

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 909**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2005 E 05777528 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 1786471**

54 Título: **Tratamiento de tejido cardiovascular**

30 Prioridad:

30.07.2004 US 592871 P

12.05.2005 US 680775 P

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

01.04.2015

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905 , US**

72 Inventor/es:

**TERZIC, ANDRE y
BEHFAR, ATTA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 532 909 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

Tratamiento de tejido cardiovascular

Antecedentes

1. Campo técnico

5 Este documento se relaciona con métodos y materiales involucrados en el tratamiento de tejido cardiovascular con, por ejemplo, células madre.

2. Información de antecedentes

10 Las lesiones del miocardio llevan a pérdidas de cardiomiocitos, remodelación ventricular y consecuente incapacidad del funcionamiento del miocardio. Desafortunadamente, la capacidad mitótica de los cardiomiocitos es demasiado limitada para soportar una regeneración del miocardio adecuada. Además, las modalidades terapéuticas actuales atenúan la progresión de la enfermedad sin contribuir significativamente a la reparación del miocardio.

15 Las células pluripotentes tales como las células madre de embriones pueden proliferar indefinidamente *in vitro* y pueden diferenciarse, *in vitro*, en células que recapitulan el fenotipo cardíaco expresando marcadores cardíacos característicos y demostrando acoplamiento de excitación-contracción funcional. Cuando se trasplantan a corazones lesionados, las células madre de embriones pueden generar cardiomiocitos que repueblan las regiones del miocardio disfuncionales y mejoran el rendimiento contráctil. Las células madres pluripotentes, sin embargo, pueden formar células tumorales una vez retiradas del ambiente hematopoyético original.

Resumen

20 En lo que sigue, los términos “células de embriones”, “células madre” y “células pluripotentes” excluirán las derivadas de la utilización de embriones humanos. La invención se relaciona con una materia tal como se define en las reivindicaciones anexas. Este documento describe métodos y materiales relacionados con el tratamiento de tejido cardiovascular (por ejemplo, tejido del corazón o tejido vascular). Por ejemplo, este documento describe células madre, composiciones que contienen células madre, métodos para obtener células madre, composiciones para generar células madre que expresan marcadores particulares y métodos para reparar tejido cardiovascular. Las células madre y las composiciones que contienen células madre descritas aquí pueden ser utilizadas para reparar tejido cardiovascular. Tales células madre pueden permitir que los médicos traten, por ejemplo, lesiones del miocardio puesto que las células madre pueden tener la capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos. En algunos casos, tales células madre y composiciones que contienen células madre pueden ser utilizadas para reparar tejido cardiovascular sin producir tumores dentro del tejido. Las composiciones descritas aquí para generar células madre pueden permitir a los profesionales médicos producir grandes cantidades de células madre que pueden expresar marcadores particulares y pueden ser utilizadas para reparar tejido cardiovascular.

35 En general, este documento describe un método para tratar tejido del corazón o vascular. El método incluye administrar células madre al tejido del corazón o vascular bajo condiciones en donde las células madre no desarrollan células tumorales en el tejido del corazón o vascular. Las células madre pueden ser inyectadas en el corazón de un mamífero (por ejemplo un humano). Las células madre pueden ser células madre de embriones o células madre que expresan uno o más polipéptidos listados en la tercera columna de la Tabla 1. Las células madre pueden ser inyectadas en una cantidad menor de aproximadamente 1500 células madre por mg de tejido de corazón o vascular. El tejido de corazón o vascular puede ser tejido que fue puesto en contacto con TNF- α , TGF- β o γ -interferón. El método puede incluir poner en contacto el tejido de corazón o vascular con TNF- α , TGF- β o γ -interferón. Esta etapa de contacto puede ocurrir antes, durante o después de que las células madre son administradas.

40 Las células madre de embrión pueden ser administradas al tejido del corazón o al tejido vascular de tal forma que no se desarrollen tumores. Por ejemplo, pueden necesitarse menos de 1000 células madre de embrión por 1 mg de tejido en un mamífero (por ejemplo, humano, primate, caballo, perro, gato, cerdo, vaca o roedor). En algunos casos, pueden administrarse aproximadamente 50 a 1500 células (por ejemplo, 100 a 1500, 200 a 1500, 500 a 1500, 200 a 1000, o 500 a 1000 células) por 1 mg de tejido de corazón a un mamífero sin riesgo de desarrollar tumores. Cuando se inyectan células madre de embrión en un ratón, cuyo corazón pesa aproximadamente 300 mg, pueden administrarse 3×10^5 células. Al inyectar 3300 células por 1 mg de tejido de corazón puede dar como resultado un 15% de riesgo de tumor, mientras que al inyectar 10000 células por 1 mg de tejido de corazón puede dar como resultado un 72% de riesgo de tumor.

Este documento describe adicionalmente una células madre que expresa (a) al menos un polipéptido seleccionado del grupo consistente de Oct4; DEK; BRCA1; Ect2; y MYC; (b) al menos un polipéptido seleccionado del grupo consistente de

