ambos haplotipos Ly-6A/E. La contraparte "humana" correspondiente de Sca-1 aún no está identificada. Un "epítipo de tipo Sca-1" se relaciona por lo tanto con ortólogos o análogos de Sca-1 de ratón. Los "ortólogos" evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especificación y así se relacionan con la "misma" proteína de una especie diferente, mientras que "análogos" se refiere a dos proteínas que tienen la misma función o similar, pero que evolucionaron por separado. Normalmente, ortólogos o análogos de Sca-1 de ratón son polipéptidos que tienen las mismas funciones o similares, pero difieren de Sca-1 de ratón por ejemplo, por modificaciones post-traduccionales, por diferencias en la secuencia de aminoácidos, o por ambas. Así, las células progenitoras de cardiomiocitos (hCMPCs) que tienen un epítipo, es decir, un "epítipo de tipo Sca-1" en su superficie que se caracteriza por su capacidad para reaccionar específicamente con anticuerpos Sca-1, preferentemente los ejemplificados anteriormente, de tal manera que al menos es posible clasificar estas células "Sca-1" positivas por los métodos de clasificación de rutina también descritos en la presente invención (por ejemplo MACS). Se entiende que "Sca-1" en las células, (además de las células de ratón), se usa indistintamente en la presente con "epítipo Sca-1" en estas células (además de las células de ratón que expresan el epítipo Sca-1).

Un "agente de unión de Sca-1" es preferentemente un anticuerpo o un fragmento funcional de este, que es capaz de unirse al epítipo Sca-1 descrito en la presente invención. La "unión" en este sentido significa que las células Sca-1 positivas se unen por el agente de unión de tal manera que las células pueden ser posteriormente clasificadas por medios y métodos bien conocidos en la técnica y descritos también en la presente invención. El requisito mínimo de un "agente de unión", como se usa en la presente invención es, por lo tanto, que sea capaz de unirse específicamente a células Sca-1 positivas y/o células que expresan un epítipo de tipo Sca-1 y permitir la clasificación o separación de estas células. El término "unión específica" en conjunción con el agente de unión usado de acuerdo con la presente invención significa que el agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo etc. no lo hace o esencialmente no reacciona de manera cruzada con otros polipéptidos. Los anticuerpos que se unen al epítipo Sca-1 pero que no lo hacen o no se unen esencialmente a otros polipéptidos en la superficie celular se consideran específicos y son, por lo tanto, preferentemente seleccionados para los métodos de la invención.

Dichas CMPCs se enriquecen preferentemente con un agente de unión de Sca-1 En una realización particularmente

preferida del método de la invención, dicho agente de unión es un Sca-1 anticuerpo anti o un fragmento funcional de la misma

El término "enriquecido" significa que el número relativo de las células Sca-1 positivas se incrementa en la suspensión de células después de la clasificación de células en comparación con las otras células (por ejemplo, cardiomiocitos), que se incluyen también en la suspensión celular inicial. Preferentemente, las CMPCs se enriquecen, es decir su número relativo de células se aumenta al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95% o incluso más. Protocolos para un "enriquecimiento" de este tipo se ejemplifican en la presente descripción, por ejemplo, los métodos para aislar CMPCs como se describe en la presente invención.

Como se describió anteriormente en la presente invención, las células progenitoras de cardiomiocitos (CMPCs) se caracterizan por el epítipo Sca-1 y CD31 en su superficie celular. Así, se prevé además que las CMPCs se enriquecen con un agente de unión a CD31, por ejemplo, un anticuerpo CD31 específico o fragmentos funcionales de este. Las explicaciones dadas en la sección anterior, por ejemplo, las relacionadas con el alcance y significado de "agente de unión" y "fragmentos funcionales de los anticuerpos" y "unión específica" se aplican igualmente al marcador CD31 que es detectable también en las CMPCs. Además, cada marcador que está presente en la superficie de las CMPCs (por ejemplo CD105) puede usarse alternativamente o en combinación a los antes mencionados (CD31 y Sca-1) para enriquecer CMPCs, proporcionando que este enriquecimiento resulte en una fracción de células en donde el número relativo de células de las CMPCs como se describe en la presente invención aumenta en al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95% o incluso más.

En una modalidad adicional, se prevé además enriquecer las células con un agente de unión Sca-1 y CD31, por ejemplo, anticuerpos dirigidos a estos epítipos. Los medios y métodos para detectar tales anticuerpos o sus fragmentos unidos se conocen bien y describen además en la presente invención.

Anticuerpos anti-Sca-1 son bien conocidos en la técnica y también se ejemplificaron anteriormente. La lista de los anticuerpos Sca-1 específicos es sin embargo a modo de ejemplo y de ninguna manera limita el grupo de anticuerpos Sca-1 que pueden emplearse cuando se llevan cabo los métodos de la invención.

Anticuerpos CD31 también son bien conocidos y se ejemplifican con el anticuerpo monoclonal α -CD31 de ratón clon WM59 (BD Biosciences), α -CD31 humano clon 1 F11 (Beckman Coulter), α -CD31 de ratón clon 158-2B3 (Cell signaling), α -CD31 clon HC1/6 (Chemicon), α -CD31 humano en ratón clon 9G11 (R&D systems).

Anticuerpos CD105 son bien conocidos también y se ejemplifican con α -CD105 de ratón clon 35 o clon 266 (Biosciences BD), anticuerpo policlonal α -CD105 humano en carnero (R&D systems), α -CD105 humano de ratón clon 166707 o clon 166713 (R&D systems), α -CD105 clon 8E11 o clon P3D1 (Chemicon).

Otros anticuerpos que son específicos para el epítipo Sca-1 o tipo Sca-1 o CD31 o CD105 u otros epítipos útiles en los métodos descritos pueden producirse fácilmente por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, es posible usar líneas de células que secretan anticuerpos para cualquier sustancia esencialmente deseada que produce una respuesta inmune. ARN que codifica las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina puede obtenerse después a partir del citoplasma del hibridoma. La porción del extremo 5' del ARNm se puede usar para preparar el ADNc que se inserta en un vector de expresión. El ADN que codifica el anticuerpo o sus cadenas de inmunoglobulina posteriormente se puede expresar en células, preferentemente células de mamífero. Dependiendo de la célula huésped, las técnicas de renaturalización pueden ser requeridas para alcanzar conformación apropiada del anticuerpo. Si es necesario, las sustituciones puntuales que buscan optimizar la unión o estabilidad del anticuerpo se pueden hacer en el ADN usando mutagénesis por inserción de un cassette convencional u otra metodología de ingeniería de proteínas tal como se describe en la presente descripción. Además, los anticuerpos o fragmentos de estos de los epítipos anteriormente mencionados (Sca-1) pueden obtenerse usando los métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Otros anticuerpos adecuados, así como los métodos para probar la eficacia de tales anticuerpos se detallan en WO02071061.

Para la producción de anticuerpos en animales experimentales, varios huéspedes incluyendo carneros, conejos, ratas, ratones, y otros, se pueden inmunizar por inyección con polipéptidos o cualquier fragmento u oligopéptido o derivado de este que tiene propiedades inmunogénicas. Las técnicas para producir y procesar anticuerpos policlonales se conocen en la técnica y se describen en, entre otros, Mayer y Walker, eds., "Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology", Academic Press, Londres (1987). Los anticuerpos policlonales se pueden obtener también de un animal, preferentemente un mamífero. Los métodos para purificar anticuerpos se conocen en la técnica y comprenden, por ejemplo, la cromatografía de inmutafinidad. Dependiendo de la especie huésped, varios adyuvantes o vehículos inmunológicos se pueden usar para aumentar las respuestas inmunológicas. Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen mediante la técnica de presentación de fagos, resonancia de plasmón superficial como se emplea en el sistema BIAcore puede usarse para aumentar la eficacia de anticuerpos de fago que se unen a un epítipo del péptido o polipéptido (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183

(1995), 7-13). En muchos casos, los fenómenos de unión de anticuerpos a antígenos es equivalente a otra unión ligando/anti-ligando.

5 La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en WO89/09622. Una fuente de anticuerpos adicional que se utiliza de acuerdo con los métodos de la presente invención se denominan anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe en, por ejemplo, WO 91/10741 , WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. La producción de anticuerpos recombinantes se describe, por ejemplo, en R. Kontermann, S. Dübel: Antibody Engineering, Springer Lab Manual 2001. El anticuerpo que se usa de acuerdo con los usos o métodos de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal (ver Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, USA, 1988) o un derivado de dicho anticuerpo que conserva o esencialmente conserva su especificidad de unión. Derivados preferidos de tales anticuerpos son los anticuerpos quiméricos que comprenden, por ejemplo, una región variable de ratón o rata y una región constante humana.

15 El término "fragmento funcional" como se usa en la presente descripción se refiere a fragmentos de los anticuerpos como se especifica en la presente descripción que conservan o esencialmente conservan la especificidad de unión de los anticuerpos como, cadenas ligeras y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. El término "anticuerpo" comprende además anticuerpos bifuncionales y construcciones de anticuerpos, como los Fv de cadena única (scFv) o proteínas de fusión-anticuerpo. El término "fragmento scFv" (fragmento Fv de cadena única) se entiende bien en la técnica y se prefiere debido a su pequeño tamaño y la posibilidad de producir vía recombinante tales fragmentos.

20 El agente de unión o anticuerpo etc. se puede fijar a un soporte, por ejemplo a perlas magnéticas, material en columna o vehículos sólidos como placas de poliestireno o similares, lo que hace posible separar las células que se unen específicamente a los agentes de unión fijados. Los medios y métodos en este sentido son bien conocidos para el experto y, además, se explican en los ejemplos adjuntos.

Las CMPCs se enriquecen preferentemente por MACS.

30 "MACS" significa clasificación de células activadas por magnetismo es un método bien conocido y fiable para la separación de las células de acuerdo con los marcadores específicos de la superficie celular. Las células teñidas secuencialmente por ejemplo con anticuerpos biotinilados, avidina conjugada con fluorocromo, y micropartículas superparamagnéticas biotiniladas (aproximadamente 100 nm de diámetro) se separan en columnas de alto gradiente magnético (HGM). Las células no marcadas pasan a través de la columna, mientras se retienen las células marcadas. Las células retenidas pueden ser fácilmente eluidas. Por ejemplo el Kit microperla de anti-Sca-1 proporcionado por Miltenyi Biotec incluye todos los reactivos para etiquetado fluorescente y magnético indirecto de células Sca-1 + , usando anti-Sca-1-FITC y microperlas anti-FITC. Este kit se usó en los ejemplos adjuntos, pero se entenderá que otros sistemas-MACS también están a la mano, y que se pueden usar también.

40 Como alternativa, las CMPCs se enriquecen por FACS. "FACS" se refiere a la clasificación de células activadas por fluorescencia que es un método bien conocido. Como las células o partículas pasan a través del instrumento-FACS pueden ser selectivamente cargadas, basado en los parámetros definidos por el usuario, y se pueden desviar en trayectorias separadas con flujo dirigido a diferentes tubos de recolección. Por lo tanto, es posible separar poblaciones de células definidas a partir de una mezcla original con un alto grado de precisión y velocidad por medio del etiquetado con anticuerpo de la suspensión celular.

45 Se entenderá que los otros métodos de enriquecimiento se contemplan también, por ejemplo, técnicas de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) o columnas con anticuerpos fijados a ella, etc.

50 En una modalidad adicional, la presente invención se refiere a una fracción de células que comprende al menos 90% de CMPCs humanas como se define en la presente descripción, que son obtenibles o se obtienen por el(os) método(s) como se describe en la presente descripción.

55 Para caracterizar fenotípicamente las CMPCs aisladas que se enriquecieron por los métodos descritos en la presente, se examinaron las células recién aisladas para la expresión en la superficie celular de marcadores hematopoyéticos (CD45 y CD34), marcador de células madre (c-Kit), CD105 y CD31 (Pecam-1) por análisis FACS. Para este fin se usaron varios anticuerpos que se detallan en los ejemplos de la presente descripción. Tales anticuerpos se conocen bien por el lector experto (ver, por ejemplo, los catálogos y páginas web de los fabricantes respectivos de tales anticuerpos por ejemplo Beckmann Coulter) pero se pueden sustituir por otros anticuerpos que son capaces de detectar también los epítomos mencionados. las CMPCs aisladas fueron negativos para CD34, CD45, pero mostraron expresión de CD31, CD105 y niveles moderados de c-kit (Fig. 1 c) cuando se probaron bajo las condiciones experimentales ejemplificadas en los ejemplos adjuntos. El análisis RT-PCR de las células reveló que no expresan Oct4, un marcador de células ES pluripotentes. Estos resultados indicaron que las células progenitoras derivadas cardíacas descritas en la

presente no pertenecen a la célula madre hematopoyética o población de células madre cardíacas previamente descrita .

5 Para caracterizar adicionalmente las CMPCs, se examinó por RT-PCR la expresión de genes específicos para el desarrollo cardíaco temprano usando las células cultivadas que se habían pasado 8-10 veces (Fig. 1d) y usando los iniciadores que se enumeran en la Tabla 1. Como se puede observar en la figura 1d, las hCMPCs cultivadas expresan c-Kit y Islet-1, así como GATA-4, Nkx2.5 y Mef2C, lo que sugiere que están más restringidas al linaje cardíaco. Además del ARNm, las CMPCs expresaron también proteína GATA-4, Nkx2.5 y Islet-1 (Fig. 1e), aunque no expresaron genes cardíacos, como bMHC, α -actinina, ANF, MLC2A o MLC2V (Fig. 1d). Curiosamente, las hCMPCs subclonadas mostraron las mismas características que las CMPCs que no se derivan del clon.

15 También las hCMPCs adultas se aislaron a partir de biopsias auriculares enzimáticamente disociadas, usando un anticuerpo anti-Sca-1 y los métodos descritos anteriormente. Sembrar estas células en las placas recubiertas con gelatina en el medio de cultivo resultaron en el crecimiento de colonias progenitoras en 24 de 33 casos. Las hCMPCs adultas tuvieron la misma morfología de las células madre con un núcleo grande y poco citoplasma; ninguna pérdida de potencial de proliferación se observó después de 23 pases. De tres a 6 semanas después de aislamiento se obtuvieron números adecuados de células para su posterior análisis. El análisis por FACS reveló que las hCMPCs adultas cultivadas fueron CD34 negativo/CD45 negativo y 5% de la células expresaron c-kit. El perfil de expresión génica se analizó por RT-PCR y reveló que las hCMPCs adultas tuvieron el mismo perfil de expresión que las hCMPCs derivadas fetales (Fig. 1). La tinción de inmunofluorescencia reveló que casi todas las células adultas fueron Islet-1 \ aunque predominantemente citoplasmática.

25 Se establece también la diferenciación de las CMPCs en estructuras vasculares tubulares (angiogénesis) en Matrigel, dichas "estructuras vasculares tubulares", que a veces se denominan en la presente también como "estructuras tubulares", que contienen las células endoteliales alineadas rodeadas por las células musculares lisas. La formación de estos tubos capilares recién formados (es decir, las "estructuras tubulares" que contienen células endoteliales alineadas rodeadas por las células de músculo liso) se puede inducir mediante la adición de VEGF (ver Ejemplo 8). La formación de los tubos capilares recién formados puede visualizarse por ejemplo mediante la tinción de α -SMA (α -actina de músculo liso) en las células de músculo liso y/o PECAM-1 (molécula de adhesión celular endotelial de plaquetas-1, CD31) en las células endoteliales (ver también adjunto del Ejemplo 8). Los anticuerpos que se puede usar en este sentido se ejemplifican en lo siguiente: anticuerpo SMA: AB5694 de abcam, clon 1A4, Sigma, cat. Número: A2547, o Dako, cat. Número M08510. Células endoteliales: PECAM-1 clon 9G11 o CD34 clon Qbend/10 de Biogenex o CD31 de Sigma y ve-cadherina de Santa Cruz.

35 La angiogénesis es la generación y la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares, un proceso fundamental para los procesos como la cicatrización de heridas y reproducción. Se implica además en los procesos patológicos (artritis reumatoide, crecimiento tumoral y metástasis).

40 "Matrigel" es el nombre comercial para una mezcla de proteína gelatinosa secretada por las células tumorales de ratón y comercializada por BD Biosciences. Esta mezcla asemeja el ambiente extracelular complejo que se encuentra en muchos tejidos y se usa como un sustrato para el cultivo celular.

La descripción se refiere además a un método in vitro para la diferenciación de las CMPCs en estructuras tubulares o brotes vasculares que comprenden las etapas de:

- 45
- (a) proporcionar las CMPCs, preferentemente en Matrigel y/o cualquier otra mezcla de proteína gelatinosa que asemeja el ambiente extracelular complejo; y
 - (b) tratar opcionalmente dichas CMPCs con un agente biológicamente activo que tiene las habilidades de inducir la angiogénesis o germinación de la angiogénesis (como por ejemplo VEGF).
- 50

De acuerdo con la descripción, se prefiere que las CMPCs que se diferencian con el método in vitro anterior para la diferenciación de las CMPCs en estructuras tubulares o brotes vasculares se siembren en Matrigel y/o cualquier otra mezcla de proteína gelatinosa que asemeja el ambiente extracelular complejo.

55 La presente descripción se refiere a las "estructuras tubulares" o brotes vasculares como se describe en la presente invención. Las "estructuras tubulares" o "brotes vasculares" se pueden obtener mediante la diferenciación de las CMPCs por medio de los métodos descritos anteriormente. Estas "estructuras tubulares" o "brotes vasculares" pueden estar comprendidos en composiciones farmacéuticas y/o de diagnóstico de la presente descripción y se pueden usar además en los ensayos/métodos de selección de la presente descripción.

60 En un aspecto adicional, se describe el uso de las CMPCs definidas en la presente descripción para la provisión de cardiomiocitos y/o estructuras tubulares y/o brotes vasculares.

Como se describió, las CMPCs se propagan/expanden in vitro (ejemplificado en el Ejemplo 1 /condiciones de cultivo de las células Sca-1 aisladas) para expandir aún más su número de células, antes de que las CMPCs se diferencien propiamente en los cardiomiocitos o en estructuras tubulares o brotes vasculares que se mencionaron antes.

Se establece además la diferenciación de las CMPCs en adipocitos. Para este fin, las CMPCs se siembran y cultivan hasta que alcanzan una confluencia del 90 - 100% en SP++ (SP++: EBM-2 + EGM-2 gotas individuales Cat. núm. CC-4176 + 2% FBS). Posteriormente, el medio se sustituye por DMEM 4.5g/l glucosa + piruvato de Na que contiene 10% FBS, 1 uM dexametasona, 0.5mM 3- isobutil-1-metilxantina (IBMX), 10 ug/ml insulina, 0.2 mM indometacina y Pen/strep. Después de algunos días, las gotas de grasa se depositan alrededor del núcleo. Cada 3 días, el medio se recambia.

La presente descripción se refiere en un aspecto adicional a un método in vitro para la diferenciación de las CMPCs en adipocitos que comprenden las etapas de:

- (a) proporcionar las CMPCs, y
- (b) tratar dichas CMPCs con IBMX, indometacina e insulina.

Un tipo de célula que sea adecuada para las terapias de reemplazo de cardiomiocitos, no sólo debe ser capaz de proliferar sino también diferenciarse eficientemente en cardiomiocitos. Para estudiar la capacidad de las hCMPCs de diferenciarse en cardiomiocitos, las células se sembraron a 10^5 por cm^2 en medio de diferenciación que contiene ácido ascórbico y trataron con 5-azacitidina (que es un agente de desmetilación). Tres semanas después del tratamiento, las hCMPCs formaron agregados alargados y espontáneamente se observaron áreas pulsátiles. Por lo tanto se demuestra que las hCMPCs son capaces de diferenciarse in vitro en cardiomiocitos maduros después del tratamiento con 5-azacitidina en presencia de un antioxidante a saber, ácido ascórbico, aun después de pases prolongados.

La presente invención se relaciona así con un método in vitro para la diferenciación de las CMPCs en cardiomiocitos, que comprenden las etapas de:

- (a) proporcionar una fracción de células que comprenden las CMPCs de acuerdo con la reivindicación 1; y
- (b) tratar dichas CMPCs con un agente de desmetilación
- (c) permitir que las CMPCs así tratadas diferenciarse en cardiomiocitos.

Como se mencionó antes, las CMPCs son sorprendentemente capaces de diferenciarse en cardiomiocitos aun en la ausencia de cardiomiocitos neonatales co-cultivados. Se prefiere así que los métodos de diferenciación de la invención se lleven a cabo en ausencia de cardiomiocitos neonatales co-cultivados. Se prevé también que todos los métodos de diferenciación descritos en la presente (cardiomiocitos y/o estructuras tubulares) se puede llevar a cabo en ausencia de cardiomiocitos neonatales co-cultivados.

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que juega un papel crucial en la diferenciación celular y el desarrollo de tejidos en la embriogénesis. Un "agente de desmetilación" como se usa en la presente descripción es un agente que es capaz de desmetilar el ADN, por ejemplo por medio de la inhibición de la(s) ADN metiltransferasa(s) intracelular(es). Tales agentes se conocen bien para la persona experta e incluyen, por ejemplo 5-aza-citidina o 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza), que se prefiere, pero los métodos de la invención no se limita a ellos.

En una modalidad preferida, dichas hCMPCs se tratan con el agente de desmetilación mencionado anteriormente, en presencia de un agente antioxidante, preferentemente el ácido ascórbico. Un "agente antioxidante" en este sentido se refiere a un producto químico orgánico o inorgánico que reduce la velocidad de las reacciones de oxidación. Ejemplos adicionales de antioxidantes que pueden usarse en el contexto de la presente invención son 2-mercaptoetanol, tocoferol o BHA pero se entenderá que los agentes antioxidantes adicionales se pueden usar siempre que ejerzan el efecto deseado de la diferenciación celular descrito en la presente.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere por lo tanto a una fracción de células que comprende al menos 90% de las CMPCs definidas anteriormente, dichas células que son capaces de la diferenciación in vitro en cardiomiocitos después del tratamiento con 5-aza-citidina o 5-aza-2'-desoxicitidina en presencia de ácido ascórbico.