Fosb; NRAP; MEF2A; Furin; TGFβ1; receptor α de fibronectina; receptor 1 del dominio de discoidina; bag2; proteína rica en
 5 cisteína; CUGBP2; NDRG4; proteína 1 inhibidora de CBP/p300; proteína 1 inducible por interferón; tropomiosina 1, alfa;
 proteína 1 activadora de Rho GTPasa; carboxipeptidasa D; profilina 2; transcripto inducido por el factor beta 1 de
 crecimiento transformante; tropomiosina 1, alfa; receptor de la hormona de crecimiento; vinculina; adenilato ciclasa 6;
 10 proteína A1 de enlazamiento de calcio S100; tropomiosina 2, beta; proteína 1 de enlazamiento del retinol, celular; Moesina;
 matriz de metaloproteínasa 2; glicoproteína rica en cisteína ácida secretada; manosidasa 1, alfa; lectina, de enlazamiento a
 galactosa, soluble 1; proteína A6 de enlazamiento a calcio S100 (calciclina); epóxido hidrolasa 1, microsómico; gen similar a
 adenoma pleiomórfico 1; factor de crecimiento 2 similar a insulina; proteína 4 similar a proteína Tubby; proteína prion;
 15 proteína 10 de enlazamiento a FK506; ciclina D2; reticulocalbina 3, dominio de enlazamiento a calcio del lado EF;
 selenoproteína M; inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21); caldesmon 1; integrina beta 1 (beta receptor de
 fibronectina); transcobalamina 2; anexina A2; inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21); trombospondina 1;
 monocito para macrófago asociado a la diferenciación; receptor AXL de tirosina quinasa; anexina A5; similar enlazador a
 20 músculos 2; anexina A1; procolágeno, tipo IV, alfa 1; calpaina 2; proteína 1 de membrana epitelial; proteasa serina, 11;
 tropomiosina 2, beta; lectina, enlazamiento a galactosa, soluble 9; y anexina A3; y (c) al menos un polipéptido seleccionado
 del grupo consistente de proteína 2A de membrana integral; proteína de enlazamiento al factor de crecimiento similar a
 insulina 4; antígeno 1 de células del timo, theta; selenoproteína P, plasma, 1; glicoproteína 38; sustrato 8 de la ruta del
 receptor del factor de crecimiento epidérmico; proteína 1A de choque cardiaco; proteína 1 de enlazamiento del ácido
 retinoico celular; y 8 específico para placenta; la célula madre puede tener 2, 3, 4 o más de los polipéptidos listados en cada
 grupo. La célula madre puede expresar los polipéptidos listados en la tercera columna de la Tabla 1. Este documento
 25 caracteriza adicionalmente la progenie de estas células madre.

Además, se describen células madre, en donde las células madre exhiben traslocación nuclear de los factores de
 transcripción cardíaca tales como NKX2.5, Mes2C, y GATA4; y en donde las células madre no comprenden proteínas
 sarcoméricas tales como anexina A6, factor del crecimiento del tejido conectivo, Smad6, canal de Na⁺, tipo L canal de Ca²⁺,
 Ca²⁺ ATPasa, MLC2V, MLC2a, I-MHC, I-actina, I-actinina, troponina T2, o titina.

25 Este documento describe adicionalmente una composición (esto es un cóctel cardiogénico) que contiene TGF-β1; TGF-β2;
 BMP-1; BMP-2; BMP-5; BMP-6; FGF-4; FGF-5; FGF-12; FGF-13; FGF-15; FGF-20; factor inhibidor de leucemia; VEGF-C;
 factor 1 de crecimiento de insulina; e interleucina 6. El cóctel cardiogénico puede contener caspase-4; ligando 1 de
 quimioquina; ligando 2 de quimioquina; ligando 5 de quimioquina; ligando 7 de quimioquina; ligando 11 de quimioquina;
 30 ligando 20 de quimioquina; haptoglobina; factor estimulante de colonias 1; lectina; colesterol 25-hidroxilasa; sintaxina-8;
 sintaxina-11; ceruloplasmina; componente complementario 1; componente complementario 3; factor de crecimiento derivado
 de plaquetas; integrina alfa 6; lipasa 1 ácida lisosómica; β-2 microglobulina; ubiquitina; factor inhibidor de la migración de
 macrófagos; ácido retinoico; cofilina; ciclofilina A; FKBP12; NDPK; profilina 1; cistatina C; calciclina, o cualquier combinación
 de los anteriores. El cóctel cardiogénico, bajo exposición a células madres de embriones, puede producir que las células
 35 madre de embriones pierdan su tumorigenicidad. El cóctel cardiogénico por exposición a células madre de embriones,
 puede hacer que las células madre de embriones se comprometan en la diferenciación en cardiomiocitos.

Este documento describe adicionalmente un método para obtener células madre (por ejemplo, células madre
 cardiopoyéticas). El método incluye poner en contacto células madre de embriones con un cóctel cardiogénico. Las células
 madre pueden expresar uno o más de los polipéptidos listados en la tercera columna de la Tabla 1. El método puede incluir
 aislar células madre cardiopoyéticas a partir de células madre de embriones o cardiomiocitos.

40 Este documento describe adicionalmente un método para determinar si las células son o no células madre. El método
 incluye determinar si las células expresan o no (a) al menos un polipéptido seleccionado del grupo consistente de Oct4;
 DEK; BRCA1; Ect2; y MYC; (b) al menos un polipéptido seccional del grupo consistente de Fosb; NRAP; MEF2A; Furin;
 TGFβ1; receptor α de fibronectina; receptor 1 del dominio de discoidina; bag2; proteína rica en cisteína; CUGBP2; NDRG4;
 45 proteína 1 inhibidora de CBP/p300; proteína 1 inducible por interferón; tropomiosina 1, alfa; proteína 1 activadora de Rho
 GTPasa; carboxipeptidasa D; profilina 2; transcripto inducido por el factor beta 1 de crecimiento transformante; tropomiosina
 1, alfa; receptor de la hormona de crecimiento; vinculina; adenilato ciclasa 6; proteína A1 de enlazamiento de calcio S100;
 tropomiosina 2, beta; proteína 1 de enlazamiento del retinol, celular; Moesina; matriz de metaloproteínasa 2; glicoproteína
 50 rica en cisteína ácida secretada; manosidasa 1, alfa; lectina, de enlazamiento a galactosa, soluble 1; proteína A6 de
 enlazamiento a calcio S100 (calciclina); epóxido hidrolasa 1, microsómico; gen similar a adenoma pleiomórfico 1; factor de
 crecimiento 2 similar a insulina; proteína 4 similar a proteína Tubby; proteína prion; proteína 10 de enlazamiento a FK506;
 ciclina D2; reticulocalbina 3, dominio de enlazamiento a calcio del lado EF; selenoproteína M; inhibidor 1A de quinasa
 dependiente de ciclina (P21); caldesmon 1; integrina beta 1 (beta receptor de fibronectina); transcobalamina 2; anexina A2;
 55 inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21); trombospondina 1; monocito para macrófago asociado a la
 diferenciación; receptor AXL de tirosina quinasa; anexina A5; enlazador a músculos similar 2; anexina A1; procolágeno, tipo
 IV, alfa 1; calpaina 2; proteína 1 de membrana epitelial; proteasa, serina, 11; tropomiosina 2, beta; lectina, enlazamiento a
 galactosa, soluble 9; y anexina A3; y (c) al menos un polipéptido seleccionado del grupo consistente de proteína 2A de
 membrana integral; proteína de enlazamiento al factor de crecimiento similar a insulina 4; antígeno 1 de células del timo,

theta; selenoproteína P, plasma, 1; glicoproteína 38; sustrato 8 de la ruta del receptor del factor de crecimiento epidérmico; proteína 1A de choque cardiaco; proteína 1 de enlazamiento del ácido retinoico celular; y 8 específico para placenta.

5 En un primer aspecto, la invención caracteriza un método para hacer un cóctel cardiogénico. El método incluye (a) cultivar células endodérmicas ventrales en un medio, en donde dichas células son obtenidas a partir de un embrión tratado con TNF-alfa con la condición de que el embrión no es un embrión humano; generar por lo tanto un medio de cultivo condicionado; y (b) recolectar el medio de cultivo condicionado, obteniendo por lo tanto un cóctel cardiogénico. En una realización, el método puede incluir la adición de uno o más de los siguientes componentes: IGF-1, IL-6, FGF-4, TGF-β, BMP, LIF, y α -trombina. Las células similares a endodérmicas ventrales pueden ser células de carcinoma de embrión.

10 Este documento describe adicionalmente una composición que contiene células en donde al menos el 5% (por ejemplo, al menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, o 99 por ciento) de las células de la composición son células madre que expresan (a) al menos un polipéptido seleccionado del grupo consistente de Oct4; DEK; BRCA1; Ect2; y MYC; (b) al menos un polipéptido seleccionado del grupo consistente de Fosb; NRAP; MEF2A; Furin; TGFβ; receptor α de fibronectina; receptor 1 del dominio de discoidina; bag2; proteína rica en cisteína; CUGBP2; NDRG4; proteína 1 inhibidora de CBP/p300; proteína 1 inducible por interferón; tropomiosina 1, alfa; proteína 1 activadora de Rho GTPasa; carboxipeptidasa D; profilina 2; transcritto inducido por el factor beta 1 de crecimiento transformante; tropomiosina 1, alfa; receptor de la hormona de crecimiento; vinculina; adenilato ciclasa 6; proteína A1 de enlazamiento de calcio S100; tropomiosina 2, beta; proteína 1 de enlazamiento del retinol, celular; Moesina; matriz de metaloproteínasa 2; glicoproteína rica en cisteína ácida secretada; manosidasa 1, alfa; lectina, de enlazamiento a galactosa, soluble 1; proteína A6 de enlazamiento a calcio S100 (calciclina); epóxido hidrolasa 1, microsómico; gen similar a adenoma pleiomórfico 1; factor de crecimiento 2 similar a insulina; proteína 4 similar a proteína Tubby; proteína prion; proteína 10 de enlazamiento a FK506; ciclina D2; reticulocalbina 3, dominio de enlazamiento a calcio del lado EF; selenoproteína M; inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21); caldesmon 1; integrina beta 1 (beta receptor de fibronectina); transcobalamina 2; anexina A2; inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21); trombospondina 1; monocito para macrófago asociado a la diferenciación; receptor AXL de tirosina quinasa; anexina A5; enlazador a músculos similar 2; anexina A1; procolágeno, tipo IV, alfa 1; calpaina 2; proteína 1 de membrana epitelial; proteasa, serina, 11; tropomiosina 2, beta; lectina, enlazamiento a galactosa, soluble 9; y anexina A3; y (c) al menos un polipéptido seleccionado del grupo consistente de proteína 2A de membrana integral; proteína de enlazamiento al factor de crecimiento similar a insulina 4; antígeno 1 de células del timo, theta; selenoproteína P, plasma, 1; glicoproteína 38; sustrato 8 de la ruta del receptor del factor de crecimiento epidérmico; proteína 1A de choque cardiaco; proteína 1 de enlazamiento del ácido retinoico celular; y 8 específico para placenta.

30 Al menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona de experiencia normal en la técnica para la cual es pertinente esta invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica o prueba de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

40 La Figura 1A y la Figura 1B son fotografías utilizando microscopía de electrones de barrido con emisión de campo (A) y transmisión (B) de células madre de embriones CGR8 no diferenciadas en cultivo. La Figura 1C es una fotografía de cardiomiocitos con tinción con DAPI derivados *in vitro* a partir de la colonia de células madre de CGR8. La Figura 1D (superior) es una gráfica que muestra que los cardiomiocitos derivados de células madre exhiben actividad potencial de acción bajo un modo de corriente-pinza, mientras que Figura 1D (inferior) es una gráfica que muestra que la relación corriente-voltaje fue obtenida bajo el modo voltaje-pinza en respuesta a un estímulo en rampa (rata de 1.2 de V/s). La Figura 45 1E muestra transientes de calcio sondeados por microscopía confocal con láser asistida con Fluo3 de un cardiomiocito derivado de células madre (recuadro), y registrado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. La Figura 1F es un fotografía que muestra la retención local de células madre CGR8 después de la administración intramiocardio en un corazón de ratón (recuadro) y la criosección (a una magnificación de 40x) de miocardio con una superposición de células madre fluorescentes. La Figura 1G es una fotografía que muestra la carencia de dispersión de células madre en tejidos no cardíacos con ausencia de fluorescencia o hiperproliferación celular en cerebro de ratón (izquierda), riñón (centro), hígado (derecha), mostrados a magnificación baja 50 (arriba) y 40x (abajo).

La Figura 2 muestra el infarto de corazones de rata confirmado por la presencia de ondas Q anteriores y laterales en un electrocardiograma de 12 cables (Figura 2A) y mediante inspección visual después de una toracotomía (Figura 2B). En la Figura 2A, las flechas indican la localización de las ondas Q en la electrocardiografía. En la Figura 2B, las flechas indican los

sitios de inyección de células madre en la base, ventrículo medio y ápice en la zona periinfartada. El recuadro en la Figura 2B muestra la inyección de células madre en un corazón infartado.