Aparte de los agentes antioxidantes como el ácido ascórbico²⁷, miembros de la familia de TGF β , incluyendo TGF β y BMP, se encontraron también que promueven la diferenciación cardiomiogénica en células ES, y son críticos para la expresión de marcadores específicos cardíacos.^{9,10,26,28} Además, TGF β estimuló la diferenciación miogénica de células madre de la médula ósea c-kit⁺²⁹. Por lo tanto, exploramos la capacidad de TGF β para mejorar la diferenciación cardiomiogénica de las hCMPCs.

Para determinar si las CMPCs fueron capaces de responder al ligando TGF β se examinó su capacidad para fosforilar proteínas smad. TGF β ejerce su efecto mediante la unión a un complejo del receptor tipo I y tipo II y la fosforilación de

Smads³⁰. TGFβ fosforila Smad2 mientras BMP fosforila Smad1. Como se muestra en la figura 3a las CMPCs muestran claramente que BMP indujo la fosforilación de Smad1 así como TGFβ indujo la fosforilación de Smad2 indicando que expresan las combinaciones de receptores apropiados TGFβ y BMP para responder a la estimulación del ligando. Para examinar el efecto de TGFβ en la diferenciación de los cardiomiocitos, las hCMPCs se sembraron a 2 x10⁴ células por cm² en medio de diferenciación, tratadas con 5-aza durante 24 horas y se cultivaron hasta 3 semanas en medio de diferenciación suplementado con TGFβ (1 ng/ml). El análisis RT-PCR mostró que la expresión de varios genes cardíacos como Troponina-I, ANP, actina cardíaca y desmina ya se observó 7 días después de la iniciación de la diferenciación en presencia de TGFβ, pero en su ausencia estos genes no fueron detectables (Fig. 3B). MLC2v se detectó normalmente en cultivos sin TGFβ sólo después de 3 semanas, pero en su presencia ya se presentó después de dos semanas. El análisis de inmunoelectrotransferencia mostró que la expresión de Nkx2.5 y α-actinina en las CMPCs aumentó drásticamente después de 7 días de cultivo en presencia de TGFβ (Fig. 3c). La tinción de inmunofluorescencia demostró que el porcentaje de células α-actinina positivas aumentó a aproximadamente 100% (Fig. 3d). La adición de un inhibidor de la quinasa ALK5 a los cultivos celulares conocido para bloquear la señalización de TGFβ³¹, inhibe la diferenciación de las hCMPCs en cardiomiocitos (datos no mostrados). Estos resultados indican que la estimulación con TGFβ aumenta la diferenciación de las hCMPCs en cardiomiocitos a aproximadamente 100%.

Como consecuencia, se prefiere que los métodos in vitro para la diferenciación de las CMPCs en cardiomiocitos como se define en la presente comprenden además o alternativamente la etapa para tratar las CMPCs con un miembro de la familia TGF-β. TGFβ existe en al menos tres subtipos conocidos, en los seres humanos, TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. La superfamilia de TGFβ incluye varias proteínas, por ejemplo TGF-β, activina y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) BMP2 hasta BMP7. Un miembro de la familia TGFβ incluye por lo tanto cualquiera de las sustancias anteriormente mencionadas ya sea sola o en la combinación deseada. Se prevé además proporcionar células recombinantes que expresan y secretan uno o más miembros de la familia TGFβ en lugar de proporcionar/añadir el miembro de la familia TGFβ per se. Ejemplos de células recombinantes incluyen las CMPCs y/o cardiomiocitos o cualquier otra célula que es (a) capaz de expresar y secretar un miembro de la familia de TGF-β y (b) es biocompatible ya sea con las CMPCs/cardiomiocitos y/o con el sujeto a tratar (ver por ejemplo la descripción de las composiciones farmacéuticas más abajo).

La presente invención se relaciona así con un método in vitro para la diferenciación de las CMPCs en cardiomiocitos, que comprenden además las etapas de:

(b1) tratar dichas CMPCs con un miembro de la familia de TGF-β.

Se entenderá que las CMPCs así tratadas se tratan durante un tiempo que es suficiente para permitir diferenciar las CMPCs en cardiomiocitos. La diferenciación se puede determinar por ejemplo mediante el análisis de inmunofluorescencia de la expresión de la proteína contráctil, por ejemplo, de α-actinina. Además, se entenderá que si las células comienzan a pulsar, se diferencian. Las estricciones transversales también se pueden determinar usando microscopía de luz. Se prevé además que modificar las CMPCs usando un promotor específico de cardiomiocitos acoplado a un gen marcador detectable, por ejemplo, a GFP de manera que se puede seguir la diferenciación de las células más fácilmente. Promotores cardíacos adecuados son por ejemplo el promotor de la actina cardíaca humana y el promotor Mlc-2V.

Cuatro semanas después de la estimulación, se analizó por RT-PCR la expresión del ARNm de marcadores de diferenciación cardíaca. Antes de la diferenciación, sólo GATA-4 y Nkx2.5 se expresaron, mientras que después de 4 semanas de estimulación, los cardiomiocitos derivados de las hCMPCs expresaron los genes específicos de CM, bMHC, ANP, Troponina I y α-actina cardíaca (Fig. 2a). Además, no se puede detectar el ARNm de Myo-D, indicando que no hubo diferenciación hacia miocitos esqueléticos. Para caracterizar más aun los cardiomiocitos, se llevó a cabo la tinción inmunofluorescente de proteínas del sarcómero. Los cardiomiocitos derivados de las hCMPC mostraron estricciones sarcoméricas cuando teñidos doble con α-actinina y troponina-I, organizados en haces separados (Fig. 2b). El etiquetado de las células con anticuerpos producidos contra otros componentes del aparato contráctil reveló un patrón de estrías cruzadas positivas para titina, desmina, MLC2v, y β-MHC (Fig. 2c). El doble etiquetado de la α-actinina con el disco intercalado relacionado a proteínas como N-cadherina o ZO-1 resultó en fuertes señales positivas en los límites celulares de casi todos los cardiomiocitos indicativo de acoplamiento mecánico estable (Fig. 2c).

Los cardiomiocitos como se describen en la presente descripción, es decir, los obtenibles por los métodos in vitro para la diferenciación de las CMPCs en cardiomiocitos como se define en la presente, se caracterizan así por la expresión del ARNm de β-MHC, ANP, α-actinina, α-actina cardíaca, Troponina I y/o MLC2v cardíaco detectado por RT-PCR y/o por la ausencia detectada por RT-PCR del ARNm de Myo-D y/o Isl-1.

Los cardiomiocitos descritos en la presente además, son más maduros que los descritos hasta ahora, basado en su bajo potencial de membrana máximo diastólico que es mucho menor que el de las células madre de embriones humanos o cardiomiocitos derivados de Isl-1 de ratón.

Para caracterizar mejor los cardiomiocitos, se realiza la electrofisiología de fijación de membrana. Los potenciales de acción registrados a partir de cardiomiocitos individuales y cardiomiocitos en pequeñas agrupaciones ($n = 11$) tuvo una conformación como el ventrículo (Fig. 4A), según confirmado por la cuantificación de parámetros del potencial de acción (Fig. 4B). Potencial diastólico máximo promedio fue -67 ± 8 mV y velocidad ascendente máxima promedio fue de 39 ± 4 V/s. APD promedio₅₀ y APD₉₀ fueron 258 ± 38 y 483 ± 51 ms, respectivamente. Además, el potencial de membrana diastólica fue bastante estable, a diferencia de las células de marcapasos cardíacos. El acoplamiento de excitación-contracción se demostró usando imágenes de calcio combinadas y experimentos sujetos a corriente (Fig. 4C). El tiempo promedio del pico de los transitorios ($n=7$) fue 447 ± 54 ms, tiempo de inactivación promedio fue 568 ± 42 ms.

Los cardiomiocitos como se describe, es decir, los obtenibles por los métodos in vitro para la diferenciación de CMPCs en cardiomiocitos como se define en la presente, además se caracterizan así por su capacidad de mostrar acoplamiento de excitación-contracción. El acoplamiento de excitación-contracción (ECC) es el proceso por el cual un potencial de acción induce que se contraiga un miocito.

Los cardiomiocitos, adecuados para el trasplante, deben ser capaces de acoplarse correctamente y propagar potenciales de acción. Por lo tanto, se analiza la presencia de comunicación de la unión en hendidura en las hCMPCs. RT-PCR semi-cuantitativo mostró que las hCMPCs indiferenciadas expresan Cx40, Cx43 y Cx45. Conexina (Cx) son proteínas estructurales necesarias para formar uniones de interrupción en la membrana celular. Después de la diferenciación en cardiomiocitos la expresión de Cx40 y 43 pero no de Cx45 se reguló negativamente (Fig. 5a). El análisis inmunohistoquímico mostró que mientras las hCMPCs indiferenciadas expresan Cx 40, 43 y 45 en un patrón difuso y predominantemente intracelular (Fig. 5b), los cardiomiocitos derivados de las hCMPCs expresan Cx40 y 43 en los bordes celulares en un patrón típico de la unión en hendidura. Cx45 se encontró tanto intracelular como en la membrana celular. El acoplamiento metabólico se midió mediante la inyección de Lucifer amarillo en las monocapas de las hCMPCs indiferenciadas y diferenciadas, lo que resulta en la difusión del tinte a 6 ± 1 ($n=14$) y 17 ± 3 ($n=8$) células, respectivamente (Fig. 6A y B). La diferencia en la propagación del tinte fue estadísticamente significativa ($p<0.007$).

La conductancia de la unión en hendidura macroscópica en pares de células de CMPCs indiferenciadas y diferenciadas fue de 48 ± 21 nS ($n = 5$) y 31 ± 4 nS ($n = 5$), respectivamente (Fig. 6C). Las diferencias en la conductancia promedio no fueron estadísticamente significativas. Un registro representativo de las hCMPCs diferenciadas (Fig. 6D) muestra la inactivación de la conductancia de la unión en hendidura dependiente de un voltaje suave que se inicia a un V_j de +30 mV indicativo de los canales Cx43 la isoforma predominantemente expresada. Estos resultados indican la comunicación de la unión en hendidura entre los cardiomiocitos derivados de hCMPC.

El análisis de la conformación del potencial de acción de los cardiomiocitos de hCMPC mostró un potencial diastólico máximo bajo, en comparación con los valores que se miden en cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas, cardiomiocitos ventriculares fetales humanos y cardiomiocitos derivados de células de carcinoma embrionario P19 de ratón (-67 ± 8 mV comparado con -48 ± 2 , -38.5 ± 1.6 y -54 ± 2 mV, respectivamente)^{19,34}. Además, y posiblemente como consecuencia, la velocidad ascendente máxima es más alta (39 ± 4 V/s en comparación con 7.0 ± 0.8 , 8.9 ± 4.3 y 10.0 ± 1.0 V/s). APD₉₀ de las hCMPCs es comparable con los valores medidos en los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas y cardiomiocitos ventriculares humanos fetales (483 ± 51 ms comparado con 436.4 ± 55.3 y 370.0 ± 45.8 ms). Las hCMPCs expresan altos niveles de proteínas de unión en hendidura tanto en el estado diferenciado como indiferenciado. La expresión en los cardiomiocitos de hCMPC, se encuentra casi exclusivamente en la membrana plasmática. El patrón de expresión reflejó canales funcionales de unión en hendidura según lo confirmado por un acoplamiento metabólico y eléctrico robusto. Curiosamente, los cardiomiocitos de hCMPC tienen un fenotipo que es aun más maduro que los cardiomiocitos ventriculares cultivados aislados a partir de 16 semanas Sin estar de este modo limitado por alguna teoría, en las CMPCs que se aíslan con los métodos descritos en la presente descripción se encuentran de manera consistente y repetida valores APD-90 que son superiores a los de miocitos de 16 semanas como se explicó anteriormente. Así, parece que los cardiomiocitos derivados de nuestras CMPCs son más maduros que los que se pueden encontrar en un feto de 16 semanas. La diferenciación potencial de las CMPCs descritas en la presente es, así, hacia las células más maduras.

En términos de terapia futura, el trasplante de mioblastos esqueléticos mal acoplados en los corazones humanos resultó en un ensayo clínico en taquiarritmias ventriculares en algunos pacientes¹⁴. El acoplamiento intercelular adecuado con las células del corazón huésped será necesario para preservar las características de la conducción y será uno de los criterios más importantes para determinar si las hCMPCs se pueden dirigir a ensayos clínicos. La combinación de alta velocidad ascendente, bajo potencial diastólico máximo y comunicación de unión en hendidura sugiere que cuando se trasplanten los cardiomiocitos de hCMPC apoyarán lo suficiente la propagación del impulso. La caracterización de las hCMPCs en este estudio identificó una población distinta de células progenitoras cardíacas que pueden usarse para estudiar la diferenciación de cardiomiocitos humanos, y servir como una fuente adecuada para cardiomiocitos humanos trasplantables.

Se describe además una composición farmacéutica que comprende los cardiomiocitos, que son obtenibles por los

métodos de la invención mediante el uso de las CMPCs como se define en la presente. La composición farmacéutica comprende opcionalmente un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente activo. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas reguladas con fosfato, agua, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales vehículos se pueden formular por métodos convencionales bien conocidos.

Se prevé además proporcionar una composición farmacéutica que comprende las "estructuras vasculares tubulares" y/o "brotes vasculares", que son obtenibles mediante el uso de las CMPCs en los métodos de diferenciación respectivos tal como se definen en la presente descripción.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una fracción celular de acuerdo con la reivindicación 1. Se describe además un kit que comprende esta composición farmacéutica, en donde dicho kit y/o composición farmacéutica comprende además los manuales de instrucciones que guían el experto para diferenciar las CMPCs en cardiomiocitos y/o las estructuras tubulares y/o los brotes vasculares, por ejemplo mediante el uso de los métodos de diferenciación como se describe. Para este fin, el kit y/o composición farmacéutica puede comprender además las sustancias/productos químicos y/o equipamiento de cultivo celular (placas de cultivo; anticuerpos para la tinción de calidad, agentes de diferenciación etc.) que son útiles para el protocolo de diferenciación y, opcionalmente, un disolvente, diluyente, tampón para estabilizar y/o el almacenamiento de los compuestos. Para este fin, se prevé que la composición farmacéutica que comprende las CMPCs y/o el kit que comprende la composición farmacéutica comprende además los agentes de desmetilación, agentes antioxidantes miembros de la familia TGF- β ; VEGF etc. como se describe en la presente invención en detalle en el contexto de los métodos de diferenciación.

Se prevé además preservar/mantener/encapsular las CMPCs comprendidas en la composición farmacéutica y/o el kit descrito en el párrafo anterior, por ejemplo, injertos biodegradables. Ejemplos del material biocompatible/biodegradable se ejemplificaron en la presente descripción en otra parte. Para este fin, se prevé además preservar/mantener/encapsular las CMPCs junto con miembros de, por ejemplo, la familia TGF- β (cuando apunte a diferenciarse en cardiomiocitos) y/o VEGF (cuando apunte a diferenciarse en las "estructuras tubulares" o "brotes vasculares") en el material/injerto biocompatible/biodegradable para lograr la diferenciación deseada de las CMPCs en su destino previsto (ver el párrafo más abajo). Se prevé que los miembros de la familia TGF- β y/o VEGF estén contenidos per se dentro de material/injerto biocompatible/biodegradable junto con las CMPCs y/o para añadir células recombinantes que sean capaces de expresar y secretar estos miembros de la familia de TGF- β y/o VEGF, preferentemente en el área adyacente de las CMPCs. Las células recombinantes mencionadas son preferentemente también CMPCs y/o cardiomiocitos que comprenden el miembro deseado de la familia TGF β y/o VEGF como un ácido nucleico expresable, preferentemente bajo el control de un promotor adecuado.

Se entenderá que es posible también encapsular aún más el miembro-TGF β y/o VEGF, por ejemplo, en estructuras de microcápsulas. La microencapsulación se puede usar para retardar la liberación en el cuerpo del miembro de la familia TGF β y/o VEGF. Esto puede reducir los efectos secundarios tóxicos al prevenir altas concentraciones iniciales en el sujeto. El patrón de liberación es típicamente de primer orden en el cual disminuye exponencialmente la velocidad con el tiempo hasta que se agota la fuente del fármaco. En esta situación, una cantidad fija de fármaco está dentro de la microcápsula. La diferencia de concentración entre el interior y el exterior de la cápsula disminuye continuamente a medida que difunde el agente contenido.

En consecuencia, se prevé que la última etapa de la diferenciación de las CMPCs puede ocurrir por medio de proporcionar una composición farmacéutica que comprende las CMPCs-, preferentemente pre-diferenciadas con un agente de desmetilación y más preferido además en presencia de un agente antioxidante (estas etapas de diferenciación se describieron antes en la presente y las células ya tratadas se denominan "pre-diferenciadas" en lo adelante) y un miembro de la familia TGF β (ya sea directamente o producido por una célula recombinante en el área adyacente de la CMPC). Se describe además un profármaco que comprende CMPCs pre-diferenciadas. Se prevé además de preservar/mantener/encapsular las CMPCs (preferentemente en la forma pre-diferenciada) en un primer injerto biodegradable/biocompatible y añadir el miembro de TGF β (ya sea los compuestos per se o células productoras de ellos) en forma de un segundo injerto que se trasplanta en el área adyacente del primer injerto y lograr por lo tanto la diferenciación de las células en su destino deseado. Dicho segundo injerto puede sustituirse si es necesario o se retira una vez que las CMPCs se hayan diferenciado en cardiomiocitos. Se aplica igualmente lo mismo a las estructuras tubulares/brotes vasculares como se ha mencionado en la presente descripción antes, usando el método de diferenciación respectivo descrito en la presente (incluyendo el tratamiento de las células con una agente biológicamente activo que tiene la capacidad para inducir la angiogénesis o la germinación de la angiogénesis (como por ejemplo VEGF).

Se describe además una composición farmacéutica que comprende las CMPCs junto con los miembros del miembro de la familia TGF- β en un material/injerto biocompatible/ biodegradable. Dicha composición farmacéutica puede comprender alternativamente dos injertos distintos, a saber, un primer injerto biodegradable/biocompatible que

comprende la CMPCs (preferentemente en la forma pre-diferenciada) y un segundo injerto que comprende el miembro de TGFβ mencionado (ya sea los compuestos per se o células productoras de estos miembros de TGFβ). Se prevé además que el segundo injerto esté hecho de un material no-biodegradable, por ejemplo, en caso de que una célula recombinante que expresa y secreta uno o más de los miembros de TGFβ mencionados se incluye en lugar del miembro(s) de TGFβ per se. Se prevé en este caso que el injerto que contiene el miembro de la familia TGFβ productor de células se retira una vez que las CMPCs y/o las CMPCs previamente diferenciadas se diferencian en cardiomiocitos. Se deduce que tal injerto puede estar compuesto también de un material no biodegradable, ya que se retira de todos modos. Tal injerto no biodegradable, sin embargo, es preferentemente biocompatible, es decir, que tiene la cualidad de no tener efectos tóxicos o perjudiciales sobre los sistemas biológicos.

Lo anterior se aplica igualmente a las composiciones farmacéuticas que comprenden las CMPCs junto con compuestos como VEGF que tienen la capacidad de diferenciar las CPMPs en las estructuras tubulares o los brotes vasculares como se describió.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación será determinado por el médico de cabecera y los factores clínicos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los cardiomiocitos deben entrar en la zona del límite que rodea el área infartada a través de por ejemplo inyección intramiocárdica, o injertando la estructura 3D en el miocardio dañado.

Las composiciones farmacéuticas pueden así usarse en la terapia de reemplazo de cardiomiocitos y/o para el tratamiento de infarto de miocardio o para mejorar los efectos del infarto de miocardio, es decir la presente invención se relaciona con el uso de las CMPCs obtenibles por el método de la invención para la preparación de una composición farmacéutica que se usa en una terapia de reemplazo de cardiomiocito y/o para el tratamiento del infarto de miocardio o para mejorar los efectos del infarto de miocardio. "Terapia de reemplazo de cardiomiocitos" en este sentido se refiere a la mejoría de la fuerza contráctil cardíaca. La meta de la terapia de reemplazo de cardiomiocitos es reemplazar los cardiomiocitos perdidos en la pared ventricular por células contráctiles viables. Debido a la muerte de miocitos y el desarrollo de una cicatriz, el corazón tiene menos energía para bombear. La mejoría de la función contráctil ayudará a aumentar la fracción de eyección.

Como se mencionó antes, se prevé además preservar/mantener/encapsular los cardiomiocitos y/o CMPCs como se explicó anteriormente y/o las estructuras tubulares o brotes vasculares en, por ejemplo, injertos biodegradables. Ejemplos del material biocompatible/biodegradable incluyen colágeno, gelatina, fibrina, albúmina, ácido hialurónico, heparina, sulfato de condroitina, quitina, quitosano, ácido alginico, pectina, agarosa, hidroxapatita, polipropileno, polietileno, polidimetilsiloxano, polímero o copolímero de ácido glicólico, ácido láctico o aminoácido, una mezcla de dos o más tipos de materiales biocompatibles anteriores, y similares. Un material biocompatible particularmente preferido es el colágeno. Se prefiere además mezclar el colágeno con otro material biocompatible descrito en lo anterior. El colágeno puede ser cualquier colágeno e incluye, por ejemplo, colágeno soluble en ácido, colágeno solubilizado por la enzima (por ejemplo, atelocolágeno, etc.), colágeno solubilizado por álcali, colágeno con cadenas laterales de aminoácidos modificadas, puente de colágeno, colágeno modificado por ingeniería genética, o similares. El colágeno que tiene modificado las cadenas laterales de aminoácidos incluye, por ejemplo, succinil o metil colágeno, o similares. El puente de colágeno incluye, por ejemplo, el colágeno tratado con glutaraldehído, hexametilendiisocianato o compuesto poliepoxi, o similares (Fragrance J., 1989-12, 104-109, patent japonesa KOKOKU (examinada) núm.J (1995)-59522)). Las composiciones farmacéuticas que comprenden los cardiomiocitos en un injerto biodegradable de ese tipo pueden ser fácilmente llevados a la zona que rodea el área infartada o sobre el miocardio dañado.