5 La Figura 3A es una gráfica que muestra que a las 3 semanas después de la inyección, la fracción de eyección ventricular izquierda medida por ecocardiografía en modo M fue significativamente mayor en corazones infartados tratados con células madre (n=4) versus tratados con simulación (n=3) (barras gris claro; p<0.05). Después del estrés inducido por inyección intraperitoneal de isoproterenol, la fracción de eyección ventricular izquierda se incrementó en el grupo tratado con células madre pero no en el grupo con simulación de tratamiento (barras gris oscuro; p<0.05). Un asterisco sencillo representa una diferencia significativa entre los grupos con células madre y de simulación, mientras que un doble asterisco representa una diferencia significativa entre los grupos con células madre y de simulación así como una diferencia significativa en el grupo de células madre con y sin estrés. La Figura 3B es una fotografía que muestra una imagen en modo M representativa bajo tensión en el corazón con tratamiento simulado en contraste con el corazón tratado con células madre. Las líneas interrumpidas y continuas indican las dimensiones ventriculares izquierdas diastólica y sistólica, respectivamente. MI: infarto del miocardio.

10 La Figura 4A son imágenes en modo M representativas a las 12 semanas en corazones infartados con simulación de tratamiento versus tratamiento con células madre. Las líneas interrumpidas y continuas indican las dimensiones ventriculares izquierdas diastólicas y sistólicas, respectivamente. La Figura 4B muestra una gráfica de mediciones ecocardiográficas en serie a 3, 6, 9 y 12 semanas después de la terapia. La Figura 4C muestra una gráfica a las 12 semanas en comparación con los electrocardiogramas iniciales en el grupo tratado con células madre y tratado con simulación (p<0.05). En las Figuras 4B-4C, los asteriscos indican diferencias significativas en las comparaciones entre los grupos tratados con células madre y los tratamientos de simulación. Las Figuras 4D y 4E son electrocardiogramas representativos de ratas tratadas con simulación (D) y tratadas con células madre (E) a las 12 semanas. Las flechas indican la localización de las ondas Q. MI: infarto del miocardio.

15 La Figura 5 muestra fotografías de cardiomiocitos derivados de células madre. La presencia de cardiomiocitos derivados de células madre de embriones inyectadas puede ser demostrada a través de la expresión de la proteína cianofluorescente potenciada bajo el control del promotor α -actina. La fluorescencia no es vista en corazones no tratados no infartados o infartados tratados con simulación (Fila 1), pero se ve dentro de la zona de infarto de los corazones tratados con células madre (Fila 4; magnificación 10x). En comparación con corazones no infartados, los especímenes grandes y las secciones transversales con tinción con hematoxilina-eosina en la base de cada corazón dentro del grupo con tratamiento de simulación demuestran cavidades ventriculares izquierdas dilatadas y cicatrices anterolaterales prominentes con aneurismas (Filas 2 y 3). En contraste, el tamaño de la cavidad ventricular izquierda y el espesor de la pared se conservan fundamentalmente en los corazones tratados con células madre (Filas 5 y 6). MI: infarto de miocardio.

20 La Figura 6A muestra secciones de miocardio con tinción con hematoxilina-eosina representativas en corazones de control (arriba) o infartados con inyección de células madre (abajo). Las Figuras 6B-C muestran microscopía confocal de fluorescencia con alta magnificación de corazones tratados con células madre. Los cardiomiocitos derivados de células madre se organizan para formar fibras regulares (Figura 6B) orientadas a lo largo del mismo eje que los cardiomiocitos anfitriones (Figura 6B, 6C), despliegan estratificaciones sarcoméricas típicas y forman uniones con cardiomiocitos anfitriones no fluorescentes (Figura 6C). Las Figuras 6D-E muestran imágenes de micrografía electrónica de transmisión representativas de biopsias tomadas de la zona de infarto en corazones con tratamiento de simulación (Figura 6D) en comparación con corazones tratados con células madres (Figura 6E).

25 La Figura 7A muestra microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de células madre de embriones (ES) murínicas en cultivo. La Figura 7B muestra microscopía confocal con láser de una célula madre de embrión (arriba) y los cardiomiocitos derivados (abajo). Las Figuras 7C-E muestran el fenotipo cardíaco recapitulado en cardiomiocitos derivados de células madre incluyendo sarcomerogénesis (Figura 7C) actividad potencial de acción (Figura 7D), expresión del canal de calcio tipo L (Figura 7E) y localización nuclear sostenida del factor de transcripción cardíaco Nkx2.5 (recuadro). Las barras corresponden a 5, 4 y 15 μ m en A, B y C respectivamente. La barra en C aplicable también a E.

30 Las Figuras 8A-B muestra que la administración de 10^3 células madre (ES) de embriones ingenuas/mg de tejido cardíaco o anfitrión da como resultado una implantación y diferenciación apropiada con la generación de nuevos cardiomiocitos. Las barras corresponden a 2 mm y 12 μ m en A y B, respectivamente. La Figura 8C muestra que una carga de células madre de embrión excesiva aloja un incremento de la tumorigénesis. La carga terapéutica fue establecida en 10^3 células madre de embrión/mg de tejido cardíaco anfitrión, lo cual da como resultado una implantación segura sin formación de tumor, y una estructura y funcionamiento cardíacos normal sostenidos (recuadro) La Figura 8D muestra una fotografía de un teratoma generado después de la administración de una sobrecarga de células madre de embrión ($>10^3$ /mg de tejido cardíaco anfitrión). La Figura 8E muestra un esquema de cómo un corazón anfitrión puede guiar la diferenciación de las células madre de embrión.

Las Figuras 9A-D muestran una comparación de corazón normal (Figura 9A) versus infartado bien sea no tratado (Figura 9B) o tratado después de la administración directa al miocardio (Figura 9C) de células madre (Figura 9D). La Figura 9E muestra la presencia de cardiomiocitos derivados de células madre. El recuadro representa un área grande de cardiogénesis *de novo* a través de microscopía confocal con baja magnificación.

5 Las Figuras 10A-B muestran un seguimiento en modo M electrocardiográfico que demuestra que el tratamiento con células madre da como resultado un movimiento normal de la pared anterior y una función contráctil sostenida a través de un periodo de observación de 5 meses, sin evidencia de rechazo (Figura 10C) o arritmia (Figura 10D). Las líneas punteadas y sólidas indican las dimensiones ventriculares izquierdas diastólica y sistólica, respectivamente.

10 La Figura 11A es una gráfica que muestra la sobrerregulación de los factores de transcripción cardíaca Nkx2.5, MEF2C y GATA4 precedidos por la expresión del gen sarcomérico β MHC sobre Q-RT-PCR. Las Figuras 11B-D muestra una población de células no latentes con traslocación nuclear (colocalizada DAPI) de factores de transcripción cardíacos que carecen de sarcómeros (MEF2C (+), α -actinina (-)), aislado a siete días de la diferenciación (D7), escintilación formada de cardiomiocitos latentes (MEF2C (+), α -actinina (+) por D12. El recuadro en la Figura 11B muestra la contractibilidad celular por barrido de línea. Las Figuras 11E-F muestran fenotipos de embriones (ES), cardiopoyéticos (CP) y de cardiomiocitos (CM) resueltos con microscopía electrónica de barrido con emisión de campo (Figura 11E) y microscopía de fuerza atómica (Figura 11F). La Figura 11G muestra un dendograma de arreglo de genes de ES, CP y CM. La Figura 11H muestra perfiles de expresión distintivos de marcadores de pluripotencia (sobrerregulados en ES), cardiopoyesis (sobrerregulado en CP), cardiogénesis (sobrerregulados en CP y CM) y acoplamiento por excitación-contracción (sobrerregulados en CM). Menos: expresión de fondo; más: expresión definitiva utilizada como línea base; doble más: incremento de ≥ 2 veces en expresión. Barras de escala: 1 s (Figura 11B recuadro); 5 μ m (Figura 11C, E, F para CP); 10 μ m (Figura 11F para ES); y 2 μ m (Figura 11F para CM).

25 Las Figuras 12A-D demuestran que en cuerpo embrioides (EB), los factores de transcripción cardíaca amplificados TNF α , que promueven la cardiogénesis y aumentan el contenido cardíaco visualizado por inmunofluorescencia con α -actinina. Las Figuras 12E-F muestran que el pico del efecto cardiogénico de TNF α correlacionado con la sobrerregulación del secretoma endodérmico. Las Figuras 12G-J demuestran la cardiogénesis guiada de monocapas de células madre de embriones que fue promovida por un medio condicionado endodérmico cebado con TNF α , reclutando eficientemente células madre cardiopoyéticas (CP). La Figura 12K muestra que las células cardiopoyéticas reclutadas produjeron cardiomiocitos (CM derivados de CP) que recapitulaban la estructura cardíaca por microscopía confocal y electrónica de transmisión. Las Figuras 12L-O muestran que los CM derivados de CP demostraron transientes de calcio, corrientes iónicas hacia adentro sobre voltaje-pinza y actividad potencial de acción sobre corriente-pinza. Barras de escala: 10 μ m (Figura 12G, K; confocal); 1 μ m (Figura 12K, electrónico); y 3 s (Figura 12M).

35 La Figura 13A muestra geles 2-D del secretoma a partir de endodermo ingenuo versus cebado con TNF α a múltiples gradientes de pH. Círculos coloreados: proteínas sobrerreguladas con TNF α ; triángulos negros: proteínas subreguladas o no cambiadas. Recuadro molécula de TNF α en el secretoma cebado con citoquina. La Figura 13B muestra el cóctel de proteínas de secretoma sobrerreguladas identificadas por espectrometría de masas (profilina/cofilina: involucradas en sarcomerogénesis; calciclina; una proteína de señalización del calcio; NDPK: asociado con reprogramación de gen cardíaco; FKBP12/cistatina/ubiquitina: implicados en la formación del corazón; y $\beta 2$ microglobulina: un marcador de la estimulación de TNF α); menos (secretoma no cebado); más (secretoma cebado con TNF α). La Figura 13C muestra la programación por TNF α del endodermo mostrado sobre un microarreglo de genes. La Figura 13D muestra el patrón de expresión del factor de crecimiento del secretoma derivado del endodermo en respuesta al cebado con TNF α establecido por sondeo genético y proteómico en tándem. Las Figuras 13E y F muestran la sobrerregulación del factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) en cuerpos embrioides cebados con TNF α (EB) o medio condicionado endodérmico (ENDO) confirmado por inmunoensayos, asociados con la señalización aumentada de Smad3 dependiente de TGF- β en la diferenciación de células madre de embriones. Las Figuras 13G y H muestran la adición de TGF- β , la cual emula el cebado con TNF- α , la proliferación incrementada y la diferenciación cardíaca de células madre cardiopoyéticas purificadas.

45 Las Figuras 14A-C muestran las células madre de embriones ($ES \leq 3 \cdot 10^5$ /corazón) trasplantadas por administración de células guiada por ecocardiografía que dan como resultado cardiomiocitos derivados de ES fluorescentes con cian embebidos en un corazón anfitrión positivo a actinina. Las Figuras 14D-F muestran que las ES inyectadas a $\geq 10^6$ /corazón incrementaron el riesgo de crecimiento incontrolado, generando teratomas, consistentes de osteoblastos (O), condrocitos (C), adipocitos (adip), endoteliales (en) o epiteliales (epi) tipos de células. La Figura 14C muestra que las células madre cardiopoyéticas derivadas de ES (CP), positivas para factores de transcripción cardíaca, fueron reclutadas utilizando medio acondicionado endodérmico cebado con TNF α . Las Figuras 14H-J demuestran que la administración de CP a 3×10^6 /corazón dieron como resultado un ritmo cardíaco sincrónico y función vigorosa monitorizados por electrocardiografía multicable, ultrasonido (flecha de dos cabezas, plano de sonda en modo M; s, sístole; d, diástole) y caracterización ventricular por micropresión (LVP, presión ventricular izquierda). Las Figuras 14K y L muestran que el tratamiento con CP dio como resultado una implantación apropiada y una diferenciación cardíaca dentro del corazón anfitrión. Las Figuras 14M