Se prevé además que los injertos biocompatibles/biodegradables que contienen los cardiomiocitos y/o CMPCs (preferentemente las CMPCs pre-diferenciadas) y/o las estructuras tubulares o brotes vasculares y/o el miembro de la familia TGFβ o un agente biológicamente activo que tiene la capacidad de inducir la angiogénesis o germinación de la angiogénesis (como por ejemplo, VEGF) (dependiendo del resultado diferenciación que se logra) se superponen sobre una endoprótesis o injerto de endoprótesis. En el campo de la medicina, una endoprótesis es un expandible en forma de alambre o tubo perforado (por ejemplo, perforado por medio del corte por láser) que normalmente se inserta en un conducto natural del cuerpo para prevenir o contrarrestar una constricción de flujo localizada inducida por enfermedad y/o para apoyar a puntos débiles en las arterias. Un injerto de endoprótesis endovascular es un dispositivo tubular que se compone de tejido de apoyo en otra estructura rígida, normalmente de metal. Esta estructura rígida también se denomina una endoprótesis.

Se prevé además superponer los injertos biocompatibles/biodegradables que contienen los cardiomiocitos y/o las CMPCs (preferentemente las CMPCs pre-diferenciadas) y/o las estructuras tubulares o brotes vasculares como se describe y/o el miembro de la familia TGFβ o un agente biológicamente activo que tiene la capacidad de inducir la angiogénesis o germinación de la angiogénesis (como por ejemplo, VEGF) (dependiendo del resultado de diferenciación que se logra) en una válvula cardíaca artificial o una válvula cardíaca biológica. Una válvula cardíaca artificial es un dispositivo que se implanta en el corazón de un sujeto, por ejemplo un ser humano. Estas válvulas cardíacas mecánicas son las prótesis diseñadas para replicar la función de las válvulas naturales del corazón. Se describen además en la

presente las válvulas cardíacas biológicas que son válvulas cardíacas de animales (es decir, xenoinjertos), como cerdos, que se someten a varios procedimientos químicos para hacerlas adecuadas para la implantación en el corazón humano.

5 Como alternativa, se prevén válvulas de corazón trasplantado de humanos (aloinjerto u homoinjerto).

Como se ha descrito, el injerto biodegradable se puede sustituir por un injerto biocompatible pero no degradable. Biocompatible significa que tiene la cualidad de no tener efectos tóxicos o perjudiciales sobre los sistemas biológicos, en particular en el sujeto que se trata.

10

Se prevé además que los cardiomiocitos y/o las CMPCs (preferentemente las CMPCs pre-diferenciadas) y/o las estructuras tubulares o brotes vasculares y/o el miembro de la familia TGFβ-o un agente biológicamente activo que tiene las capacidades para inducir la angiogénesis o aparición de brotes de angiogénesis (como por ejemplo, VEGF) (dependiendo de qué resultado de diferenciación debe ser logrado) está (n) superpuesto (s) directamente (que significa, sin un injerto biocompatible/biodegradable) en los dispositivos antes mencionados, es decir, en las endoprótesis, válvulas del corazón, etc. Como alternativa, la superficie de los dispositivos mencionados anteriormente se pueden recubrir con capas poliméricas adhesivas que incluyen, pero sin limitarse a, por ejemplo, poli-L-lisina (PLL) o fibronectina (FN).

15

20

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares que se usan generalmente en la presente descripción significan obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en la presente descripción, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (b) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. Se describe el tratamiento de pacientes con infarto de miocardio. Este tratamiento implicaría inhibir o aliviar cualquier afección médica relacionada con el infarto de miocardio.

25

El "infarto de miocardio", literalmente significa que existe destrucción de las células del músculo del corazón debido a la falta de oxígeno. La falta de oxígeno resultante provoca daños y la muerte potencial del tejido del corazón.

30

Los cardiomiocitos derivados de hCMPC tuvieron un fenotipo eléctrico bastante maduro en cultivo, y por lo tanto servirán como fuente de cardiomiocitos trasplantables autólogos.

35

Como se ha descrito, los cardiomiocitos obtenibles por los métodos de la invención se pueden usar para la preparación de una composición farmacéutica, en donde dicha composición comprende o consiste de cardiomiocitos que se diferencian de las CMPCs como se define en la presente descripción, y en donde dichas CMPCs se derivan del paciente que se trata (es decir, tratamiento autólogo). Se entenderá que "autólogo" se refiere a las células que se reimplantan en el mismo individuo, ya que vienen de (autoinjertos). En contraste, las células trasplantadas de un individuo diferente se refieren como alogénica o como un aloinjerto. Tales células alogénicas, sus usos, y composiciones farmacéuticas que los comprenden, están además dentro del alcance de la presente descripción.

40

En un aspecto adicional, el uso de las CMPCs para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de infarto de miocardio o para mejorar los efectos del infarto de miocardio se describe, en donde dicha "preparación" incluye explícitamente los métodos de diferenciación de la presente invención (es decir, los métodos para la diferenciación de las CMPCs de la invención a los cardiomiocitos como se explica en la presente descripción).

45

En un aspecto adicional, la presente descripción se relaciona con un método para el tratamiento de infarto de miocardio o para mejorar los efectos del infarto de miocardio en un sujeto, que comprende los métodos de la invención como se mencionó anteriormente (es decir, los métodos para proporcionar los cardiomiocitos como se describió) y además administrar los cardiomiocitos así obtenidos a un sujeto que lo necesita (por ejemplo, el mismo sujeto a partir del cual se derivaron las CMPCs (autoinjerto) o para un individuo diferente (aloinjerto)).

50

Se describe además un método para el tratamiento de infarto de miocardio o para mejorar los efectos de infarto de miocardio en un sujeto, que comprende proporcionar las CMPCs y que comprende además los métodos de diferenciación de la presente invención (es decir, los métodos para la diferenciación de las CMPCs en los cardiomiocitos como se explica en la presente descripción) y administrar además los cardiomiocitos así obtenidos a un sujeto que lo necesita (por ejemplo, el mismo sujeto a partir del cual se derivaron las CMPCs (autoinjerto) o para un individuo diferente (aloinjerto)).

55

60

En el contexto de la presente descripción, el término "sujeto" significa un individuo que necesita de un tratamiento de un trastorno afectivo. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, particularmente preferido un humano, un caballo, un camello, un perro, un gato, un cerdo, una vaca, un carnero o una gallina.

5 El término "administrado" significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de los cardiomiocitos como se describe en la presente. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" en la presente se entiende una dosis que produce el efecto para el cual se administró. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será determinable por una persona con experiencia en la materia mediante el uso de técnicas conocidas.

10 Los cardiomiocitos derivados de hCMPC tuvieron un fenotipo eléctrico bastante maduro en el cultivo, lo que sugiere que pueden servir como una población homogénea de cardiomiocitos humanos para la selección del fármaco. Para la selección del fármaco, se necesita de un cultivo celular de cardiomiocitos homólogos que no contiene la cantidad significativa de otras células heterólogas a la misma ya que esto podría influir en el comportamiento/respuesta al fármaco. Tener un fenotipo más maduro de los cardiomiocitos imitará más la situación del paciente, y un cardiomiocito más maduro, como los descritos en la presente, son más frágiles y podrían responder diferente entonces más que las células fetales. Estos cardiomiocitos son así particularmente útiles para los métodos de selección como los métodos de selección de fármacos.

15 Se prevé que las CMPCs y de ese modo además los cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares" derivados de los mismos pueden comprender una secuencia de polinucleótidos extraña que permite la transcripción de ácidos nucleicos y/o la expresión de proteínas codificadas por tales ácidos nucleicos.

20 "Extrañas" en este sentido significa que la secuencia de polinucleótido viene del exterior de la célula (es decir, es exógeno a ella) y se introduce artificialmente en las células.

25 Preferentemente, las secuencias de polinucleótidos extrañas son parte de un vector, por ejemplo, un vector disponible en el comercio. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores plásmido compatibles con las células de mamífero, tales como pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen), pREP (Invitrogen), pCRTopo (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1 neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pUCTag, pZD35, pLXIN y pSIR (Clontech) y pIRES-EGFP (Clontech). Para las técnicas de modificación de vectores, ver Sambrook y Russell (2001), loc. cit. Los vectores pueden contener uno o más sistemas de replicación y herencia para la clonación o expresión, de uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

30 Las secuencias codificantes insertadas en el vector se pueden sintetizar por métodos estándar, aislar de fuentes naturales, o preparar como híbridos. La ligación de las secuencias codificantes a elementos reguladores transcripcionales (por ejemplo, promotores, potenciadores y/o aisladores) y/o para otras secuencias codificantes de aminoácidos se puede llevar a cabo usando los métodos establecidos.

35 Además, los vectores pueden comprender elementos de control de la expresión, que permiten la expresión adecuada de las regiones codificantes en huéspedes adecuados. Tales elementos de control son conocidos por el técnico con experiencia y pueden incluir un promotor, codón de iniciación de la traducción, traducción y el sitio de inserción o sitios de entrada ribosomal interno (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) para introducir un inserto en el vector. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico extraño está unida operativamente a dichas secuencias de control de expresión permitiendo la expresión en células eucariotas. Se prefieren particularmente en este contexto las secuencias de control que permiten la expresión correcta en cardiomiocitos y/o células derivadas del corazón. Tales secuencias de control se han ejemplificado en la presente descripción en otra parte.

40 Los elementos de control que aseguran la expresión en células eucariotas son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Como se mencionó anteriormente, por lo general comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de señales poli-A opcionalmente del final de la transcripción, que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización de la transcripción. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir la transcripción, así como potenciadores traduccionales, y/o regiones promotoras heterólogas o asociadas naturalmente. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en, por ejemplo, células huésped de mamíferos comprenden el promotor timidina quinasa CMV-HSV, SV40, promotor RSV (virus de sarcoma de Rous), promotor del factor 1 α de elongación humano, potenciador de CMV, promotor CaM-quinasa o potenciador SV40.

45 Un vector de expresión como se describe es al menos capaz de dirigir la replicación, y preferentemente la expresión, de los ácidos nucleicos y proteína. Orígenes de replicación adecuados incluyen, por ejemplo, el Col E1, el SV40 viral y los orígenes M 13 de la replicación. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor lacZ, el promotor gal10 y el promotor poliédrico del virus de la poliedrosis nuclear múltiple Autographa californica (AcMNPV). Las secuencias de terminación adecuadas incluyen, por ejemplo, la hormona de crecimiento bovino, SV40, LacZ, y señales de poliadenilación poliédricas de AcMNPV. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen la resistencia a neomicina, ampicilina e higromicina y similares. Los vectores específicamente diseñados permiten el transporte de ADN entre diferentes células huésped por ejemplo, entre las células de bacteria-animal.

Se prevé que la secuencia de polinucleótido extraña comprende una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un gen, ADNc, etc.), que cuando se expresa muestra un efecto sobre la proliferación, hipertrofia, potencial diastólico máximo, la capacidad de acoplar correctamente y propagar potenciales de acción; en el acoplamiento excitación-contracción y/o en los cardiomiocitos y/o supervivencia o muerte de CMPC. Se prevé además que la secuencia de polinucleótido extraña comprende un gen que expresa un producto génico deseado que puede tener un efecto beneficioso sobre el tejido del corazón y/o sobre la angiogénesis. Los genes que se prevén en este sentido se ejemplifican por, pero sin limitarse a la siguiente lista: genes antiapoptóticos como Akt, pro angiogénesis como VEGF, pro crecimiento como bFGF (pero después dirigido por un promotor específico de cardiomiocitos de esta manera no estarán en las células indiferenciadas de esta manera no bloquearán ahí la diferenciación. BMP2/4 que son de diferenciación del pro miocito.

Se prevé además que la secuencia de polinucleótido extraña adicionalmente o exclusivamente comprende un gen reportero, es decir, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas fácilmente ensayadas como por ejemplo GFP, EGFP, CAT, GAL o GUS. Los genes reporteros se pueden unir a otras secuencias de ácido nucleico de manera que sólo la proteína reportera se elabora, o de manera que la proteína indicadora se fusiona con otra proteína (proteína de fusión). Como alternativa, sólo el gen reportero se expresa, por ejemplo, bajo el control de un promotor cardíaco o bajo el control de un cardiomiocito o un promotor específico a CPMC. Tales promotores se han ejemplificado en la presente descripción en otra parte. Promotores cardíacos adecuados son por ejemplo promotor de la actina cardíaca humana y el promotor Mlc-2V.

Como alternativa, se prevé además que las células descritas en la presente (es decir, las CMPCs, los cardiomiocitos y/o las "estructuras tubulares" derivados de ahí) pueden comprender moléculas de ácidos nucleicos cortos inhibidoras como nucleótidos antisentido, ARNi, ARNip, miARN o ribozima. Estas moléculas inhibidoras interfieren con la transcripción y/o expresión de un gen objetivo. Los miARN son pequeños ARNs reguladores no codificantes cortos que regulan la expresión de proteínas por la represión de la traducción. En los últimos años, los estudios han demostrado que los microARNs (miARNs) son importantes para la regulación de la transcripción de los genes objetivo, sirviendo para funciones reguladoras importantes en la angiogénesis, desarrollo del corazón, y mantenimiento de poblaciones de células madre.

Un enfoque ARNip es, por ejemplo, descrito en Elbashir ((2001), Nature 411, 494-498)). Se prevé además que se emplean, por ejemplo ARNs de horquilla corto (ARNhcs) El enfoque de ARNhcs para el silenciamiento de genes es bien conocido en la técnica y puede comprender el uso de ARNs st (pequeños temporales); Ver, entre otros Paddison (2002) Genes Dev. 16, 948-958. Los enfoques para el silenciamiento de genes son conocidos en la técnica y comprenden "enfoques de ARN" como iARN o ARNip. El uso exitoso de tales enfoques se ha demostrado en Paddison (2002) loc. cit., Elbashir (2002) Methods 26, 199-213; Novina (2002) Mat. Med. junio 3, 2002; Donze (2002) Nucl. Acids Res. 30, e46; Paul (2002) Nat. Biotech 20, 505-508; Lee (2002) Nat. Biotech. 20, 500-505; Miyagashi (2002) Nat. Biotech. 20, 497-500; Yu (2002) PNAS 99, 6047-6052 o Brummelkamp (2002), Science 296, 550-553. "Anti-sentido" y "nucleótidos antisentido" significa constructos de ADN o ARN que bloquean la expresión del producto génico de origen natural. Como se usa en la presente descripción, los términos "oligonucleótido antisentido" y "oligómero antisentido" se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de bases de nucleótidos que permite hibridar el oligómero antisentido con una secuencia objetivo en un ARN por apareamiento de bases de Watson Crick, para formar un ARN: oligómero heterodúplex dentro de la secuencia objetivo. El término "secuencia objetivo" en este sentido se refiere a la secuencia del gen que se silencia dentro de las células. El antisentido puede tener complementariedad exacta de secuencia con la secuencia objetivo o cerca de la complementariedad. Tales oligómeros antisentido pueden bloquear o inhibir la traducción del ARNm que contiene la secuencia objetivo, o inhibir la transcripción de genes mediante la unión a secuencias de cadena doble o monocatenaria. Preferentemente, dichos oligonucleótidos antisentido como se usan en la presente descripción son moléculas oligoméricas "resistentes a nucleasa" por ejemplo su cadena principal no es susceptible a la escisión de un enlace fosfodiéster por nucleasa. Los oligómeros antisentido resistentes a nucleasa ilustrativos son análogos de oligonucleótidos, tales como fosforotioato y ADN amina-fosfato (pnADN), ambos de los cuales tienen una cadena principal cargada, y oligonucleótidos metilfosfonato, morfolino, y ácido nucleico peptídico (PNA), todos los cuales pueden tener cadenas principales no cargadas.

Tales células como se describieron anteriormente son muy adecuadas para, por ejemplo, métodos de selección y/o para estudios farmacológicos de fármacos como resultado de infarto de corazón y/o para las composiciones farmacéuticas/médicas/ usos y/o tratamientos como se describe en la presente.

En un aspecto adicional, se describe el uso de los cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares" para los métodos de selección, preferentemente métodos de selección de fármacos, dichos métodos de selección que comprenden las etapas de:

- (a) proporcionar los cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares";
- (b) poner dichos cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares" en contacto con una sustancia de prueba; y

(c) evaluar el efecto de dicha sustancia de prueba sobre el fenotipo de dichos cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares".

- 5 Evaluar el efecto en el fenotipo de los cardiomiocitos significará evaluar el efecto sobre la proliferación, hipertrofia, potencial diastólico máximo, la capacidad de acoplar correctamente y propagar potenciales de acción; en el acoplamiento excitación-contracción, supervivencia o muerte de los cardiomiocitos, y la inducción de genes conocidos que se involucran en estos procesos.
- 10 Evaluar el efecto en el fenotipo de las "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares" significará evaluar el efecto en el espesor de los brotes, la longitud de los brotes, el número de puntos de ramificación y la presencia de células del músculo liso y endoteliales.
- 15 Las CMPCs se pueden emplear como se describe para los métodos de selección. Con este fin, se prevé que (a) las CMPCs se proporcionan y (b) dichas CMPCs se ponen en contacto con una sustancia de prueba y (c) el efecto de dicha sustancia de prueba se evalúa sobre la capacidad de diferenciación de las CMPCs. La "capacidad de diferenciación" significa la capacidad de las CMPCs para diferenciarse en cualquiera de los cardiomiocitos o "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares", dependiendo del método de diferenciación (es decir, los métodos de diferenciación). Dichos métodos de diferenciación se explican en gran detalle en la presente descripción.
- 20 Los métodos de selección, opcionalmente comprenden las etapas de a) introducir una genoteca molecular de ácidos nucleicos candidatos aleatorios en una pluralidad de células de prueba (es decir, los cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares"), en donde cada uno de dichos ácidos nucleicos comprende una secuencia de nucleótidos diferente; b) tamizar la pluralidad de células de prueba para una célula que exhibe un fenotipo alterado. Los métodos pueden incluir además las etapas de c) aislar la (s) célula (s) de prueba (s) que presenta (n) un fenotipo alterado; y d) aislar un ácido nucleico candidato de la (s) célula (s). La introducción (por ejemplo, por vía de vectores retrovirales) y construcción de genotecas moleculares adecuadas de ácidos nucleicos candidatos aleatorios se detalla, por ejemplo, en WO 97/27213.
- 25 El término "sustancia de prueba" de acuerdo con los métodos de selección de la presente invención significará cualquier sustancia biológicamente activa que tiene un efecto en la proliferación, hipertrofia, supervivencia o muerte de los cardiomiocitos, y la inducción de genes conocidos que se involucran en estos procesos. La selección del efecto en las estructuras tubulares son crecimiento, supervivencia ES y SMC, migración, longitud de brote, y puntos de ramificación. Los compuestos preferidos son los ácidos nucleicos, preferentemente que codifican para un péptido, polipéptido, ARN antisentido, ARNi, ARNip, miARN o una ribozima o ácidos nucleicos que actúan independientemente de su respectiva transcripción su traducción como por ejemplo un ARN antisentido o ribozima; péptidos naturales o sintéticos, preferentemente con una masa molecular relativa de aproximadamente 1.000, especialmente de aproximadamente 500, análogos de péptidos, polipéptidos o composiciones de polipéptidos, proteínas, complejos de proteínas, proteínas de fusión, preferentemente anticuerpos, especialmente anticuerpos murinos, humanos o humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab o cualquier otra porción de unión a antígeno o derivado de un anticuerpo, que incluyen modificaciones de moléculas tales como, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, farnesilación, hidroxilación, metilación o esterificación, hormonas, moléculas orgánicas o inorgánicas o composiciones o genotecas, preferentemente pequeñas moléculas con una masa molecular relativa de aproximadamente 1.000, especialmente de aproximadamente 500. Los compuestos de prueba se pueden recuperar a partir de productos purificados de fuentes naturales o mezclas de productos naturales, que incluyen fluidos corporales, tejidos y células. Estos se pueden derivar de bacterias, hongos, plantas, que incluyen las plantas superiores, insectos y mamíferos. Se prevé particularmente que el compuesto de prueba es una sustancia química y/o genoteca natural de compuestos, esta última que incluye pero sin limitarse a las genotecas de compuestos naturales derivados de flores, plantas verdes, frutas, verduras, productos lácteos, granos y/o fuentes fúngicas.
- 30 Se prevé que el término "poner en contacto un cardiomiocito y/o "estructura tubular" y/o "brotes vasculares" con la sustancia de prueba" incluye introducir los compuestos de prueba por métodos adecuados como electroporación/químico; lipofección; biobalística o microinyección en las células.
- 35 Se prevé además que las células que se usan en los ensayos de selección de la presente invención se usan en una técnica de un híbrido, tres híbridos o una de dos híbridos, que es una técnica de biología molecular usada para descubrir las interacciones proteína-proteína o proteína-ADN mediante pruebas de interacciones físicas (tal como la unión) entre dos proteínas o una sola proteína y una molécula de ADN, respectivamente. Dichos términos y el principio biológico detrás son bien conocidos en la técnica.
- 40 Se describe además una composición de diagnóstico que comprende los cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares" y/o "brotes vasculares" y un estuche que comprende esta composición de diagnóstico y las instrucciones para el uso, es decir, los manuales de instrucción que guían al lector experto sobre cómo mantener a las células viables durante el protocolo de prueba. Se prevé para más, que el estuche descrito anteriormente y/o composiciones de diagnóstico
- 45
- 50
- 55
- 60

comprenden además las sustancias de pruebas (por ejemplo, en forma de una genoteca de compuestos) y las instrucciones para tamizar la influencia de dicha (s) sustancia (s) de prueba (s) en el fenotipo de las células.

5 Se describe además una composición de diagnóstico que comprende las CMPCs como se describe en la presente y/o un estuche que comprende esta composición de diagnóstico, en donde dicho estuche y/o composición de diagnóstico comprende además los manuales de instrucciones que guían la persona experta para diferenciar estas CMPCs en cardiomiocitos y/o "estructuras tubulares " y/o " brotes vasculares ", por ejemplo mediante el uso como se describe de los métodos de diferenciación. Con este fin, este estuche y/o composición de diagnóstico puede comprender además las sustancias/productos químicos y/o equipo de cultivo celular (placas de cultivo; anticuerpos para la calidad de la tinción etc) que son útiles para el protocolo de diferenciación y, opcionalmente, un disolvente, diluyente, amortiguador para estabilizar y/o el almacenamiento de los compuestos. Para este fin, se prevé que la composición de diagnóstico que comprende las CMPCs y/o el estuche que comprende esta composición de diagnóstico comprende, además, los agentes desmetilantes, agentes antioxidantes miembros de la familia del TGF- β etc. como se describe en la presente descripción en detalle en el contexto de los métodos de diferenciación de la invención. Se prevé para más, que el estuche descrito anteriormente y/o composiciones de diagnóstico comprenden además las sustancias de pruebas (por ejemplo, en forma de una genoteca de compuestos) y las instrucciones para tamizar la influencia de dicha (s) sustancia (s) de prueba (s) en el fenotipo de las células.

20 Esta descripción se puede entender mejor junto con los dibujos adjuntos, que se incorporan en la presente descripción como referencias. Además, una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas se obtendrá a partir de los siguientes ejemplos, dados a modo de ilustración y no pretende ser limitante.

Las figuras muestran

25 Figura 1: (A) Imágenes de campo brillante de los cultivos de CMPC . Se indica el número pases. El panel derecho muestra un cultivo MSC. B) Curva de crecimiento de las CMPCs recién aisladas. Se contó el número total de células por pocillo en el día indicado después de la siembra. C) Tabla que muestra la inmunoreactividad de las proteínas marcadoras indicadas por análisis FACS. La expresión de la superficie de CMPC se comparó con los niveles de sangre total. (D) RT-PCR semi cuantitativo en ARN aislado de las CMPCs indiferenciadas se probaron para la expresión de los genes indicados. E) Inmunomarcaje frente a los factores de transcripción GATA-4, Nkx2.5, Islet-1 y análisis de Membrana de Western para demostrar la presencia de proteína GATA-4.

35 Figura 2: (A) RT-PCR semi-cuantitativo en ARN aislado de las CMPCs indiferenciadas (CMPC) y las CMPCs diferenciadas (CMPC dif) probadas para la expresión de Islet-1, factores de transcripción cardíaca tempranos Nkx2.5 y GATA-4, las proteínas contráctiles actina cardíaca, Troponina I cardíaca, MLC2v, y el factor de transcripción de mioblastos esqueléticos Myo-D. B) Inmunomarcaje del cultivo de células diferenciadas 3 semanas después del tratamiento con 5-Azacidina frente a las proteínas contráctiles α -actinina y Troponina I cardíaca. C) Inmunomarcaje frente a las proteínas contráctiles desmina, la titina, MLC2v, β -MHC y α -actinina como se expresa en las CMPCs diferenciadas en los cardiomiocitos. Los paneles de la derecha muestran el perfil de expresión de proteínas relacionadas del disco intercalado ZO-1 y N-cadherina. Bar = 20 μ m.

45 Figura 3: (A) Análisis de membrana de Western en muestras de proteínas aisladas de las CMPCs estimuladas sin o con 1 ng/ml de TGF β o 25 ng/ml de BMP-6 y se probaron con α -pSmad1 o α -pSmad2. El asterisco indica una banda no específica que muestra igual carga. B) RT-PCR semicuantitativo en ARN aislado de las CMPCs estimuladas sin o con 1 ng/ml TGF β para los días indicados se probaron para la expresión de los factores de transcripción cardiacos tempranos Nkx2.5 y Mef2C, las proteínas contráctiles actina cardíaca, Troponina I cardíaca, desmina, ANP y MLC2v. La β -actina se usó como control para la entrada igual de ARN. C) Análisis de membrana de Western de muestras de proteínas de las CMPCs estimuladas sin o con 1 ng/ml de TGF β para los días indicados, se probaron para Nkx2.5 o α -actinina. D) El marcaje inmunohistoquímico para α -actinina muestra el grado de diferenciación en los cardiomiocitos dentro de los cultivos sin (izquierda) o con (derecha) estimulación con TGF β . La contratinción de núcleos se realizó usando DAPI. Bar = 50 μ m.

55 Figura 4: (A) Registro de la fijación de la corriente de un cardiomiocito CMPC que muestra una rápida fase 0 de despolarización y leve despolarización diastólica. (B) Tabla que resume los parámetros de potencial de acción de CMPC. (C) Imagen combinada con calcio y registro de la fijación de la corriente que muestra el acoplamiento excitación-contracción en un cardiomiocito CMPC. Escala de las barras: horizontales 500 ms, vertical -50 mV.

60 Figura 5: (A) RT-PCR semi-cuantitativo en ARN aislado de las CMPCs indiferenciadas indif y diferenciadas (dif) se probaron para la expresión de Cx40, Cx43 y Cx45. β -tubulina se usó como control para la entrada igual de ARN. - RT es el control en el que se omitió la transcriptasa inversa durante la reacción. B) Inmunomarcaje

frente a las isoformas de conexina Cx40, Cx43 y Cx45 en las CMPCs indiferenciadas (paneles superiores) y las CMPCs diferenciadas en cardiomiocitos (paneles inferiores). Bar = 25 μ m.

5 Figura 6. (A) Transferencia de Amarillo Lucifer de la célula inyectada a células circundantes mostrando acoplamiento metabólico. La dispersión del tinte es significativamente mayor en las CMPCs diferenciadas en comparación con las células indiferenciadas. (B) Fotomicrografía de una inyección Amarillo Lucifer representativa en las CMPCs diferenciadas, contraste de fase (panel superior) y fluorescencia con Amarillo Lucifer (panel inferior). El asterisco marca la célula inyectada. (C) Cuantificación de la conductancia eléctrica en parejas de células CMPC indiferenciadas y diferenciadas. (D) Registro representativo o corrientes de unión de la hendidura en un par de células diferenciadas CMPC. Escalas de las barras: horizontal 200 ms, vertical - 200 pA.

15 Figura 7 . (A) RT-PCR semi-cuantitativo en ARN aislado de adulto indiferenciada (ACMPC) se probaron para la expresión de los genes indicados. (B) RT-PCR semi-cuantitativo en ARN aislado de adulto indiferenciada (ACMPC) y ACMPC 4 semanas después de la diferenciación, se probaron para la expresión de los genes indicados. (C) Inmunomarcaje frente a Islet-1 en ACMPCs (panel superior) y frente a α -actinina en ACMPCs diferenciadas en cardiomiocitos (paneles inferiores).

20 Figura 8: Resultados de un ensayo in vitro de angiogénesis. Parte 1: CMPC se sembraron en matrigel sin (A) o con 100 nM (B) de miARN.-x. Las CMPCs formaron estructuras tubulares con células endoteliales (rojo) y tipo SMC (verde), como se puede observar en el aumento (C). Añadir miARN-x resultó en menos ramificaciones laterales y aumento de las estructuras tubulares. Parte 2: Las CMPC se sembraron en matrigel. Las CMPCs formaron estructuras tubulares con células endoteliales (tinción en rojo con CD31) y tipo SMC (en verde con alfa-SMA), como se puede observar en el aumento.

25 Figura 9: Resultados de un modelo de infarto de miocardio en ratones NOD/scid. En el día 2^o los volúmenes LV fueron superiores y EF (fracción de eyección) fue inferior en ambos grupos MI en comparación con la Simulación, sin diferencia. entre los grupos MI (Figura. 9). Sin embargo en el día 14, EF (fracción de eyección) fue superior y ESV (volumen sistólico final) fue inferior en el grupo hCMPC en comparación con el grupo MI+Medio (P=0.001 y P=0.048, respectivamente). Aunque hubo una tendencia hacia un EDV (volumen diastólico final) reducido, esto no alcanzó significación estadística (P=0.14).

30 Figura 10: Resultados de la diferenciación de adipocitos de las hCMPCs. Las Figuras 10a a 10f muestran la evaluación de los genes marcadores de la diferenciación de adipocito leptina, adiposina, ppar, Cnn1/cyr61 y glut4.

EJEMPLOS

40 Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Estos ejemplos no se deben interpretar como que limiten el alcance de esta invención. Se incluyen los ejemplos para los propósitos de ilustración y la presente invención sólo se limita por las reivindicaciones.

45 Las comparaciones del grupo se realizaron usando ANOVA de una vía con la prueba post hoc Holm-Sidak para comparaciones múltiples. Se asumió la significación estadística si $P < 0.05$. Todos los datos se presentan como media \pm SEM.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de células progenitoras de cardiomiocitos a partir de corazones fetales humanos

50 Para la recolección de tejido fetal humano y biopsias del atrio, se obtuvieron permisos individuales usando los procedimientos de consentimiento informado estándar y previa aprobación del comité de ética de la Universidad del Centro Médico de Utrecht. Los corazones fetales se recogieron después de un aborto electivo seguido de perfusión de Langendorff con solución de Tyrode, colagenasa y proteasa. Las biopsias del atrio se picaron en trozos pequeños, seguido de tratamiento con colagenasa. Después del agotamiento de los cardiomiocitos de la suspensión celular, las células progenitoras de cardiomiocitos se aislaron mediante clasificación celular magnética (MACS, Miltenyl Biotec, Sunnyvale, CA) usando perlas acopladas con Sca-1, siguiendo el protocolo de los fabricantes. Las células Sca-1+ se eluyeron de la columna mediante el lavado con PBS suplementado con 2% de suero fetal de terneros (FCS) y se cultivaron en placas recubiertas con 0.1% de gelatina en M199 (Gibco)/EGM (3:1) suplementado con 10% de FCS (Gibco), 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), 5 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 5 ng/ml de factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1) y 5 ng/ml del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

60 El análisis clonal se realizó por el método de dilución limitante. Las CMPCs se disociaron en células individuales y sembraron en los pocillos de una placa de 96 pocillos recubiertos con gelatina a una densidad de 0.5 células por pocillo en medio de cultivo.

Ejemplo 2: Diferenciación de las hCMPCs

Para inducir la diferenciación, las células se trataron con 5µM de 5'-azacitidina (Sigma) durante 72 horas en medio de diferenciación (Medio Dulbecco Modificado de Iscove/HamsF12 (1:1) (Gibco)) suplementado con L-Glutamina (Gibco), 2% suero de caballo, aminoácidos no esenciales, suplemento de Insulina-Transferrina-Selenio y 10⁻⁴ M Ácido Ascórbico (Sigma)). Después de la inducción, el medio se cambió cada 3 días.

Para el tratamiento de TGFβ, las CMPCs se cultivaron en medio de diferenciación, se estimularon con 5 µM de 5'-azacitidina (Sigma) y 1 ng/ml de TGFβ1 (Sigma) se añadió 24 horas más tarde. El medio se cambió cada 3 días.

Ejemplo 3: Aislamiento de ARN y PCR con transcripción inversa

Se aisló el ARN usando Trizol (Invitrogen, Breda, Países Bajos) y se transcribió a la inversa usando oligo-dT Superscript 3 (Invitrogen). Las secuencias de los cebadores se dan en la tabla 1. Las reacciones de PCR comenzaron con 2 min a 94 ° C seguido por 35 ciclos de: 15 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 45 s a 72 °C. Se analizaron los productos en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. β-tubulina o β-actina se usaron como control de entrada de ARN.

Tabla 1

Gen	Cebadores	Tamaño
MEF2C	5'-agataccacacaacacaccacgcgcc-3'	192
	5'-atccttcacagagtcgcatgcgctt-3'	
Isl-1	5'-taagccaccgtcgtgtctc-3'	107
	5'-tgatgaagcaactccagcag-3'	
GATA-4	5'-gacaatctggttaggggaagc-3'	105
	5'-accagcagcagcagaggagat-3'	
NKX2.5	5'-cgccgctccagttcatag-3'	111
	5'-ggtggagctggagaagacaga-3'	
MLC2V	5'-gtcaatgaagccatccctgt-3'	101
	5'-gcgccaactccaacgtgttct-3'	
TropT	5'-gtgggaagaggcagactgag-3'	131
	5'-atagatgctctgccacagc-3'	
bMyHC	5'-gaagcccagcacatcaaaag-3'	118
	5'-gatcaccaacaaccctacg-3'	
cActin	5'-tcctgatgcgcattttattc-3'	123
	5'-aacaccactgctctagccacg-3'	
Desmin	5'-acctgctcaacgtgaagatg-3'	159
	5'-tggtatggacctcagaacc-3'	

Gen	Cebadores	Tamaño
MyoD	5'-cggcggcggaactgctacgaa-3'	458
	5'-ggggcggggcggaactt-3'	
c-kit	5'-aagtggatggcacctgaaag-3'	138
	5'-gaacttagaatcgaccggca-3'	
Cx40	5'-gagaagaagcagccagagtgtgaa-3'	651
	5'-GACATGCAGGGTGGTCAGGAAGATT-3'	
Cx43	5'-agcgtgaggaaagtaccaaacagc-3'	666
	5'-AAGAAGGCCACCTCAAAGATAGAC-3'	
Cx45	5'-ctagaccactgaaaagacc-3'	494
	5'-TGATTTGCTACTGGCAGTGC-3'	

Ejemplo 4: Análisis de citometría de flujo

Las CMPCs se usaron ya sea recién aisladas o como células tripsinizadas después del cultivo. Se usó 200.000 células por muestra para el análisis FACS. Las células se lavaron dos veces en amortiguador de lavado (wb: 1% FCS/PBS/0.05M de azida) y se resuspendieron en 100 µl de wb que contiene 0.5% de anticuerpo. Los anticuerpos usados para el análisis FACS fueron anticuerpos conjugados con FITC o PE frente a CD31, CD34, CD105 (Endoglina), CD117 (c-kit), Sca1, y control de isotipo IgG, todos de Pharmingen BD. Las células se incubaron en hielo en la oscuridad durante 30 minutos, se lavaron 4 veces con wb frío, se resuspendieron en 250 µl de wb y analizaron usando un Beckman Coulter Cytomics FC500 FACS.

Ejemplo 5: Inmunohistoquímica en las células cultivadas.

Los cubreobjetos con las células cultivadas se lavaron en medio libre de suero, se fijaron en metanol (-20 °C) o 4% de paraformaldehído, se lavaron con PBS y permeabilizaron con 0.2% de Tritón X-100/PBS. La unión no específica de los anticuerpos se bloqueó con 2% de albúmina de suero bovino (BSA). La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche en PBS/10% de suero de carnero normal (NGS). Los anticuerpos usados reconocieron GATA-4 (Santa Cruz), Islets-1 (Banco de Hibridoma), Cx40 (Chemicon), Cx43 (Zymed), Cx45 (amablemente proporcionado por el Dr. TH Steinberg, Universidad de Washington, St. Louis, Estados Unidos), α-actinina (Sigma), Troponina I (Chemicon) desmina (Sanbio), titina (Sigma), MLC2v (Alexis), β-MHC (amablemente proporcionado por el Dr. A.F.M. Moorman, AMC Amsterdam, Países Bajos), N-cadherina (Sigma) y ZO-1 (Zymed). El inmunomarcaje se realizó usando anticuerpos secundarios conjugados con Rojo Texas (TR) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Laboratorios Jackson). Todas las etapas de incubación se realizaron a temperatura ambiente y entre todas las etapas de incubación, las células se lavaron con PBS. Por último, se montaron los cubreobjetos en Vectashield (Laboratorios Vector) y se examinaron con un microscopio óptico Nikon Optiphot-2 equipado para epifluorescencia.

Ejemplo 6: Análisis de membrana de Western

El análisis de membrana de Western se realizó como se ha descrito previamente³⁵. La detección fue por ECL (Amersham). Los anticuerpos policlonales de conejo pSmad1 y pSmad2 que reconocen específicamente Smad1/5 o Smad2 fosforilados respectivamente se usaron 1:1000 (Señalización Celular), 1:500 policlonal de conejo Nkx2.5 (Santa Cruz), y 1:5000 monoclonal de ratón α-actinina (Sigma). La detección de β-actina (1:10000, Chemicon) se usó como un control de la carga.

Ejemplo 7: Electrofisiología

Una configuración simétrica con dos amplificadores de fijación de membrana HEKA EPC-7 se usó para medir los potenciales de acción y el acoplamiento eléctrico entre las células. La configuración simétrica de electrofisiología A con dos amplificadores de fijación de membrana HEKA EPC-7 se usó para medir los potenciales de acción y acoplamiento eléctrico entre las células. Todas las señales se registraron usando un programa de adquisición de datos personalizados (amablemente proporcionado por el Dr. JG Zegers, AMC Amsterdam, Países Bajos) que se ejecuta en una computadora Apple Macintosh equipada con una tarjeta de adquisición de 12 bits de National Instruments PCI-MIO-16E 4. Las señales de corriente se filtraron paso bajo a 2.5 kHz y adquirieron a 10 kHz. La formación de imágenes de calcio

combinado con el registro del potencial de acción se realizó usando un sistema de imágenes de Investigación Cairn y un amplificador Axopatch 200B. Todos los experimentos se realizaron usando toda la configuración de fijación de membrana celular. Los parámetros del potencial de acción medidos a partir de los registros de la fijación de corriente fueron el potencial diastólico máximo, velocidad máxima de despolarización, duración del potencial de acción en 50 y 90 porcentaje de la repolarización (APD50 y APD90).

La conductancia macroscópica de la unión de hendidura en los pares de células se midió en un potencial de mantenimiento de -50 mV usando un protocolo de fijación de voltaje que incluía 50 ms de pulsos cuadrados con una amplitud de +10 mV y -10mV, seguido por un 1 segundo de pulso cuadrado con intervalo entre -50 y +50 mV. La conductancia de la unión de hendidura (gj) se define como $gj = I_j / V_j$, donde I_j y V_j denota corriente de unión y voltaje de la unión, respectivamente. Usando los pequeños prepulsos para este cálculo, las conductancias de unión de la hendidura fueron máximos y no inactivantes. El análisis fuera de línea se hizo usando MacDaq 8.0 (amablemente proporcionado por el Dr. A.C.G. van Ginneken, AMC Amsterdam, Países Bajos) y R 2.0.1 (R Development Core Team, 2005).

Los experimentos se realizaron a 20 °C o, para imágenes de calcio, a 37 °C. Para imágenes de calcio, las células se cargaron con 10 μM de Fluo-3 AM durante 25 minutos a 37 °C. El amortiguador extracelular que se usó en todos los casos fue una solución de Tyrode modificada, que contiene (en mmol/L) NaCl 140, KCl 5.4, CaCl2 1.8, MgCl2 1, HEPES 15, NaHCO3 35, glucosa 6, pH 7.20/NaOH.

Los potenciales de acción se registraron usando una solución de la pipeta que contiene (en mmol/L) KCl 130, NaCl 10, HEPES 10, MgATP 5, MgCl2 0.5, pH 7.20/KOH. El amortiguador de la pipeta que se usó para las mediciones de conductancia contuvo (en mmol/L) gluconato de potasio 125, KCl 10, HEPES 5, EGTA 5, MgCl2 2, CaCl2 0.6, Na2ATP 4, pH 7.20/KOH. Para la inyección de colorante, los microelectrodos se llenaron con 4% p/v de Amarillo Lucifer en 150 mM de LiCl2 ,10 mM de HEPES y las células se inyectaron durante 2 minutos. Las células teñidas con Amarillo Lucifer se contaron, excluyendo la célula inyectada. Las pipetas de fijación se tomaron en un extractor Narishige PC-10 y pulieron al fuego. Cuando se llena con amortiguador de pipeta, la resistencia de la pipeta osciló entre 2-5 MΩ. Los potenciales de unión líquida se calcularon usando Clampex (Axon Instruments) y se usaron para la corrección fuera de línea.

Ejemplo 8: Perfiles de microarreglos de los genes expresados en las CMPCs.

Se aisló el ARN de CMPCs indiferenciadas y diferenciadas. 500ng de ARN y ARNc se hizo siguiendo el protocolo ilumina estándar (estuche de amplificación de ARN illumina, Ambion cat # I1755. Se usó fichas illumina Sentrix® HumanRef-8 Expresión BeadChip cat # BD-25-201, y la hibridación se produjo a 55 grados Celsius.

Los genes listados en la siguiente Tabla 3 se expresan en las CMCPs cuando se miden con el perfil génico por microarreglo como se indicó anteriormente.