y N muestran que en contraste con ES, la administración de 3×10^6 CP no estuvo asociada con la formación tumoral y llevó a un injerto potenciado. La Figura 14o demuestra que en comparación con corazones ingenuos tipo silvestre (WT), la recapitulación transgénica del cebado con TNF α , a través de la sobreexpresión cardiaca restringida (TNF α -TG), redujo el riesgo de tumorigénesis asociado con el trasplante de ES aumentando la expresión en el miocardio de TGF- β , determinada por inmunoprecipitación Western (recuadro). La interrupción de la señalización cardiopoyética en células ES, a través de la eliminación del dominio de quinasa del receptor de TGF- β (Δ TGF β RII) o la sobreexpresión de la nogina inhibidora de BMP, incrementa el riesgo de tumor. Barras de escala: 2 mm (Figura 14A); 70 μ m (Figura 14B, L); y 10 μ m (Figura 14B recuadro, Figura 14C, 1 recuadro).

Descripción detallada

Este documento describe métodos y materiales relacionados con el tratamiento de tejido cardiovascular (por ejemplo, tejido de corazón o tejido vascular). Por ejemplo, este documento describe células madre, composiciones que contienen células madre, métodos para obtener células madre, composiciones para generar células madre que expresan marcadores particulares, y métodos para reparar tejido cardiovascular.

El término "célula madre" tal como se utiliza aquí se refiere a células que son no especializadas, se pueden renovar así mismas y pueden desarrollarse en células más maduras, especializadas. En algunos casos, una célula madre puede ser no especializada mientras está comprometida a diferenciarse en último particular de célula especializada con la exclusión de otro tipo de células especializadas. Por ejemplo, una célula madre puede ser comprometida para desarrollarse en cardiomiocitos y no en neuronas. Las células madre pueden ser obtenidas a partir de diversos tejidos. Por ejemplo, las células madre tales como células madre de embriones pueden ser obtenidas a partir de embriones no humanos, cuerpos embrioides, o tejido fetal, mientras que la células madre tales como células madre adultas pueden ser obtenidas a partir de tejido de adultos.

Las células madre descritas aquí pueden tener la capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos. Tales células madre pueden ser utilizadas para reemplazar tejido del corazón enfermo o dañado (por ejemplo, miocardio). En algunos casos, las células madre descritas aquí pueden dar como resultado la producción de cardiomiocitos sin producir células tumorales durante un periodo de tiempo que sigue, por ejemplo, a la implantación. Tal periodo de tiempo puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más meses. En algunos casos, el periodo de tiempo puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más años. Por ejemplo, las células madre descritas aquí pueden dar como resultado la producción de cardiomiocitos sin producir células tumorales durante al menos uno, dos, tres o más años después de la implantación en un humano.

Las células madre descritas aquí pueden expresar cualquier combinación de polipéptidos. Por ejemplo, las células madre descritas aquí pueden expresar uno o más polipéptidos (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco polipéptidos) que son expresados por células madre de embriones pero no cardiomiocitos. Tales polipéptidos incluyen, sin limitación, polipéptidos Oct4; DEK; BRCA1; Ect2; y MYC. Las células madre descritas aquí pueden contener todos estos polipéptidos o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, polipéptidos Oct4, BRCA1, Ect2, y MYC; o polipéptidos Oct4, DEK, BRCA1, y MYC; o polipéptidos Oct4, DEK, BRCA1, y Ect2).

En algunos casos, las células de madre descritas aquí pueden expresar uno o más polipéptidos (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más polipéptidos) que también son expresados por cardiomiocitos pero no células madre de embriones. Tales polipéptidos incluyen, sin limitación Fosb; NRAP; MEF2A; Furina; TGF β ; receptor α de fibronectina; receptor 1 del dominio de discoidina; bag2; proteína rica en cisteína; CUGBP2; NDRG4; proteína 1 inhibidora de CBP/p300; proteína 1 inducible por interferón; tropomiosina 1, alfa; proteína 1 activadora de Rho GTPasa; carboxipeptidasa D; profilina 2; transcritto inducido por el factor beta 1 de crecimiento transformante; tropomiosina 1, alfa; receptor de la hormona del crecimiento; vinculina; adenilato ciclasa 6; proteína A1 de enlazamiento de calcio S100; tropomiosina 2, beta; proteína 1 de enlazamiento del retinol, celular; Moesina; matriz de metaloproteínasa 2; glicoproteína rica en cisteína ácida secretada; manosidasa 1, alfa; lectina, de enlazamiento a galactosa, soluble 1; proteína A6 de enlazamiento a calcio S100 (calciolina); epóxido hidrolasa 1, microsómico; gen similar a adenoma pleiomórfico 1; factor de crecimiento 2 similar a insulina; proteína 4 similar a proteína Tubby; proteína prion; proteína 10 de enlazamiento a FK506; ciclina D2; reticulocalbina 3, dominio de enlazamiento a calcio del lado EF; selenoproteína M; inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21); caldesmon 1; integrina beta 1 (beta receptor fibronectina); transcobalamina 2; anexina A2; inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21); trombospondina 1; monocito para macrófago asociado a la diferenciación; receptor AXL de tirosina quinasa; anexina A5; enlazador a músculos similar 2; anexina A1; procolágeno, tipo IV, alfa 1; calpaina 2; proteína 1 de membrana epitelial; proteasa, serina, 11; tropomiosina 2, beta; lectina, enlazamiento a galactosa, soluble 9; y anexina A3 polipéptidos. Las células madre descritas aquí pueden contener todos estos polipéptidos o cualquier combinación de los mismos (e.g., vinculina, anexina A5, CUGBP2, NDRG4, y polipéptidos de 2 profilina; o NRAP, MEF2A, Furina, TGF α 1, y polipéptidos del receptor de fibronectina α ; o proteína 1 activadora de Fosb, Rho GTPasa, proteína 10 de enlazamiento a FK506, anexina A3, y polipéptidos de NDRG4).

En algunos casos, las células madre descritas aquí pueden expresar uno o más polipéptidos (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más polipéptidos) que no son expresados por células madre de cardiomiocitos o de embrión. Tales polipéptidos incluyen, sin limitación, proteína 2A de membrana integral; proteína 4 de enlazamiento con el factor de crecimiento similar a insulina; antígeno 1 de células de timo, theta; selenoproteína P, plasma, 1; glicoproteína 38; sustrato 8 de la ruta del receptor de factor de crecimiento epidérmico, proteína 1A de choque por calor; proteína 1 de enlazamiento del ácido retinoico celular; y polipéptidos 8 específicos de placenta. Las células madre descritas aquí pueden contener todos estos polipéptidos o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, proteína 4 de enlazamiento al factor de crecimiento similar a insulina, proteína 1A de choque al calor, y polipéptidos de la proteína 2A de membrana integral; o polipéptidos de proteína 2A de membrana integral, de proteína 1 de enlazamiento al ácido retinoico celular y 8 específicos de placenta; o polipéptidos de glicoproteína 38, del sustrato 8 de la ruta del receptor del factor de crecimiento epidérmico, de proteína 1 de enlazamiento de ácido retinoico celular y 8 específico de placenta).

Las células madre descritas aquí pueden expresar cualquier número de polipéptidos diferentes y pueden expresar los polipéptidos en cualquier nivel en comparación con los niveles observado en otras células. Por ejemplo, una célula madre que tiene la capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos puede expresar los polipéptidos Oct4, DEK, BRCA1, Ect2 y MYC en niveles menores que los niveles observados en células madre de embriones. En algunos casos, una célula madre que tiene la capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos puede expresar los polipéptidos de la matriz de metaloproteínasa 2; de glicoproteína rica en cisteína ácida secretada; manosidasa 1, alfa; lectina, de enlazamiento a galactosa, soluble 1; proteína 6 de enlazamiento a calcio S100 (calciclina); epóxido hidrolasa 1, microsómica; adenoma pleiomórfico 1 similar a gen; factor 2 de crecimiento similar a insulina; proteína 4 similar a proteína Tubby; y de proteína prion a niveles inferiores a los niveles observados en cardiomiocitos. El nivel de otros polipéptidos con respecto a los niveles observados en otras células (por ejemplo, células madre de embriones o cardiomiocitos) se provee en la Tabla 1.

Puede utilizarse cualquier método para obtener células madre. Por ejemplo, células madre que tienen la capacidad de producir cardiomiocitos sin dar como resultado la producción de células tumorales así como células madres que expresan uno o más de los polipéptidos listados como están presentes en la tercera columna de la Tabla 1 pueden ser obtenidas poniendo en contacto células madres tales como células madre de embriones con un cóctel cardiogénico. Células madre tales como células madre de embriones pueden ser puestas en contacto con un cóctel cardiogénico durante una, dos, tres, cuatro, cinco o más horas (por ejemplo uno, dos, tres, cuatro, cinco o más días bajo condiciones de cultivo).

Un cóctel cardiogénico puede ser una solución que contiene, sin limitación, uno de los siguientes polipéptidos: TGF- β 1; TGF- β 2; BMP-1; BMP-2; BMP-5; BMP-6; FGF-4; FGF-5; FGF-12; FGF-13; FGF-15; FGF-20; factor inhibidor de leucemia (LIF); VEGF-C; interleucina 6; caspasa-4; ligando de quimioquina 1; ligando de quimioquina 2; ligando de quimioquina 5; ligando de quimioquina 7; ligando de quimioquina 11; ligando de quimioquina 20; haptoglobina; factor 1 de estimulación de colonias; lectina; colesterol 25-hidroxilasa; syntaxina-8; syntaxina-11; ceruloplasmina; componente de complemento 1; componente de complemento 3; factor de crecimiento derivado de plaquetas; alfa integrina 6; lipasa 1 ácida lisosómica; interleucina 6; β -2 microglobulina; ubiquitina; factor inhibidor de la migración de macrófagos; ácido retinoico; BMP-4; cofilina; ciclofilina A; FKBP12; NDPK; profilina 1; cistatina C; y calciclina. Por ejemplo, un cóctel cardiogénico puede contener TGF-p1, TGF-p2, BMP-1, BMP-2, BMP-5, BMP-6, FGF- 4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, factor inhibidor de leucemia (LIF), VEGF-C, e interleucina 6.

Cualquier método puede ser usado para hacer un cóctel cardiogénico. Por ejemplo, el medio de cultivo puede ser suplementado con preparaciones de polipéptidos comercialmente disponibles tales como polipéptidos de TEG- β -1 o IL-6 comercialmente disponibles. En algunos casos, un cóctel cardiogénico puede ser obtenido cultivando células endodérmicas ventrales o células similares a las endodérmicas ventrales y recolectando el medio acondicionado resultante, el cual puede contener un cóctel de polipéptidos que tiene la capacidad de causar, por ejemplo, que las células de embriones pierdan su tumorigenicidad y se comprometan en la diferenciación en cardiomiocitos. Las células endodérmicas ventrales pueden ser obtenidas partir de un embrión no humano tal como un embrión de ratón, rata, bovino o porcino. El endodermo puede ser cebado cardiotróficamente por tratamiento del embrión con un agente potenciador cardiotrófico (por ejemplo, un polipéptido de TNF- α) para inducir una expresión incrementada de los componentes del cóctel cardiogénico. En células similares a endodérmicas ventrales representativas incluyen, sin limitación, células de carcinoma de embrión. En algunos casos, los polipéptidos exógenos de IGF-1, IL-6, FGF-4, TGF-p, BMP, LIF y de la trombina (o cualquier combinación de los mismos) pueden ser agregados al medio acondicionado. Por ejemplo, el medio acondicionado al cual se han agregado aproximadamente 50 ng/mL IGF-1, aproximadamente 100 ng/mL IL-6, aproximadamente 10 ng/mL FGF-4, aproximadamente 25 ng/mL TGFp, aproximadamente 5 ng/mL BMP, aproximadamente 100 U/mL LIF, y aproximadamente 40 nM de hatrombina puede utilizarse como cóctel cardiogénico para guiar la cardiogénesis de las células madre (por ejemplo, células madre de embriones).