Tabla 3

Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
ZNF22	NM_006963.1	PTGDS	NM_000954.5	THBS2	NM_003247.2
MYLK	NM_053031.1	KIAA2028	NM_172069.1	COP	NM_052889.1
ADH1B	NM_000668.3	TNFRSF1B	NM_001066.2	BDNF	NM_170734.2
LOC255189	XM_172929.3	PODN	NM_153703.3		NM_015345.2
PTGS1	NM_080591.1	LOC401151	XM_379274.1	THBS1	NM_003246.2
DDX3Y	NM_004660.2	P8	NM_012385.1	AFAP	NM_021638.3
FLJ23403	NM_022068.1	GAS6	NM_000820.1	LOC56901	NM_020142.3
INHBA	NM_002192.1	ACTG2	NM_001615.2	MGP	NM_000900.1
ADH1C	NM_000669.2	CDKN2B	NM_004936.2	NME4	NM_005009.2
C14orf141	NM_032035.1	CYP1B1	NM_000104.2	LOC375763	XM_353489.1
MAOA	NM_000240.2	MGLL	NM_007283.4	NFIC	NM_005597.2
DHRS9	NM_005771.3	SRPUL	NM_014467.1	C20orf97	NM_021158.3
COL8A1	NM_020351.2	LTBP2	NM_000428.1	ANGPTL4	NM_016109.2
EFEMP1	NM_018894.1	LOC400610	XM_375478.1	LOC51063	NM_015916.3

ES 2 531 535 T3

5	FLJ31166	NM_153022.1	CaMKIIAlpha	NM_018584.4	LOC375351	XM_351558.1
	PLSCR4	NM_020353.1	PEG3	NM_006210.1	FLJ10948	NM_018281.1
	ADH1A	NM_000667.2	C20orf100	NM_032883.1	GDF5	NM_000557.2
10	KIAA1199	NM_018689.1	FLJ32389	NM_144617.1	ABCA8	NM_007168.2
	CASP4	NM_001225.2	TNFAIP6	NM_007115.2	FBLN5	NM_006329.2
	C7	NM_000587.2	MGC33637	NM_152596.2	DF	NM_001928.2
	CTSF	NM_003793.2	MFAP4	NM_002404.1	CHI3L1	NM_001276.1
15	BF	NM_001710.3	CTHRC1	NM_138455.2	C3	NM_000064.1
	QSCN6	NM_002826.2	OLR1	NM_002543.2	C8orf13	NM_053279.1
	PSMD5	NM_005047.2	CYBRD1	NM_024843.2	TRIM4	NM_033091.1
20	BTEB1	NM_001206.1	SPAG4	NM_003116.1	AMSH-LP	NM_020799.1
	SERPINA3	NM_001085.2	LRRC17	NM_005824.1	TNFRSF11B	NM_002546.2
	RUNX1	NM_001754.2	FBN1	NM_000138.2	LOC125476	NM_194281.1
	UBE1 L	NM_003335.2	ADAMTS5	NM_007038.1	TCF21	NM_198392.1
25	C1S	NM_001734.2	STARD5	NM_030574.2	MAP3K5	NM_005923.3
			A2M	NM_000014.3	CDKN1A	NM_000389.2
30	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
	FLJ20073	NM_017654.2	ICAM5	NM_003259.2	MGC17330	NM_052880.2
	KIAA0779	NM_015008.1	TBX2	NM_005994.3	SPOCK	NM_004598.2
	PPARG	NM_005037.3	CALD1	NM_033138.2	FLJ20254	NM_017727.2
35	LAMB2	NM_002292.2	IGFBP4	NM_001552.1	KLHL5	NM_199039.1
	LOC375758	XM_353487.1	TM4SF1	NM_014220.1	C1orf24	NM_052966.1
	SERPINF1	NM_002615.3	CEBPB	NM_005194.2	7h3	NM_033025.4
	HNMT	NM_006895.1	PP3856	NM_145201.3	MT2A	NM_005953.2
40	LOC400718	XM_375656.1	EVC	NM_014556.2	TCIRG1	NM_006053.2
	FAM20C	NM_020223.1	LOC375843	XM_293449.2	PLXND1	NM_015103.1
	ALS2CR3	NM_015049.1	NR2F1	NM_005654.3	DKFZP566K1924	NM_015463.1
45	TRIM22	NM_006074.2	LTBR	NM_002342.1	C1RL	NM_016546.1
	PSCD3	NM_004227.3	SELM	NM_080430.1	TCF21	NM_003206.2
	PPIL3	NM_032472.3	PLAU	NM_002658.1	MXI1	NM_130439.1
	TNIP2	NM_024309.2	MRF2	XM_084482.3	G1P3	NM_002038.2
50	LOC143903	NM_178834.2	TIMP1	NM_003254.1	B4GALT1	NM_001497.2
	IFI16	NM_005531.1	PP1201	NM_022152.3	pp9099	NM_025201.3
	ARC	NM_015193.2	LTBP3	NM_021070.2	LOC401428	XM_376715.1
	CPR8	NM_020739.1	CSRP1	NM_004078.1	CAV1	NM_001753.3
55	TNFRSF1A	NM_001065.2	LOC285148	XM_209490.3	HLA-G	NM_002127.3
	RFX4	NM_002920.3	IFITM3	NM_021034.1	TNFRSF21	NM_014452.3
	CKLFSF3	NM_144601.2	VIP32	NM_021732.1	AREG	NM_001657.2
	CDKN2A	NM_058196.1	ASS	NM_000050.2	VCAM1	NM_080682.1
60	NBL1	NM_005380.3	TORC3	NM_022769.1	PMP22	NM_153322.1
	DDR2	NM_006182.1	BZRP	NM_007311.2	PML	NM_033238.1
	RECK	NM_021111.1	C1orf24	NM_022083.1	TACC1	NM_006283.1

ES 2 531 535 T3

5	LOC400810	XM_375850.1	SLC9A3R2	NM_004785.1	LOC388815	XM_373927.1
	FSTL3	NM_005860.1	G0S2	NM_015714.2	PALM	NM_002579.1
	SIL1	NM_022464.3	RAB5C	NM_201434.1	SPINLW1	NM_020398.2
	COL16A1	NM_001856.2	KIAA1838	NM_032448.1	Spc25	NM_020675.3
10	S100A6	NM_014624.2	LGALS8	NM_006499.3	RCN3	NM_020650.2

	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
15	TNKS1BP1	NM_033396.1	KRTHB4	NM_033045.2	LRP1	NM_002332.1
	TM4SF7	NM_003271.3	IGFBP7	NM_001553.1	KIAA2002	XM_370878.1
	LOC154165	XM_087859.4	PTGIS	NM_000961.2	H2AFJ	NM_177925.1
20	TPRA40	NM_016372.1	ARHGEF6	NM_004840.1	ANGPTL2	NM_012098.2
	HLA-C	NM_002117.3	LOC253013	XM_171892.1	FHL1	NM_001449.3
	AK3L1	NM_016282.2	FLJ23235	NM_024943.1	DFNA5	NM_004403.1
25	SEC14L1	NM_003003.1	TBX6	NM_080758.1	GABARAPL1	NM_031412.1
	COPZ2	NM_016429.1	FLOT1	NM_005803.2	ARH	NM_015627.1
	C1QTNF5	NM_015645.1	SRGAP1	NM_020762.1	PDGFRL	NM_006207.1
	HLA-DMA	NM_006120.2	RASD2	NM_014310.3	PCOLCE	NM_002593.2
30	CTEN	NM_032865.3	MAN2B1	NM_000528.1	XBP1	NM_005080.2
	MGC15429	NM_032750.1	STAT1	NM_139266.1	SRPX	NM_006307.2
	EMP1	NM_001423.1	LOC201895	NM_174921.1	ACTN1	NM_001102.2
35	LOC388121	XM_370864.1	COL6A1	NM_001848.1	GYPC	NM_016815.2
	C20orf140	NM_144628.1	SCARF2	NM_182895.1	GNPTAG	NM_032520.3
	COL1A1	NM_000088.2	TFPI	NM_006287.3	KIAA0233	NM_014745.1
40	STAT2	NM_005419.2	P4HA2	NM_004199.1	NEDL2	XM_038999.2
	DPP4	NM_001935.2	FLJ21347	NM_022827.2	DKFZP586H2123	NM_015430.1
	ACHE	NM_000665.2	FBXO32	NM_148177.1	SLC7A5	NM_003486.4
45	LOC 124842	XM_064333.4	ANTXR1	NM_032208.1	ZNF226	NM_015919.2
	ETFDH	NM_004453.1	MMP23B	NM_006983.1	LOC400741	XM_378841.1
	LHX3	NM_178138.2	HIPK2	NM_022740.1	SARS	NM_006513.2
	PGCP	NM_016134.2	FLJ36525	NM_182774.1	CAV2	NM_198212.1
50	RAB32	NM_006834.2	RAI14	NM_015577.1	STK17A	NM_004760.1
	KIAA0562	NM_014704.1	B2M	NM_004048.2	HIST1 H2AH	NM_080596.1
	Axl	NM_001699.3	CYB5R1	NM_016243.1	DCN	NM_133507.1
	LOC114990	NM_138440.1	MYH11	NM_002474.1	FOXF2	NM_001452.1
55	P5326	NM_031450.2	NEK6	NM_014397.3	PRO1914	NM_014106.1
	LOC375531	XM_353406.1	SOD3	NM_003102.1	LOC375662	XM_351780.1
	BACE2	NM_138992.1	MOCOS	NM_017947.1	NDRG1	NM_006096.2
60						

ES 2 531 535 T3

	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
5	FTL	NM_000146.2	POU2F2	NM_002698.1	LOC375528	XM_351672.1
	IFI35	NM_005533.2	TNFSF13	NM_172089.1	RPS4Y2	NM_138963.1
	FLJ14800	NM_032840.1	KIAA1944	XM_062545.5	MKNK2	NM_017572.2
	BRODL	NM_153252.2	CCND1	NM_053056.1	FLJ10460	NM_018097.1
10	MED8	NM_201542.1	SAT	NM_002970.1	TNN	XM_040527.5
	WDR10	NM_052990.1	PHTF2	NM_020432.2	LEMD2	NM_181336.2
	RYR1	NM_000540.1	NOD9	NM_170722.1	FLJ22374	NM_032222.1
	MTND5	NM_173713.1	SIAT7D	NM_175039.1	PRRG1	NM_000950.1
15	SMARCD2	NM_003077.2	ARNT	NM_178426.1	SEC22L2	NM_012430.2
	SNTB2	NM_130845.1	AKR1C1	NM_001353.4	LOC376156	XM_352094.1
	SAA4	NM_006512.1	TMSL1	NM_182792.1	CYGB	NM_134268.3
20	RAP2B	NM_002886.2	LOC138649	XM_059987.6	LOC374662	XM_353096.1
	PPFIA4	XM_046751.4	STXBP1	NM_003165.1	LOC390690	XM_372617.1
	LGALS12	NM_033101.2	MMP2	NM_004530.1	CABP2	NM_031204.1
	KCNK2	NM_014217.1	FLJ14249	NM_106552.1	LOC400587	XM_375426.1
25	MGC40069	NM_182615.1	TIMP2	NM_003255.2	LOC400930	XM_376019.1
	GAB2	NM_080491.1	TRIM44	NM_017583.3	LOC149345	XM_086502.8
	S100A11	NM_005620.1	KIAA0545	XM_032278.8	TM4SF9	NM_005723.2
30	PLOD	NM_000302.2	F8	NM_019863.1	PTPNS1	NM_080792.1
	NNAT	NM_181689.1	ANXA11	NM_001157.2	MGC13005	NM_032685.2
	LMNA	NM_005572.2	MGC32065	NM_153271.1	MICAL3	XM_032997.4
	SCRN1	NM_014766.2	DKFZP564O0823	NM_015393.1	HIF1A	NM_181054.1
35	SUMF1	NM_182760.2	KIAA1190	NM_145166.2	LMCD1	NM_014583.2
	CD97	NM_001784.2	AEBP1	NM_001129.2	HMGCL	NM_000191.1
	ARHE	NM_005168.2	KIAA0934	NM_014974.1	GLG1	NM_012201.1
40	LOC283111	XM_210181.4	LOC127545	XM_060535.1	FLJ90024	NM_153342.1
	RNPEPL1	NM_018226.2	COL5A2	NM_000393.2	SULF2	NM_198596.1
	HSPA12A	XM_048898.5	HT008	NM_018469.3	LOC51334	NM_016644.1
45	LTC4S	NM_145867.1	LOC286177	XM_379582.1	CREB5	NM_004904.1
	SLC2A10	NM_030777.3	FLJ20920	NM_025149.2	MRVLDC1	NM_031484.1

	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
50	PDGFC	NM_016205.1	RAFTLIN	NM_015150.1	PRO0149	NM_014117.2
	HS3ST3A1	NM_006042.1	SIGLEC8	NM_014442.1	ADRB2	NM_000024.3
	CRAT	NM_144782.1	SDC4	NM_002999.2	PTPNS1L2	NM_178460.1
55	ZSIG11	NM_015926.3	TAZ	NM_181314.1	APG10L	NM_031482.3
	01. Nov	NM_144663.1	ARHC	NM_175744.3	LOC126167	XM_058997.5
	GRINL1A	NM_015532.2	LOC285919	XM_212094.1	SLC1A5	NM_005628.1
	KRTHA8	NM_006771.3	FLJ25224	NM_182495.3	SEMA4C	NM_017789.3
60	LAMB1	NM_002291.1	LOC391403	XM_372940.1	FLJ23221	NM_024579.1

ES 2 531 535 T3

	MAP3K6	NM_145319.1	DP1	NM_005669.3	BTBD6	NM_033271.1
	SLC9A1	NM_003047.2	NINJ1	NM_004148.2	DIPA	NM_006848.1
5	ABHD4	NM_022060.1	LOXL3	NM_032603.2	HSPB1	NM_001540.2
	FLJ21977	NM_032213.3	SLB	XM_114272.2	MGC44287	NM_182607.2
	SPARC	NM_003118.1	GRM4	NM_000841.1	KIFC3	NM_005550.2
	EPB41	NM_004437.1	DKFZP564C103	NM_015654.3	DSCAML1	NM_020693.2
10	MVP	NM_005115.3	ACTL6	NM_016188.3	U2AF1L3	NM_144987.1
	DHX8	NM_004941.1	CGI-79	NM_016024.1	KIAA1944	NM_133448.1
	CTDSP1	NM_182642.1	CCL14	NM_032963.2	AD-020	NM_020141.2
15	ARHGEF2	NM_004723.2	HAGHL	NM_032304.1	CTSL	NM_145918.1
	LOC374402	XM_353011.1	CDC42EP1	NM_007061.3	SERPINB6	NM_004568.4
	MGC3200	NM_032305.1	DSCR1	NM_004414.5	SLC9A8	XM_030524.3
	TULP3	NM_003324.3	FLJ10647	NM_018166.1	NDST2	NM_003635.2
20	SLC35A1	NM_006416.2	RNF123	NM_022064.2	MFGE8	NM_005928.1
	SF3B3	NM_012426.2	FLJ40113	NM_198079.1	PEA15	NM_003768.2
	RDH5	NM_002905.1	CPA1 .	NM_001868.1	LRP5	NM_002335.1
25	CISH	NM_145071.1	TANK	NM_004180.2	NMNAT1	NM_022787.2
	FSTL1	NM_007085.3	C6orf29	NM_032794.1	ERO1L	NM_014584.1
	LOC375172	XM_351416.1	NAP1 L5	NM_153757.1	ABCC13	NM_172024.1
30	TMSL4	NM_182794.1	C7orf10	NM_024728.1	CBS	NM_000071.1
	BMP1	NM_006129.2	FXYD7	NM_022006.1	ACATE2	NM_012332.1
	TUBG2	NM_016437.1	NARF	NM_031968.1	FLJ32001	NM_152609.1
35						
	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
	QTRTD1	NM_024638.2	FLJ32675	NM_173811.2	BLVRB	NM_000713.1
	HECA	NM_016217.1	GRLF1	NM_004491.2	KDR	NM_002253.1
40	HCCA2	NM_053005.2	TAGLN	NM_003186.2	PHLDA1	NM_007350.1
	HIST1H2BK	NM_080593.1	FLJ20522	NM_017861.1	CTSZ	NM_001336.2
	PLEKHC1	NM_006832.1	FLJ10916	NM_018271.2	RIN2	NM_018993.2
45	KIAA1205	XM_046305.3	RASSF1	NM_170712.1	FBLN1	NM_001996.2
	EXT1	NM_000127.1	HIST1 H2BD	NM_138720.1	KIAA1600	XM_049351.3
	RHOBTB3	NM_014899.2	LOC402176	XM_377841.1	SLC35B3	NM_015948.2
	MAS1	NM_002377.2	MPG	NM_002434.1	CDH11	NM_001797.2
50	DXS9928E	NM_004699.1	ZNF33A	NM_006974.1	ASC	NM_145183.1
	PILRA	NM_178273.1	PKD1L2	NM_182740.1	RSU1	NM_152724.2
	ATF5	NM_012068.2	GLS	NM_014905.2	PTD015	NM_024684.2
55	DKFZp779M0652	XM_374877.1	SLC39A4	NM_130849.1	IER3	NM_003897.2
	PLOD2	NM_000935.1	FLJ 13352	NM_024592.1	MGC29891	NM_144618.1
	LOC377887	XM_352835.1	SE20-4	NM_022117.1	FREQ	NM_014286.2
	SLC22A2	NM_003058.2	BCL2L2	NM_004050.2	CLK3	NM_001292.1
60	NFKB1	NM_003998.2	RAD51L1	NM_133510.1	MGC10812	NM_031425.1

ES 2 531 535 T3

5	FLJ20542	NM_017871.3	CALCRL	NM_005795.2	PJA2	NM_014819.2
	MGC9850	NM_152705.1	FMOD	NM_002023.2	RAB24	NM_130781.1
	UBXD2	NM_014607.2	RABGGTA	NM_182836.1	CREBL2	NM_001310.2
	SH3YL1	NM_015677.1	GFOD1	NM_018988.1	LOC162427	NM_178126.2
	SMOX	NM_175841.1	SIAT6	NM_174970.1	ZNF339	NM_021220.1
10	KIAA1033	XM_035313.6	MT1J	NM_175622.2	MGC14817	NM_032338.2
	MDGA1	NM_153487.2	LOC255374	XM_171171.2	COL5A1	NM_000093.2
	GADD45B	NM_015675.1	BCL2L12	NM_138639.1	LOC401082	XM_376257.1
15	LZTS2	NM_032429.1	FIBCD1	NM_032843.3	SH3BGRL3	NM_031286.2
	TNFRSF19	NM_148957.2	CALR	NM_004343.2	ATP10D	NM_020453.2
	STEAP	NM_012449.2	LZTR1	NM_006767.1	CD151	NM_139030.2
20	THBS3	NM_007112.3	SLC7A11	NM_014331.2	MGC33867	NM_138346.1

	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
25	FLJ21673	NM_030898.2	STX1A	NM_004603.1	GNB5	NM_006578.2
	NDEL1	NM_030808.2	ACTR1A	NM_005736.2	RNF24	NM_007219.2
	FLJ21174	NM_024863.3	EPN2	NM_148921.2	LOC125704	XM_058931.6
	MGC15482	NM_032875.1	OPRS1	NM_147158.1	LIPT1	NM_145198.1
30	FLJ10375	NM_018075.2	HAP1	NM_177977.1	KIAA0759	NM_015305.2
	CPSF2	NM_017437.1	DIAPH2	NM_006729.2	FAD104	NM_022763.2
	DKFZP566E144	NM_015523.1	MAP4K1	NM_007181.3	ARPC5	NM_005717.2
35	FLJ23614	NM_152695.2	CD99L2	NM_031462.1	C6orf37	NM_017633.1
	LOC51315	NM_016618.1	SLC25A28	NM_031212.2	FLJ23042	NM_025157.2
	SHCBP1	NM_024745.2	TBL1X	NM_005647.2	CNOT2	NM_014515.1
	P24B	NM_007364.1	ZHX1	NM_007222.2	LAIR1	NM_021708.1
40	TRIM11	NM_145214.2	SIAT1	NM_003032.2	USF2	NM_003367.1
	ARD1	NM_003491.2	FLJ11273	NM_018374.2	HSGP25L2G	NM_017510.3
	LOC55831	NM_018447.1	KIAA0376	XM_037759.5	MSRB	NM_012228.2
45	BNIP3L	NM_004331.1	CCL21	NM_002989.2	OATL1	XM_047025.6
	FLI1	NM_002017.2	CGI-128	NM_016062.1	ITCH	NM_031483.3
	DKFZP434P1750	NM_015527.2	PAX7	NM_013945.1	DXS1283E	XM_047871.6
50	OAS1	NM_002534.1	APG7L	NM_006395.1	HGS	NM_004712.3
	ADAM17	NM_021832.1	C20orf98	NM_024958.1	C20orf172	NM_024918.2
	MUC3B	XM_168578.3	SDSL	NM_138432.2	CYLN2	NM_032421.1
	DOCK11	NM_144658.2	PFKL	NM_002626.2	PP1665	NM_030792.4
55	SCARB2	NM_005506.2	NUCB2	NM_005013.1	C10orf13	NM_152429.2
	CDIPT	NM_006319.2	RTN4	NM_007008.1	LOC92305	NM_138385.1
	DEPDC2	NM_025170.2	IGF2R	NM_000876.1	FBLP-1	NM_017556.1
60	KPNA6	NM_012316.3	FIBL-6	NM_031935.1	STK3	NM_006281.1
	FAT	NM_005245.1	PFAAP5	NM_014887.1	UBN1	NM_016936.2

ES 2 531 535 T3

FLJ12606	NM_024804.1	CDC10	NM_001788.2	LOC376138	XM_352084.1
SERPINE2	NM_006216.2	OGFR	NM_007346.2	AGPAT1	NM_032741.3
TRIM8	NM_030912.1	DSTN	NM_006870.2	SMAP-1	NM_017979.1
KIAA0769	No_014824.1	TTC17	NM_018259.3	B4GALT2	NM_003780.2

Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
UBXD1	NM_025241.1	STX5A	NM_003164.2	IKBKB	NM_001556.1
CDK5RAP2	NM_018249.3	LOC389562	XM_374236.1	GLCE	XM_290631.2
TRIM47	NM_033452.1	STK4	NM_006282.2	CD63	NM_001780.3
KLK3	NM_145864.1	PPP1R12C	NM_017607.1	FLJ34443	NM_175918.2
RAB3IL1	NM_013401.2	DHRS4	NM_021004.2	CSG1cA-T	XM_379974.1
DHX34	NM_014681.3	PHC2	NM_004427.2	TTC13	NM_024525.2
KIAA1841	XM_087056.4	C6orf72	NM_138785.1	VAMP5	NM_006634.2
IPLA2(GAMMA)	XM_291241.3	ANKRD13	NM_033121.1	RAC1	NM_006908.3
TNFRSF6B	NM_003823.2	LOC339665	XM_290973.1	FLJ11280	NM_018379.2
FLJ10415	NM_018089.1	DDX24	NM_020414.3	SMARCD3	NM_003078.2
MGC19764	XM_371039.2	MGC955	NM_024097.1	FLJ32205	NM_152561.1
FARP1	NM_005766.1	C20orf194	XM_045421.2	GMPPA	NM_013335.2
GPR1	NM_005279.2	SP140	NM_007237.2	FST	NM_013409.1
FLJ25402	NM_152567.1	SIRPB1	NM_006065.1	ZNF16	NM_006958.2
LOC134478	XM_068864.5	APOBEC3A	NM_145699.2	GCC1	NM_024523.5
SHMT2	NM_005412.3	CST3	NM_000099.2	GNA11	NM_002067.1
TNFSF15	NM_005118.2	OSBPL8	NM_020841.3	KIAA0256	NM_014701.1
TOM1	NM_005488.1	TMSL2	NM_182793.1	MAP3K3	NM_002401.3
ZCWCC2	NM_024657.2	VPS16	NM_080414.1	MKLN1	NM_013255.2
SELB	NM_021937.2	PKD2	NM_000297.2	PPP5C	NM_006247.2
MGC2749	NM_024069.2	LOC391023	XM_372773.1	GSN	NM_198252.1
SLC39A3	NM_144564.3	RGL1	NM_015149.2	RPL39	NM_001000.2
C20orf149	NM_024299.2	SART2	NM_013352.1	MGC32020	NM_152266.1
SLC17A5	NM_012434.3	SLC35A4	NM_080670.2	LOC389359	XM_374156.1
ALG3	NM_005787.3	EPS15L1	NM_021235.1	BLZF1	NM_003666.2
HNRPD	NM_005463.2	ZNF554	NM_152303.1	SRPR	NM_003139.2
JM5	NM_007075.1	MYO1B	NM_012223.2	FLJ 12221	XM_031342.1
SLC43A3	NM_017611.2	FLNB	NM_001457.1	LOC389445	XM_371857.2
KIAA0543	XM_379967.1	PRICKLE2	NM_198859.1	CNN2	NM_004368.2
DPYSL2	NM_001386.3	AKAP2	NM_147150.1	CGI-30	NM_015958.1

ES 2 531 535 T3

	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
	MGC4549	NM_032377.2	MGC19604	NM_080665.3	CTNS	NM_004937.1
5	GSTT1	NM_000853.1	TP53AP1	NM_007233.1	C5orf4	NM_016348.1
	PHLDA2	NM_003311.2	SIAT4A	NM_173344.1	MPZL1	NM_003953.3
	LOC400320	XM_375163.1	CPSF1	NM_013291.1	DKFZP434J154	NM_016003.1
	EPB49	NM_001978.1	CBLN1	NM_004352.1	PTD008	NM_016145.1
10	FHL2	NM_001450.3	MBTD1	NM_017643.1	CALM2	NM_001743.3
	CBX6	NM_014292.2	SARA1	NM_020150.3	FLJ22679	NM_032227.1
	PELO	NM_015946.4	SIN3B	XM_050561.7	KRTCAP2	NM_173852.2
15	MGC50836	XM_171060.4	CALU	NM_001219.2	LOC399768	XM_378228.1
	OCSP	NM_031945.2	LOC92912	NM_173469.1	C14orf24	NM_173607.2
	KIAA0802	XM_031357.5	BIRC2	NM_001166.3	FLJ46603	NM_198530.1
	MPPE1	NM_138608.1	IMPA2	NM_014214.1	DUSP6	NM_022652.2
20	LOC339352	XM_294910.1	MIPEP	NM_005932.1	FLJ31295	NM_152320.1
	BMPR2	NM_033346.2	FBN2	NM_001999.2	FLJ00060	NM_033206.1
	CYP4F3	NM_000896.1	PKD1-like	NM_024874.3	RAI	NM_006663.1
25	WSB2	NM_018639.3	LOC389816	XM_372161.1	ZDHHC18	NM_032283.1
	CHST1	NM_003654.2	LOC374723	XM_351066.1	TMSL6	NM_181428.1
	PLSCR3	NM_020360.2	KIAA0121	XM_052386.3	APG12L	NM_004707.2
	TM4SF10	NM_031442.2	C15orf17	NM_020447.2	ATP6V1F	NM_004231.2
30	FXDY5	NM_014164.3	CTNND1	NM_001331.1	LOC402694	XM_380042.1
	BBS1	NM_024649.4	FLJ22329	NM_024656.2	ZFYVE21	NM_024071.2
	NDUFS7	NM_024407.3	MYL5	NM_002477.1	KIAA1223	XM_048747.8
35	EIF4EBP1	NM_004095.2	GMPPB	NM_021971.1	AHR	NM_001621.2
	MGST1	NM_145792.1	IKBKG	NM_003639.2	FLJ14360	NM_032775.2
	KIAA0103	NM_014673.2	LOC375378	XM_353337.1	IL18	NM_001562.2
40	C20orf30	NM_014145.3	SMBP	NM_020123.2	PRIC285	NM_033405.2
	GPR10	NM_004248.1	CDKN1B	NM_004064.2	SH2D3C	NM_170600.1
	SCAM-1	NM_005775.2	LOC375406	XM_351591.1	ACO1	NM_002197.1
	EIF3S10	NM_003750.1	LOC253982	NM_181718.3	ZNF323	NM_145909.1
45	C14orf123	NM_014169.2	LOC390066	XM_372359.1	RAP1A	NM_002884.1
	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
50	LOC389789	XM_372140.2	PCBP3	NM_020528.1	ZNF145	NM_006006.3
	AGA	NM_000027.2	COMT	NM_007310.1	ECM1	NM_022664.1
	DKFZp761D221	NM_032291.1	FAP	NM_004460.2	SSX5	NM_175723.1
	H2AFJ	NM_177925.1	EMILIN1	NM_007046.1	CD44	NM_000610.2
55	SQRDL	NM_021199.1	IFITM2	NM_006435.1	NS3TP2	NM_023927.1
	MOXD1	NM_015529.1	ANGPT1	NM_001146.3	RPS4Y	NM_001008.2
	FLJ30681	NM_133459.1	BRIP1	NM_032043.1	TIMP3	NM_000362.3
60	ZNF345	NM_003419.2	SYTL2	NM_032379.2	TRADD	NM_003789.2
	CKTSF1B1	NM_013372.4	DOC1	NM_014890.1	ACAS2L	NM_032501.2

ES 2 531 535 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

GDF15	NM_004864.1	SPON2	NM_012445.1	C1QTNF1	NM_198593.1
ADFP	NM_001122.2	TNXB	NM_032470.2	EIF1AY	NM_004681.2
COL1A2	NM_000089.2	TXNIP	NM_006472.1	LOC400693	XM_375609.1
MAP1LC3A	NM_181509.1	SLITRK6	NM_032229.2	DAB2	NM_001343.1
RARRES2	NM_002889.2	LOC374822	XM_353149.1	HCA112	NM_018487.2
LAMA4	NM_002290.2	AKR1C4	NM_001818.2	SEDL	NM_014563.2
ZNF25	NM_145011.2	HLA-B	NM_005514.4	MMP14	NM_004995.2
MGC3207	NM_032285.1	CTGF	NM_001901.1	TWIST2	NM_057179.1
C21orf6	NM_016940.1	FLJ21986	NM_024913.3	LOC400682	XM_375590.1
INMT	NM_006774.3	PRSS11	NM_002775.2	INHBE	NM_031479.3
OXTR	NM_000916.3	FLJ22625	NM_024715.2	MGC4504	NM_024111.2
LY96	NM_015364.2	STOM	NM_198194.1	ATP8B4	XM_370863.1
KRTAP10-10	NM_181688.1	EIF5A2	NM_020390.5	ZHX3	NM_015035.2
LOC255849	XM_172855.1	KCNS1	NM_002251.3	LOC387758	NM_203371.1
NNMT	NM_006169.1	SERF1A	NM_021967.1	GDF10	NM_004962.2
NFIB	NM_005596.1	KIAA1237	XM_087386.5	FLJ14525	NM_032800.1
AKR1C2	NM_001354.4	AKR1C3	NM_003739.4	CLDN11	NM_005602.4
IL1R1	NM_000877.2	LOC400738	XM_378837.1	FLJ20701	NM_017933.3
LOC399959	XM_378316.1	LOC374987	XM_351264.1	RAB13	NM_002870.2
C10orf10	NM_007021.1	MAGP2	NM_003480.1	KIAA0779	XM_098229.9
PTX3	NM_002852.2	ST6GALNAC6	NM_013443.3	LOC286343	XM_210019.1
FLJ32332	NM_144641.1	PPFIBP1	NM_003622.2	SLCO1A2	NM_005075.2
FLJ38149	XM_375563.1	LOC388019	XM_373611.1	GLMN	NM_053274.1
DDIT3	NM_004083.3	PSMB8	NM_148919.2	UGCG	NM_003358.1
PAPPA	NM_002581.3	FLJ11286	NM_018381.1	SULT2B1	NM_177973.1
LOXL4	NM_032211.5	RASL12	NM_016563.2	NPDC1	NM_015392.2
CEBPD	NM_005195.2	TREML1	NM_178174.2	ABTB1	NM_172028.1
LOC93349	NM_138402.2	PI16	NM_153370.1	LOC390046	XM_372351.2
LOC401217	XM_376443.1	DKFZp686O1689	NM_182608.2	MRPL4	NM_146387.1
BCL6	NM_001706.2	FCGRT	NM_004107.3	STXBP5	NM_139244.2
ARF4L	NM_001661.2	ANKRD25	NM_015493.3	LOC400768	XM_378883.1
TGFB111	NM_015927.3	K6HF	NM_004693.1	LOC400649	XM_378746.1
PCDH18	NM_019035.2	JDP2	NM_130469.2	M17S2	NM_031862.1
COL6A2	NM_001849.2	EHD2	NM_014601.2	CDC42EP5	NM_145057.2
C9orf59	NM_033387.2	SPUVE	NM_007173.3	CD59	NM_000611.4
DSIP1	NM_004089.2	B7	NM_006992.2	PROS1	NM_000313.1
PDGFRB	NM_002609.2	C9orf88	NM_022833.1	APM2	NM_006829.1
MICB	NM_005931.2	EPS8	NM_004447.3	MBNL1	NM_021038.2
HPCAL1	NM_002149.2	LTBP4	NM_003573.1	LOC378157	XM_353658.1
EPLIN	NM_016357.1	LRP10	NM_014045.2	CORO1B	NM_020441.1
PLTP	NM_182676.1	MGC15737	NM_032926.2	LOC255783	NM_178511.2
COL6A3	NM_057167.1	RGC32	NM_014059.1	WARS	NM_004184.2
RRAS	NM_006270.2	HOXA5	NM_019102.2	CXCL16	NM_022059.1

ES 2 531 535 T3

	SERPING1	NM_000062.1	PRNP	NM_183079.1	SPG20	NM_015087.3
	TAP1	NM_000593.4	PDLIM2	NM_198042.2	RIS1	NM_015444.1
5	MGC16121	NM_032762.2	RNASE4	NM_194431.1	TRAM2	NM_012288.1
	NCOA7	NM_181782.2	MGC10500	NM_031477.2	LCAT	NM_000229.1
	MGC3047	NM_032348.2	UACA	NM_018003.1	CPNE7	NM_153636.1
10	DKFZp761G0122	NM_152661.1	PPP1 R3C	NM_005398.3	NEXN	NM_144573.1
	PDLIM7	NM_005451.3	ARRDC4	NM_183376.1	OPTN	NM_021980.3
	FLJ11196	NM_018357.2	ZYX	NM_003461.3	KCNRG	NM_199464.1
15						
	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
	URG4	NM_017920.2	MTHFD2	NM_006636.2	FOXP1	NM_032682.3
20	STAT1	NM_007315.2	IQGAPI	NM_003870.2	C1QTNF6	NM_182486.1
	CNTNAP1	NM_003632.1	MGC50372	NM_173566.1	MGC23284	XM_378628.1
	CBX3	NM_007276.3	ACTA2	NM_001613.1	C10orf6	NM_144592.1
25	INPP1	NM_002194.2	SLC12A4	NM_005072.3	ACSL4	NM_004458.1
	FLJ37940	NM_178534.2	BCL3	NM_005178.2	FLJ11259	NM_018370.1
	ZNF498	NM_145115.1	KIAA1949	XM_166376.1	GARS	NM_002047.1
	FLJ12409	NM_025105.1	LOC375460	XM_351626.1	CLIPR-59	NM_015526.1
30	LOC389414	XM_374176.1	LOC400653	XM_378750.1	GRK5	NM_005308.1
	IL10RB	NM_000628.3	GNB3	NM_002075.2	C11orf15	NM_020644.1
	EVI5	NM_005665.2	MICA	NM_000247.1	FLJ25348	NM_144569.2
35	LOX	NM_002317.3	VEGFB	NM_003377.3	GPR124	NM_032777.6
	NXPH4	NM_007224.1	SMARCA2	NM_139045.1	CPD	NM_001304.3
	MGMT	NM_002412.1	NTE	NM_006702.2	BHD	NM_144997.3
	DDAH1	NM_012137.2	LOC155340	XM_055725.3	PLK3	NM_004073.2
40	THRA	NM_003250.4	KRT15	NM_002275.2	FBLN2	NM_001998.1
	TNC	NM_002160.1	FLJ37396	NM_173671.1	CTSD	NM_001909.3
	SCGF	NM_002975.2	TPSB2	NM_024164.2	RNH	NM_002939.3
45	MGC14276	NM_153248.2	SBBI54	NM_138334.1	ANTXR2	NM_058172.1
	NRXN3	NM_138970.2	LPPR2	NM_022737.1	MED8	NM_052877.2
	CYP1A2	NM_000761.2	IL1R2	NM_004633.3	PCK2	NM_004563.1
	BCR	NM_021574.1	ADM	NM_001124.1	LOC343069	XM_291395.1
50	FTH1	NM_002032.1	HCCR1	NM_015416.2	CD1C	NM_001765.1
	LOC146784	XM_378694.1	JM4	NM_007213.1	EFEMP2	NM_016938.1
	KIAA1055	NM_015079.2	LAMC1	NM_002293.2	PGRMC2	NM_006320.1
55	PRKCDBP	NM_145040.1	FER1L3	NM_133337.1	PPGB	NM_000308.1
	MACF1	NM_012090.3	OS-9	NM_006812.1	MMP17	NM_016155.2
	DACH	NM_080759.1	ITGB1	NM_002211.2	MME	NM_007288.1
	TM7SF1	NM_003272.1	LENG8	NM_052925.1	HTATIP2	NM_006410.3
60	C20orf18	NM_031227.1	FLJ35976	NM_173639.1	TAGLN2	NM_003564.1

ES 2 531 535 T3

	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
	MOBKL2A	NM_130807.2	LOC90271	XM_030445.6	PLEC1	NM_000445.1
5	ACSL3	NM_004457.3	USH1G	NM_173477.2	ALDH1B1	NM_000692.3
	A2LP	NM_017492.2	CARS	NM_001751.3	ATP6V1E1	NM_001696.2
	CSF2RB	NM_000395.1	GCLC	NM_001498.2	KIAA0746	NM_015187.1
	LOC400558	XM_378631.1	VEGFC	NM_005429.2	MCM8	NM_032485.4
10	PSAT1	NM_021154.3	CCL2	NM_002982.2	USP4	NM_003363.2
	MBNL2	NM_144778.1	F2RL3	NM_003950.1	SBP1	NM_178121.1
	RAMP1	NM_005855.1	MGC15875	NM_032921.1	HOXA6	NM_024014.2
15	PLA2G10	NM_003561.1	PDE4C	NM_000923.1	MTND3	NM_173710.1
	LOC399788	XM_374817.1	HDLBP	NM_005336.2	PPP2R3A	NM_002718.3
	IGSF8	NM_052868.1	MLLT1	NM_005934.2	PHLDA3	NM_012396.1
	MGC57858	NM_178508.2	MGC20446	NM_153611.2	CCNT2	NM_058241.1
20	MGC33894	NM_152914.1	NOX1	NM_007052.3	PLXDC2	NM_032812.7
	VN1R2	NM_173856.1	C9orf25	NM_147202.1	C14orf127	NM_025152.1
	SEC22L1	NM_004892.3	OLIG3	NM_175747.2	LOC401488	XM_379617.1
25	LXN	NM_020169.2	ADCY3	NM_004036.2	DISP2	NM_033510.1
	ELL	NM_006532.1	LOXL2	NM_002318.1	SEMA3F	NM_004186.2
	STAT6	NM_003153.3	FKBP5	NM_004117.2	CTBS	NM_004388.1
	C14orf31	NM_152330.2	B3GAT1	NM_054025.1	MYH9	NM_002473.2
30	NTAN1	NM_173474.2	JWA	NM_006407.2	LOC93109	NM_138399.2
	GLRX2	NM_016066.3	ATO8	NM_032827.3	PSFL	NM_031301.1
	FN1	NM_002026.1	KIAA0605	NM_014694.2	ODF2	NM_153437.1
35	CAST	NM_173060.1	CSAD	NM_015989.3	SCARA3	NM_016240.2
	LOC169355	NM_194294.1	LAMA3	NM_198129.1	TGFB3	NM_003239.1
	LOC196463	NM_173542.2	LOC401026	XM_376160.1	FTHFSDC1	NM_015440.3
40	HEXB	NM_000521.2	DSCR1L2	NM_013441.2	TINF2	NM_012461.1
	FLJ12529	NM_024811.2	NOXA1	XM_351868.1	SETBP1	NM_015559.1
	ZNF524	NM_153219.2	NOD9	NM_024618.2	HLX1	NM_021958.2
	CHIC2	NM_012110.2	TNIP3	NM_024873.2	MGC22014	XM_351441.1
45	MRC2	NM_006039.1	LOC388504	XM_373793.1	SLC22A12	NM_153378.1
	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
50	PLP2	NM_002668.1	TMSL3	NM_183049.1	IMPDH1	NM_183243.1
	ANAPC2	NM_013366.3	NPIP	NM_006985.1	BACE	NM_138973.1
	HAX1	NM_006118.2	LOC285043	XM_379085.1	LGALS1	NM_002305.2
55	KLHL8	NM_020803.3	LOC388940	XM_373980.1	PADI1	NM_013358.1
	DIA1	NM_000398.3	BAIAP2	NM_006340.1	LOC388690	XM_373865.2
	UBXD4	NM_181713.3	STCH	NM_006948.3	RRAGC	NM_022157.2
	ANG	NM_001145.2	HRI	NM_014413.2	KIAA0924	XM_375471.1
60	TPM2	NM_003289.2	KCTD13	NM_178863.2	TRAM1	NM_014294.3
	DPYSL5	NM_020134.2	KCNJ2	NM_000891.2	LOC338755	XM_291980.3

ES 2 531 535 T3

	ZBTB4	NM_020899.2	FLJ20006	NM_017618.1	LOC389050	XM_374014.1
	MGC13024	NM_152288.1	LOC388278	XM_373687.1	LOC145853	XM_096885.6
5	LOC387749	XM_370606.1	DBN1	NM_080881.1	FLJ90798	NM_153367.1
	HDAC8	NM_018486.1	FLJ36766	NM_182623.1	FLJ14464	NM_032789.1
	CRSP3	NM_004830.2	NPEPL1	NM_024663.2	gaa	NM_000152.2
	LOC389739	XM_372100.1	TXNL4	NM_006701.2	LOC90410	NM_174887.2
10	SPRY1	NM_199327.1	ARHGEF17	NM_014786.2	LIMS2	NM_017980.2
	SESN2	NM_031459.3	LASS5	NM_147190.1	TAF10	NM_006284.2
	LOC401886	XM_377480.1	SPRED2	NM_181784.1	MFAP2	NM_002403.2
15	CLN2	NM_000391.2	PRICKLE2	XM_093799.2	ADCY6	NM_020983.2
	MT1H	NM_005951.1	PHF1	NM_002636.3	STOML1	NM_004809.3
	FLJ13868	NM_022744.1	NPD007	NM_020684.2	C21orf97	NM_021941.1
	EIIs1	NM_152793.1	MAGEL2	NM_019066.2	FLJ14011	NM_022103.2
20	USP47	NM_017944.2	CTDSP2	NM_005730.2	MSCP	NM_016612.1
	STK10	NM_005990.1	TGFBI	NM_000358.1	LOC283710	XM_211174.1
	LOC51145	NM_016158.1	SSBP2	NM_012446.2	CROT	NM_021151.2
25	KIAA1036	NM_014909.2	NID67	NM_032947.3	KIAA1068	NM_015332.2
	LOC400771	XM_378890.1	DKFZP434N1923	NM_030974.2	COL3A1	NM_000090.2
	ATP13A	NM_020410.1	CHPF	NM_024536.4	COMMD3	NM_012071.1
	NYREN18	NM_016118.3	LOC253827	NM_198080.1	C6orf145	NM_183373.2
30	PARVA	NM_018222.2	VKORC1	NM_024006.3	ACTN4	NM_004924.3
	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
35	C14orf75	NM_153046.1	FLJ20793	NM_019022.3	CLN5	NM_006493.1
	DHRS1	NM_138452.1	PCNX	NM_014982.1	KIAA0841	XM_049237.5
	SCAMP2	NM_005697.3	SLC28A1	NM_004213.3	ANKFY1	NM_016376.2
40	N4BP2	NM_018177.2	FAM8A1	NM_016255.1	RARA	NM_000964.1
	LOC91526	NM_153697.1	STUB1	NM_005861.1	NFE2L1	NM_003204.1
	DKFZP434B044	NM_031476.1	FLJ40852	NM_173677.1	C6orf48	NM_016947.1
	LOC115294	NM_052937.1	TK2	NM_004614.2	ACK1	NM_005781.2
45	APBA3	NM_004886.2	PRKAG1	NM_002733.2	KIAA1164	NM_019092.1
	DNASE2	NM_001375.1	FLJ13815	XM_086186.3	ZNF440	NM_152357.1
	MGC47816	NM_173642.1	TXNRD1	NM_182743.1	SCIN	NM_033128.1
50	TAPBP	NM_003190.3	AMFR	NM_138958.1	ARPC2	NM_005731.2
	IL13RA1	NM_001560.2	WDR1	NM_005112.3	EPIM	NM_001980.2
	LOC400608	XM_375475.1	TENS1	NM_022748.6	SYNE1	NM_133650.1
	UGCGL2	NM_020121.2	MDS006	NM_020233.3	PIP5K2B	NM_138687.1
55	C10orf42	NM_138357.1	EEF1G	NM_001404.3	ANXA5	NM_001154.2
	RP4-622L5	NM_019118.2	MGC9913	XM_378178.1	DNCL2A	NM_177953.1
	LOC389119	NM_203370.1	ITGB1	NM_033668.1	KIRREL	NM_018240.3
60	RPH3AL	NM_006987.2	MGC45386	NM_198527.1	TNFRSF10B	NM_147187.1
	ARK5	NM_014840.1	C16orf35	NM_012075.1	RPS4X	NM_001007.3
	MI-ER1	NM_020948.1	PPP2R5A	NM_006243.2	TCEA2	NM_003195.4

ES 2 531 535 T3

	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
	OCIA	NM_017830.1	DPAGT1	NM_001382.2	APBA1	NM_001163.2
5	LOC400555	MM_375379.1	FLJ12078	NM_024977.1	NFATC3	NM_173164.1
	PH-4	NM_177938.1	CXXC1	NM_014593.1	PRO1843	NM_018507.1
	FKBP11	NM_016594.1	FLJ21127	NM_024549.3	DDIT4	NM_019058.1
10	DDEF2	NM_003887.1	FLNA	NM_001456.1	DNCH1	NM_001376.2
	SH3GLB1	NM_016009.2	SDFR1	NM_017455.1	SLC22A18	NM_002555.3
	CREB3	NM_006368.4	COL9A2	NM_001852.3	HSPA12B	NM_052970.3
	C1orf8	NM_004872.3	RPL29	NM_000992.2	C2orf177	NM_022106.1
15	MGC42090	NM_152774.1	HARS	NM_002109.3	GLTSCR2	NM_015710.2
	D2S448	XM_056455.3	RPL32	NM_000994.2	BARHL2	NM_020063.1
	RPL13A	NM_012423.2	LOC388291	XM_373692.1	RPL41	NM_021104.1
20	LOC127262	NM_182752.2	FBXO18	NM_178150.1	KIAA0186	NM_021067.1
	EEF1 D	NM_001960.2	PTK9L	NM_007284.3	RELB	NM_006509.2
	NMT2	NM_004808.1	HNOEL-iso	NM_020190.1	SERPINH1	NM_001235.2
25	KIAA0472	XM_290898.2	MGC21874	XM_291105.1	ABC1	NM_022070.3
	ICA1	NM_022308.1	KDELR3	NM_006855.2	GRN	NM_002087.1
	DEGS	NM_144780.1	MDS032	NM_018467.1	USP52	NM_014871.2
	TRAPPC3	NM_014408.3	FLJ10486	NM_018109.2	FLJ14281	NM_024920.3
30	NFKBIL2	NM_013432.3	LOC90353	NM_145232.2	SEMA3C	NM_006379.2
	C17orf37	NM_032339.3	E2F6	NM_198257.1	PLCD1	NM_006225.1
	PLEKHA1	NM_021622.2	ARL6IP4	NM_018694.1	ZNF578	NM_152472.1
35	COX15	NM_004376.3	LYK5	NM_153335.3	LOC221143	NM_174928.1
	RPS14	NM_005617.2	PXN	NM_002859.1	LTBP1	NM_000627.1
	LEPREL2	NM_014262.2	KIAA0992	NM_016081.2	FLJ32965	NM_182506.1
40	ARHGEF11	NM_014784.2	KIAA0628	NM_014789.1	MGC33338	NM_152366.2
	TREX2	NM_017518.3	SCDR10	NM_198704.1	CORO1C	NM_014325.2
	PPP2R2B	NM_181677.1	LOC169611	NM_182487.1	LOC401483	XM_376800.1
	MGC22805	NM_144590.1	C11orf1	NM_022761.1	RAPGEFL1	NM_016339.1
45	RNPEP	NM_020216.3	LOC199800	XM_373810.2	MOSPD3	NM_023948.3
	MGC21518	NM_145274.1	ZNF499	NM_032792.2	FVT1	NM_002035.1
50	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso	Código del gen	Núm. acceso
	PLXNB2	XM_371474.1				
	TP53	NM_000546.2				
	HIP14	NM_015336.1				
55	FLJ11078	NM_018316.1				
	M6PRBP1	NM_005817.2				
	LOC90624	NM_181705.1				
	RALA	NM_005402.2				
60	ASPSCR1	NM_024083.2				

	PCDHB9	NM_019119.3			
	LOC161247	NM_203402.1			
5	FLJ20531	NM_017865.2			
	PTK7	NM_152881.2			
	SARDH	NM_007101.2			
10	MGC4238	NM_032332.2			
	PIGS	NM_033198.2			
	FLJ10803	NM_018224.1			
15	OAZ1	NM_004152.2			
	SPUF	NM_013349.3			
	TNFSF4	NM_003326.2			
	BANF1	NM_003860.2			
20	FLJ22471	NM_025140.1			

Ejemplo 9: Formación de tubos capilares.

25 La angiogénesis es la generación y la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares, un proceso fundamental para los procesos tales como la cicatrización de heridas y la reproducción. Se implica además en los procesos patológicos (artritis reumatoide, crecimiento tumoral y metástasis).

30 Principio

En este caso el ensayo se estableció para probar la influencia de diversos compuestos (es decir, compuestos químicos o miARN etc.) en la formación del tubo por CMPC (células progenitoras de cardiomiocitos). Para estas células formar tubos estas células tienen que diferenciarse en células musculares lisas y células endoteliales

35 La formación de estos tubos capilares recién formados se visualizan tiñendo α -SMA (actina α de músculo liso) en las células musculares lisas y PECAM-1 (molécula-1 de adhesión celular endotelial de plaquetas, CD31) en las células endoteliales.

40 Materiales y Métodos

Reactivos

- A. CMPC (células progenitoras de cardio miocito fetal o adulto)
- B. EBM-2 (medio basal de célula endotelial). Clonetics, Cat. núm. CC-3156
- 45 c. EGM-2: EBM-2 + EGM-2 gotas individuales Cat. núm. CC-4176 + 2% FBS
- d. VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) S
- e. agregado de cultivo celular en 24-pocillos, fondo plano con tapa. Corning Costar Cat. Núm. 3524
- f. Cubreobjetos de microscopio 12mm Ø No.1 Cat. núm. 01 115 20 Marienfeld GmbH & Co.KG.
- 50 g. Anticuerpo monoclonal producido en ratón anti actina α de músculo-Liso, Sigma Cat. núm. A2547 .2ml clon 1A4.
- h. Estuche SFX anti ratón en carnero con Alexa Fluor 488. Invitrogen Cat. Núm. A31619
- I. Policlonal IgG de carnero PECAM-1 (C-20). Santa Cruz Biotechnology Cat. núm. sc-1505 lote núm. B169.
- J. anti carnero Cy3 en burro
- k. Hoechst
- 55 l. amortiguador Hoechst
- m. Estuche de ensayo de angiogenesis In vitro. Chemicon International Cat. Núm. ECM625
- n. PBS (solución salina regulada con fosfato)
- o. Agua (desmineralizada)
- p. Amortiguador bloque : 0.1% saponina (proveedor, Cat. núm.) y 2% BSA (Sigma, Cat. núm.) en PBS
- 60 q. 4% Para formaldehído
- r. Moviol

Aparato

- 5 a. pipetas
- b. microscopio
- c. pinzas
- d. Incubador 37° Celsius 5% CO₂
- e. Caja Humidificada
- f. Tejidos
- g. puntas de pipetas de 200 µl
- 10 h. tijeras
- i. nevera
- j. congelador
- k. parafilm

15 Ensayo de Angiogenesis In Vitro

- a. Hacer uso de CMPC (adulto/fetal)
- b. Las células se cultivan en SP++ (SP++: ver reactivo (c) en la sección anterior, es decir gotas individuales EBM-2 + EGM-2 Cat. núm. CC-4176 + 2% FBS). Para el cultivo usar una relación de división entre 1:3 y 1:10. Las células pueden crecer hasta el número de pases 22-24 después del pase 22-24 cambiará el fenotipo de la célula.
- 20

Día antes del inicio del experimento:

- 25 a. Colocar los cubreobjetos de microscopios esterilizados (ya sea por la temperatura o EtOH) de 12 mm Ø en la (s) placa (s) de 24 pocillos
- b. Poner la (s) placa (s) de 24 pocillos junto con puntas de pipeta de 200µl a -20 °C durante toda la noche.
- c. Descongelar la solución de gel ECMatrix toda la noche en hielo a 4 °C

30 Inicio del experimento

- a. Esterilizar las tijeras en la cabina de flujo
- b. Colocar la placa de 24 pocillos en hielo en la cabina de flujo
- c. Colocar las puntas de pipeta de 200µl heladas en la cabina de flujo
- 35 d. Mantener ECMatrix en hielo antes del uso
- e. Cortar la punta de la punta de la pipeta de 200 µl y pipetear 90µl de ECMatrix en un pocillo de una placa de 24 pocillos. (trabajar lo más rápido y más frío posible) Repetir hasta que se recubran todos los pocillos deseados.
- f. Asegurar que ECMatrix incluso se distribuye en cada pocillo, poner la placa después, durante mínimo una hora a 37°C
- 40

Intermedio

45 Si el material de prueba es miARN o ADN transfectar las células antes de la siembra de células en ECMatrix si el material de prueba es un compuesto químico sólo añadir el compuesto después/durante la siembra de las células. Siempre tomar los controles adecuados

- g. Después de una hora sembrar 15.000 célula/pocillo (0.5 ml/pocillo) en una placa de 24 pocillos recubierta con ECMatrix en medio EGM-2 con *% FBS con una adición extra de 100 ng/ml de VEGF. Incubar las células durante 24h a 37°C y 5% de CO₂. 0.5% - 10%
- 50 h. Si se ha producido la formación de vasos tomar fotos antes de seguir más adelante. Esto para garantizar y asegurar los resultados si algo sale mal durante la tinción.

Tinción de α-SMA y PECAM-1

- 55 a. Eliminar el sobrenadante y fijar las células con 4% de Para formaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente 500µl/pocillo.
- b. Lavar dos veces con 1 ml de PBS
- c. Bloquear 30 minutos con amortiguador bloqueador 500µl/pocillo
- 60 d. Mientras tanto preparar la solución de anticuerpo primario. Ambos anticuerpos primarios se pueden usar al mismo tiempo en la misma muestra.
- e. Usar 50 µl de solución de anticuerpo primario para una muestra (si es un cubreobjetos de microscopio 12mm Ø). Diluir PECAM-1 1: 200 en amortiguador de bloqueo y α-SMA 1:40 en amortiguador de bloqueo.
- f. Pipetear 50µl de solución de anticuerpo primario en el parafilm.

- g. Sacar el (los) cubreobjeto (s) del Microscopio de la placa de 24 pocillos con un par de pinzas. Poner al revés en los 50µl de solución (nes) de anticuerpo (s).
- h. Colocar el parafilm con las muestras en la caja humidificada e incubar durante toda la noche a 4 °C.
- i. Después de la incubación colocar de nuevo los cubreobjetos de microscopio en una placa de 24 pocillos y lavar 3 veces con 1 ml de PBS.
- 5 j. Durante la última etapa de lavado preparar la primera solución de anticuerpo secundario diluyendo 1:400 anticarnero en burro Cy3 en PBS. De nuevo se usa 50µl de cada muestra. *Al trabajar con anticuerpos secundarios mantener las muestras protegidas de la luz tanto como sea posible.*
- 10 k. Pipetear primero 50µl de la solución de anticuerpo secundario en parafilm y añadir al cubreobjetos de microscopio. (ver etapa g)
- l. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.
- m. Después de la incubación colocar de nuevo los cubreobjetos de microscopio en una placa de 24 pocillos y lavar 3 veces con 1mL de PBS
- 15 n. Durante la última etapa de lavado preparar la segunda solución de anticuerpo secundario diluyendo 1:400 488nm de anti ratón en carnero en PBS. De nuevo se usa 50µl de cada muestra.
- o. Segundo pipetear 50µl de la solución de anticuerpo secundario en parafilm y añadir al cubreobjetos de microscopio. (ver etapa g)
- p. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

20 Los resultados de un ensayo in vitro de angiogénesis se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 10: Células progenitoras de cardiomiocito fetal humano mejoran la función sistólica del ventrículo izquierdo después de infarto de miocardio en ratones NOD/scid

25 Recientemente, se ha vuelto apreciar la existencia de células progenitoras de cardiomiocitos (CMPCs) que residen en el corazón. Se aislaron las CMPCs de corazón fetal humano y demostraron que estas CMPCs humanas (hCMPCs) pueden diferenciarse en cardiomiocitos funcionales in vitro. En el presente estudio se investigó si estas células son capaces de injertar en el miocardio isquémico y mejorar la función ventricular izquierda en un modelo de infarto de miocardio de ratón inmuno comprometido.

30 Métodos: Las hCMPCs se aislaron de corazones fetales humanos por clasificación celular magnética basada en la expresión de SCA-1. El infarto de miocardio (MI) se indujo en ratones NOD/scid inmuno comprometidos. Veinte minutos después del MI, las hCMPCs marcadas con eGFP (grupo hCMPC, 2.0×10^5 células en 20µl, n=11) o sólo vehículo (grupo MI+Medio, n=12) se inyectaron en la zona infartada. Los ratones con operación simulada (Simulación) se usaron como valores iniciales (n=10). Dos y 14 días después de la inducción del MI, la función cardíaca se evaluó en serie usando un MRI vertical de animal 9.4T. Los ratones se sacrificaron después y se evaluó por inmunohistoquímica el injerto y la diferenciación de células inyectadas.

35 Resultados: En el día 2, los volúmenes LV fueron superiores y EF (fracción de eyección) fue inferior en ambos grupos MI en comparación con la Simulación sin diferencia entre los grupos MI. 9). Sin embargo, en el día 14, EF (fracción de eyección) fue superior y ESV (volumen sistólico final) fue inferior en el grupo hCMPC en comparación con el grupo MI+Medio (P=0.001 y P=0.048 respectivamente). Aunque hubo una tendencia hacia un EDV (volumen diastólico final) reducido, esto no alcanzó significación estadística (p = 0.14).

40 Conclusiones: Las hCMPC fetal se injertan en el miocardio infartado agudamente, y mejora la función sistólica del ventrículo izquierdo. Estos resultados indican el potencial de hCMPC para usar en la terapia celular para el tratamiento de IHD.

Ejemplo 11 : Formación de adipocitos

50 Las CMPCs se siembran y cultivan hasta que hayan alcanzado una confluencia de 90 - 100% en SP++ (gotas individuales SP++: EBM-2 + EGM-2 Cat. núm. CC- 4176 + 2% FBS). Posteriormente, el medio se sustituye por DMEM 4.5 g/l de glucosa + piruvato de Na que contiene 10% de FBS, 1 uM de dexametasona, 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 10 ug/ml de insulina, indometacina 0.2 mM y Pen/estrep. Después de algunos días, las gotas de grasa se depositan alrededor del núcleo. Cada 3 días, el medio se recambia.

Los adipocitos se tiñeron con Aceite Rojo de acuerdo con el siguiente protocolo para confirmar la diferenciación de los adipocitos:

60 0.7 g de solución concentrada de Aceite Rojo O FW 408.5, Sigma O-0625 se mezcló con 200 ml de isopropanol; agitó O/N, después se filtró con 0.2 im y se almacenó a +4°C. El Aceite Rojo O

La solución de trabajo se preparó a partir de 6 partes de concentrado de Aceite Rojo O; 4 partes de dH₂O; mezcló y dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos y filtró con 0.2 im.

5 La mayor parte del medio se eliminó y las células se fijaron mediante la adición de 4% de paraformaldehído. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, se descartó la formalina y se añadió el mismo volumen de formalina nueva. Después de la incubación durante al menos 1 hora las células se pueden mantener en formalina durante un par de días antes de la tinción. El parafilm se envolvió alrededor de la placa para evitar que se seque y se cubrió con papel de aluminio. Toda la formalina se eliminó con una pequeña pipeta de transferencia y los pocillos se lavaron con 60% de isopropanol. A los pocillos completamente secos se añadió la solución de trabajo de Aceite Rojo durante 10 min sin tocar las paredes de los pocillos. Todo el aceite Rojo O se eliminó y se añadió inmediatamente dH₂O seguido de lavado 10
10 4 veces con H₂O. Después se tomaron fotografías.

15 Para confirmar además la diferenciación de adipocitos in vitro, el ARN se aisló de las CMPCs diferenciadas e indiferenciadas. RT-PCR se realizó en Leptina ((del Griego leptos, que significa delgado) es una hormona proteína con efectos importantes al regular el peso corporal, metabolismo y función reproductiva. La leptina se expresa predominantemente por los adipocitos, lo que se adecua con la idea de que el peso corporal se detecta como la masa total de grasa en el cuerpo), Adipsina (es la serina proteasa que se secreta por los adipocitos), PPAR y 2 (se expresa predominantemente en el tejido graso), GLUT 4 (portadores de glucosa en los tejidos musculares y adiposos) & CYR61/CCN1 (expresión disminuida notablemente durante la diferenciación osteogénica, diferenciación adipogénica y diferenciación condrogénica).
20

Lo que resultó en

25

	HFH	hMSC
Leptina	n/a	up
adipsina	up	up
ppary2	up	up
Cnn1/cyr61	abajo	abajo
glut4	---	---

30

35 Por lo tanto se puede concluir que las CMPCs actúan de la misma manera que cuando hMSC se diferencia in vitro. Por lo tanto, las CMPCs de la invención son capaces de diferenciarse en adipocitos. Los resultados se muestran en la Figura 10a a 10f.

40 Bibliografía citada

1. Emanuelli,C., Lako,M., Stojkovic,M. & Madeddu,P. In search of the best candidate for regeneration of ischemic tissues: are embryonic/fetal stem cells more advantageous than adult counterparts? *Thromb. Haemost* 94, 738-749 (2005).
45

2. Leri,A., Kajstura,J. & Anversa,P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev.* 85, 1373-1416 (2005).

3. Smits,A.M., van Vliet,P., Hassink,R.J., Goumans,M.J. & Doevendans,P.A. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J. Cell Mol. Med.* 9, 25-36 (2005).
50

4. Van Laake,L.W., Van Hoof,D. & Mummery,C.L. Cardiomyocytes derived from stem cells. *Ann. Med.* 37, 499-512 (2005).

5. Fukuda,K. & Fujita,J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int.* 68, 1940-1943 (2005).
55

6. Mangi,A.A. y otros. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* 9, 1195-1201 (2003).
60

7. Orlic, D. y otros Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705 (2001).

8. Beltrami,A.P. y otros Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776 (2003).
- 5 9. Behfar, A. y otros Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J.* 16, 1558-1566 (2002).
- 10 10. Menard,C. y otros Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 366, 1005-1012 (2005).
- 15 11. Rubart,M. y otros Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ. Res.* 92, 1217-1224 (2003).
12. Muller-Ehmsen, J. y otros Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 105, 1720-1726 (2002).
- 20 13. Schachinger,V. y otros Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1690-1699 (2004).
- 25 14. Menasche,P. y otros Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 1078-1083 (2003).
15. Smits,P.C. y otros Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 2063-2069 (2003).
- 30 16. Meyer,G.P. y otros Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113, 1287-1294 (2006).
- 35 17. Balsam,L.B. y otros Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673 (2004).
18. Murry,C.E. y otros Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668 (2004).
- 40 19. Mummery,C. y otros Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107, 2733-2740 (2003).
20. Passier,R. y otros Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 23, 772-780 (2005).
- 45 21. Xu,C., Police,S., Rao,N. & Carpenter,M.K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ. Res.* 91, 501-508 (2002).
22. Oh,H. y otros Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 12313-12318 (2003).
- 50 23. Laugwitz,K.L. y otros Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647-653 (2005).
24. Pfister,O. y otros *Circ. Res.* 97, 52-61 (2005).
- 55 25. Messina,E. y otros Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 95, 911-921 (2004).
26. Slager,H.G., Van Inzen,W., Freund,E., Van den Eijnden-Van Raaij AJ & Mummery,C.L. Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev. Genet.* 14, 212-224 (1993).
- 60 27. Takahashi,T. y otros Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 107, 1912-1916 (2003).

28. Sachinidis,A. y otros Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc. Res.* 58, 278-291 (2003).
- 5 29. Li,T.S. y otros Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation* 111, 2438-2445 (2005).
30. ten Dijke,P. & Hill,C.S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* 29, 265-273 (2004).
- 10 31. Inman,G.J. y otros SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* 62, 65-74 (2002).
- 15 32. Mouquet,F. y otros Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ. Res.* 97, 1090-1092 (2005).
33. Flanders,K.C., Holder,M.G. & Winokur,T.S. Autoinduction of mRNA and protein expression for transforming growth factor-beta S in cultured cardiac cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 27, 805-812 (1995).
- 20 34. van der Heyden,M.A. y otros P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level. *Cardiovasc. Res.* 58, 410-422 (2003).
- 25 35. Goumans,M.J. y otros Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 21, 1743-1753 (2002).

Reivindicaciones

- 5
1. Una fracción celular que comprende al menos 90% de células progenitoras de cardiomiocitos humanos (CMPCs) que se **caracterizan por** un epítipo Sca-1 y CD31 en su superficie celular.
- 10
2. Un método in vitro para el enriquecimiento de células progenitoras de cardiomiocitos humanos (CMPCs), que comprende las etapas de:
- (a) disociar el tejido del corazón, por ejemplo, derivado del atrio; y
- (b) enriquecer las CMPCs con un agente de unión a Sca-1 y un agente de unión a CD31.
- 15
3. Una fracción de células que comprende las CMPCs de acuerdo con la reivindicación 1, que se obtiene por un método de la reivindicación 2.
- 20
4. Una fracción celular que comprende las CMPCs de acuerdo con la reivindicación 1, dichas células son capaces de la diferenciación en cardiomiocitos in vitro después del tratamiento con 5-azacitidina o 5-aza-2'-desoxicitidina en presencia de ácido ascórbico.
- 25
5. Un método in vitro para la diferenciación de las CMPCs humanos en los cardiomiocitos, preferentemente en ausencia de cardiomiocitos neonatales co-cultivados, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una fracción celular que comprende las CMPCs de acuerdo con la reivindicación 1; y
- (b) tratar dichas CMPCs con un agente de desmetilación.
- (c) permitir diferenciarse en cardiomiocitos las CMPCs así tratadas.
- 30
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho agente de desmetilación es 5-azacitidina o 5-aza-2'-desoxicitidina.
- 35
7. El método de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde dicha fracción celular que comprende las CMPCs se trata con dicho agente de desmetilación en presencia de un agente antioxidante, preferentemente ácido ascórbico.
- 40
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que comprende además la etapa de:
- (b1) tratar las CMPCs con un miembro de la familia de TGF- β .
- 45
9. El método de la reivindicación 8, en donde dicho miembro de la familia TGF- β es TGF- β .
- 50
10. Una composición farmacéutica que comprende la fracción celular de acuerdo con la reivindicación 1.
- 55
11. Una fracción celular de acuerdo con la reivindicación 1, para el uso en una terapia de reemplazo de cardiomiocito y/o en un método para el tratamiento de infarto de miocardio o para mejorar los efectos del infarto de miocardio.
12. Una fracción celular para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la terapia de reemplazo de cardiomiocitos es la mejora de la fuerza contráctil cardíaca.
13. Uso de una fracción de células de acuerdo con la reivindicación 1, para los métodos de selección, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar dicha fracción celular que comprende células progenitoras de cardiomiocitos (CMPCs);
- (b) poner dichas CMPCs en contacto con una sustancia de prueba; y
- (c) evaluar el efecto de dicha sustancia de prueba sobre la capacidad de diferenciación de dichas CMPCs.
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho método de selección es un método de selección de fármacos.

Figura 1

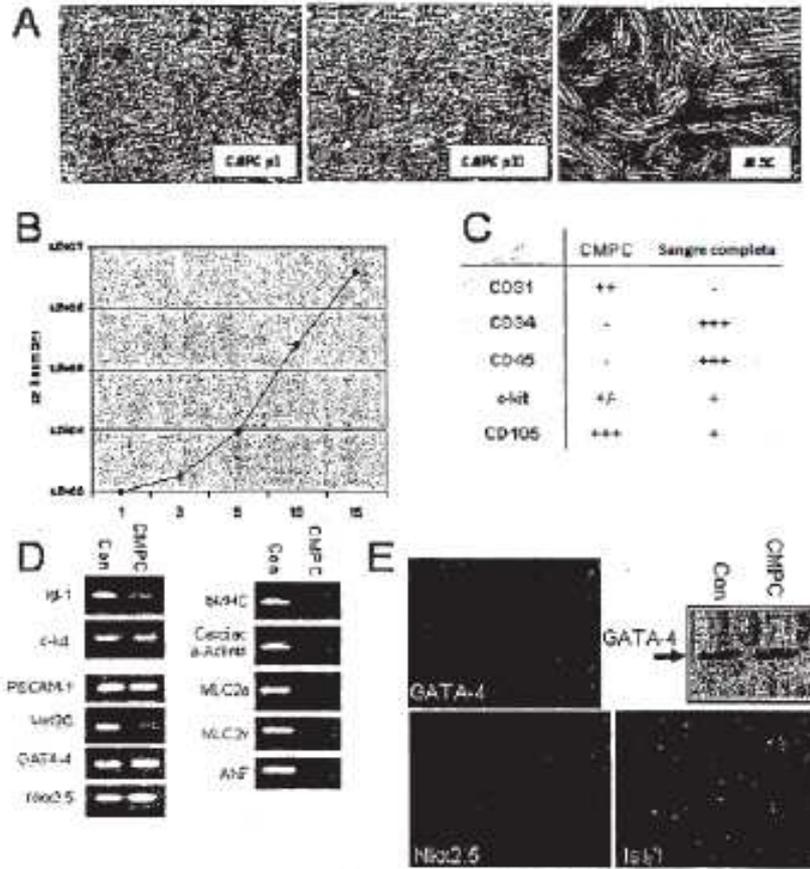


Figura 2

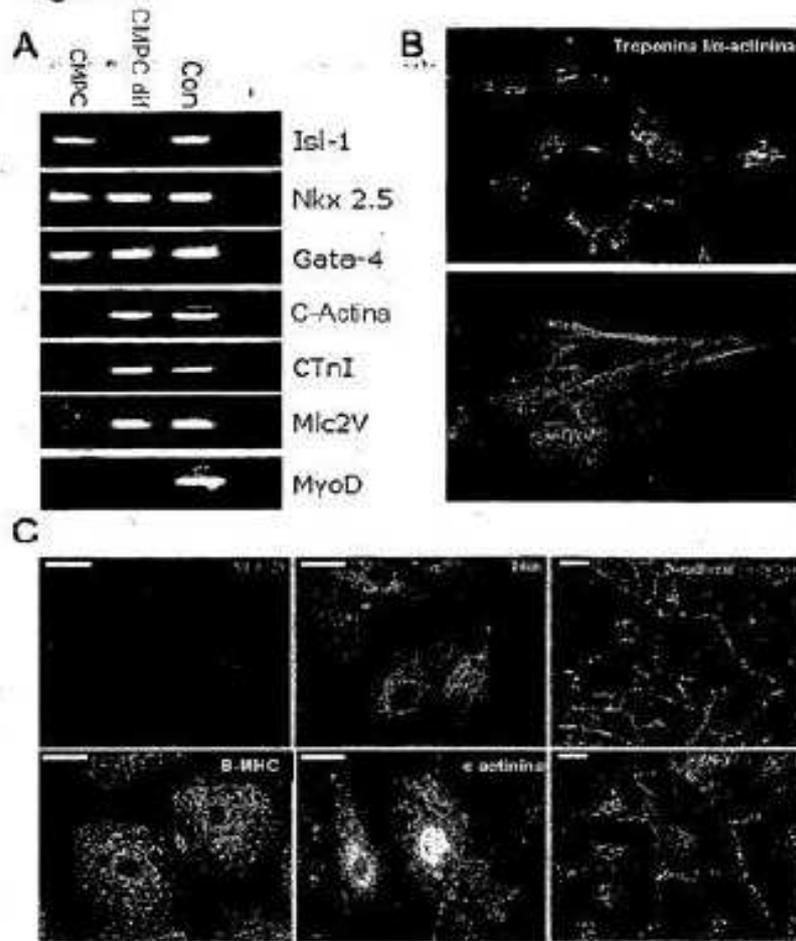


Figura 3

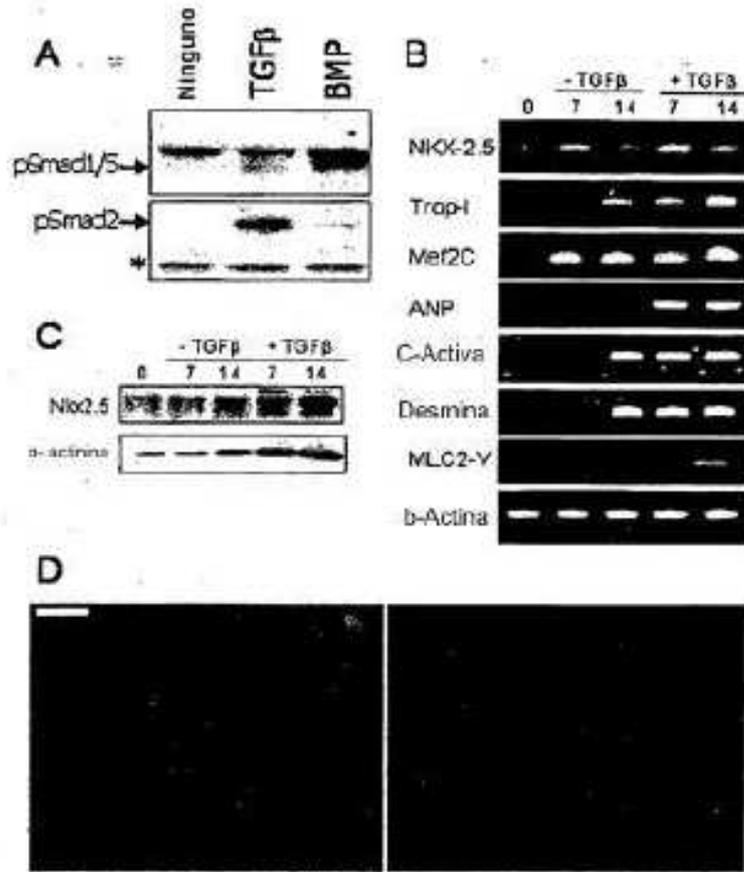


Figura 4

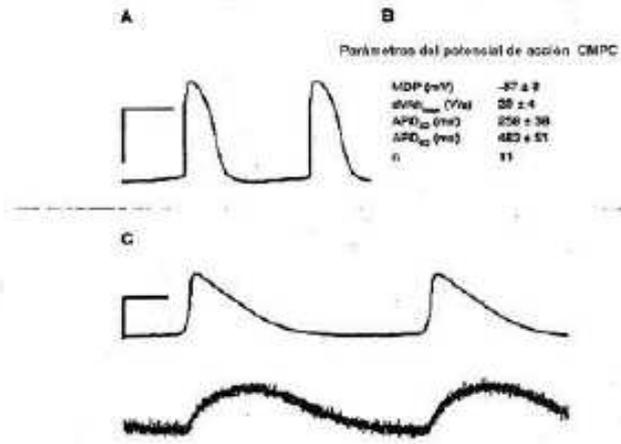


Figura 5

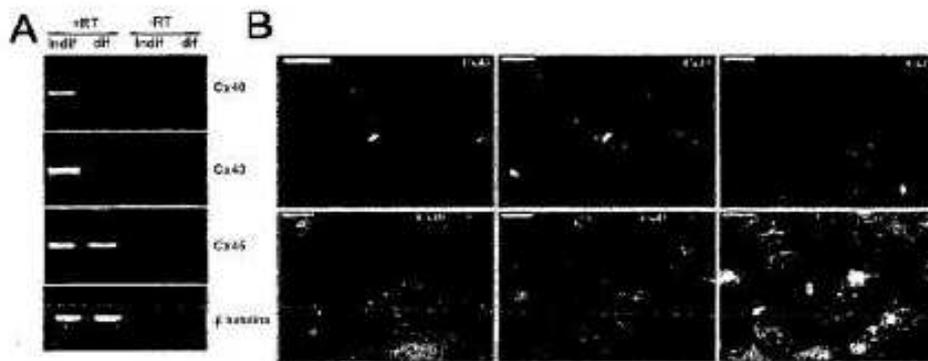


Figura 6

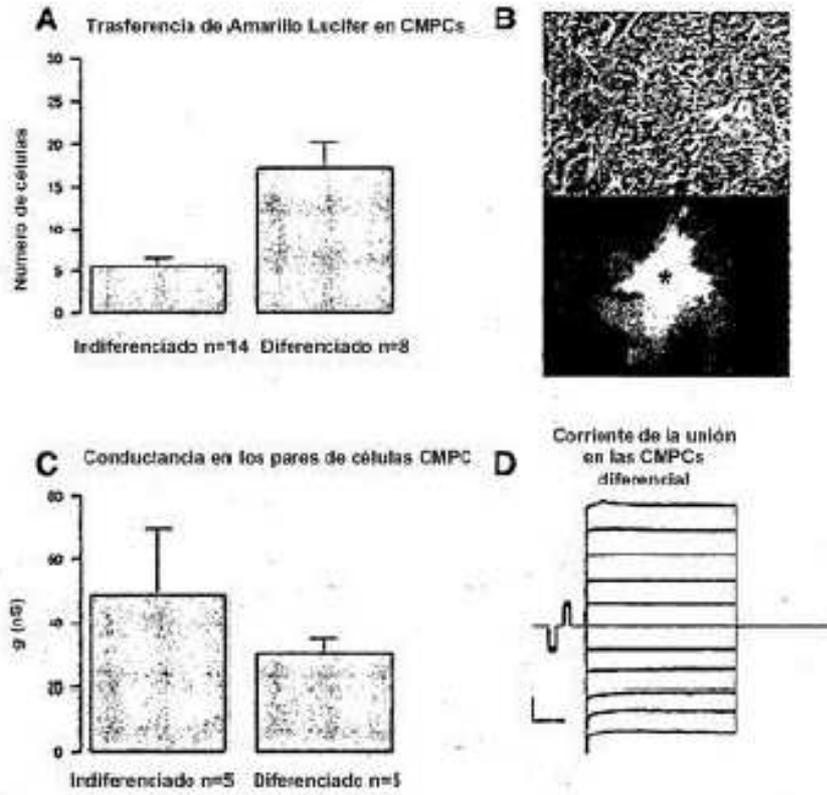


Figura 7

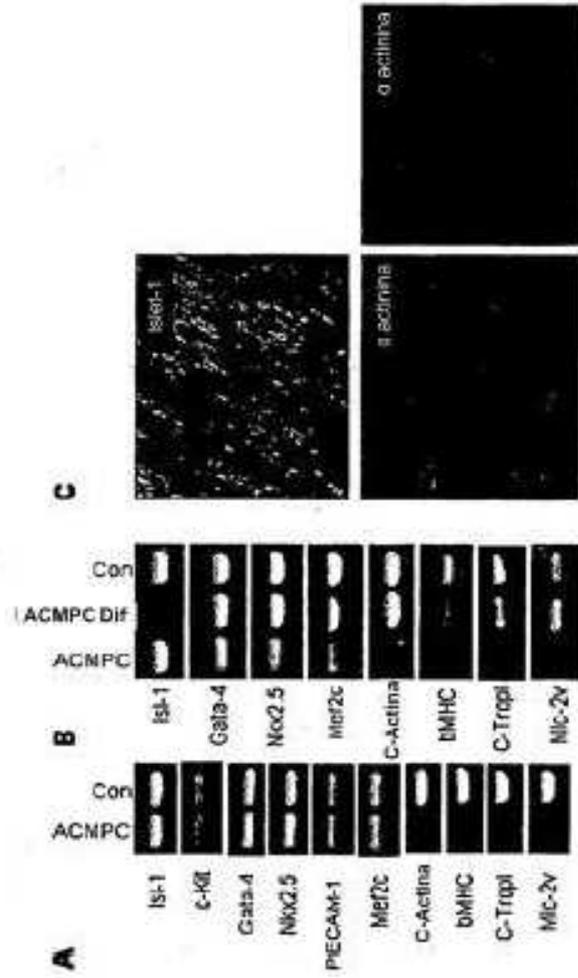
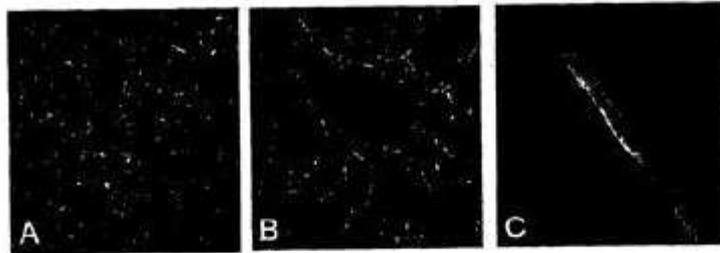
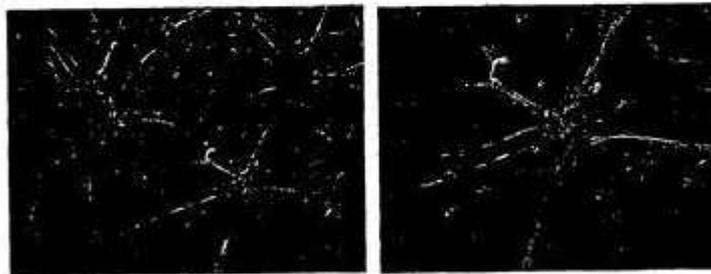


Figura 8



Parte 1



Parte 2

Figura 9

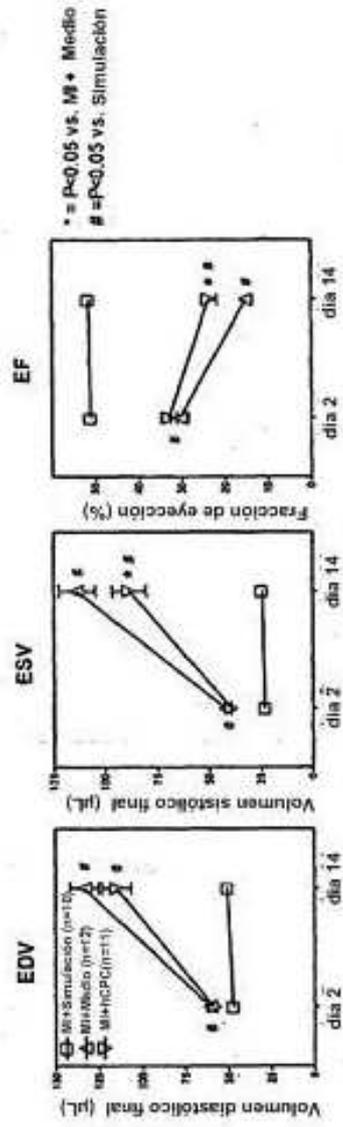


Figura 10

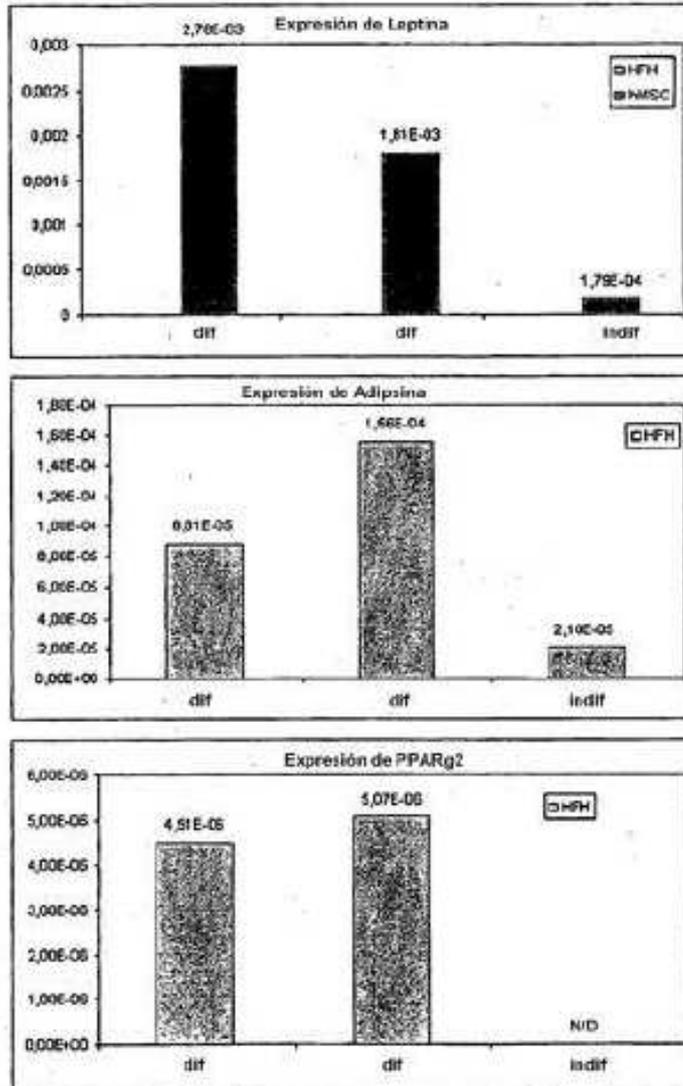


Figura 10 cont.