Después de poner en contacto las células madre (por ejemplo, células madre de embriones) con un cóctel cardiogénico, las células madre pueden diferenciarse en células madre que tienen la capacidad de producir cardiomiocitos y no otro tipo de célula (por ejemplo, una célula tumoral). Tales células pueden ser denominadas como células madre cardiopoyéticas. Las

5 células madre cardiopoyéticas pueden exhibir una translocación nuclear de factores de transcripción cardíaca (por ejemplo, Nkx2.5, MEF2C y GATA4), demostrativo del compromiso definitivo al destino cardíaco. Las células madre cardiopoyéticas también pueden carecer de plasticidad celular, lo cual puede ser demostrado, en parte por la expresión subregulada de marcadores tanto de pluripotencia como de oncogénesis. Las células madre cardiopoyéticas pueden exhibir inhibición por contacto en cultivo, un fenómeno no observado con células madre de embriones pluripotentes. Las células madre cardiopoyéticas pueden representar un estado transicional durante la metamorfosis cardiogénica a partir de un fenotipo de alta relación núcleo a citosol, típico de las células madre de embriones, hacia la adquisición de una estructura de cardiomiocito estriado. A diferencia de su fuente pluripotente o progenie de cardiomiocitos, las células madre cardiopoyéticas pueden exhibir características de compromiso definitivo con el programa cardíaco incluyendo sobrerregulación de los factores de transcripción cardíaca en la ausencia de componentes de excitación-contracción. Las células madre cardiopoyéticas pueden ser altamente proliferativas, probablemente porque no son impedidas por la carga mitótica de la organización sarcomérica.

15 Cualquier método puede ser utilizado para obtener una célula madre que exprese una combinación particular de polipéptidos. Por ejemplo, una célula madre cardiopoyética puede ser obtenida cultivando células madre de embriones con un cóctel cardiogénico. Una vez obtenida, la célula madre cardiopoyética puede ser tratada con oligonucleótidos antisentido, ribozimas, constructos de ARN de interferencia, o una combinación de los anteriores para reducir la expresión de uno o más polipéptidos particulares. En algunos casos, puede utilizarse la tecnología de anulación de gen estándar para hacer células, embriones no humanos, o mamíferos no humanos que carecen de la expresión de uno o más polipéptidos particulares. Tales células, embriones no humanos, y mamíferos no humanos pueden ser utilizados entonces como una fuente de células madre de embrión que pueden ser tratadas con un cóctel cardiogénico para obtener, por ejemplo, células madre cardiopoyéticas que carecen de expresión de uno o más polipéptidos en particular.

20 Cualquier método puede ser utilizado para determinar si una muestra (por ejemplo una muestra biológica tal como un cuerpo embrioide) contiene o no una célula madre que tiene una o más de las características descritas aquí. Por ejemplo, las células pueden ser examinadas utilizando RT-PCR o inmunocitoquímica para determinar si las células expresan o no uno o más de los polipéptidos listados en la tercera columna de la Tabla 1. Los experimentos *in vitro* o *in vivo* similares a los descritos aquí pueden ser utilizados para identificar células madre capaces de diferenciarse en cardiomiocitos sin producir células tumorales.

25 Las células madre descritas aquí pueden ser utilizadas para hacer una composición que contiene células madre. Tal composición puede contener la población enriquecida de células madre descritas aquí. Por ejemplo, una composición puede contener células tales como al menos 3, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o 100 por ciento de las células de la composición y de las células madre descritas aquí. Cualquier método puede ser utilizado para hacer una población enriquecida de células madre. Por ejemplo, pueden utilizarse técnicas de cultivo para expandir una población de células madre en oposición a otras células dentro del cultivo. En algunos casos, pueden utilizarse técnicas de separación (por ejemplo gradientes Percoll) para separar células madre cardiopoyéticas de otras células tales como células madre de embriones y cardiomiocitos. Una composición que contiene una población enriquecida de células madre descritas aquí pueden contener componentes adicionales tales como un cóctel cardiogénico o un medio de cultivo diseñados para mantener el estado de diferenciación de las células madre.

30 Las células madre descritas aquí pueden ser utilizadas para tratar tejido cardiovascular. Por ejemplo, las células madre descritas aquí pueden ser administradas a tejido cardiovascular lesionado (por ejemplo, tejido cardíaco) dentro de un mamífero tal como un humano, mono, caballo, oveja, vaca, cerdo, perro, gato o roedor. Tal tejido lesionado puede ser un tejido dañado por isquemia y/o infarto. En algunos casos, el tejido lesionado puede ser tejido dañado por causas congénitas. En estos casos, las células madre descritas aquí pueden ser administradas inmediatamente después del nacimiento o en estado prenatal.

35 Mientras que no están limitadas a ningún modo particular de acción, las células madre administradas pueden diferenciarse en cardiomiocitos que se incorporan en tejido cardíaco o vascular lesionado, reparando por lo tanto la lesión. En algunos casos, las células madre pueden expresar los polipéptidos listados en la tercera columna de la Tabla 1. Puede utilizarse cualquier método para administrar las células madre a tejido cardiovascular. Por ejemplo, puede usarse un catéter para administrar las células madre a una región lesionada de tejido cardíaco o vascular. En algunos casos, las células madre pueden ser inyectadas directamente en el tejido lesionado o pueden ser colocadas directamente sobre o dentro del corazón si el receptor ya está, por ejemplo, experimentando un procedimiento a corazón abierto.

40 Este documento también describe métodos para tratar tejido cardiovascular con células madre de embriones bajo condiciones en donde los tumores no se desarrollan durante un periodo de tiempo después de la implantación. Tal periodo de tiempo puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más meses. En algunos casos, el periodo de tiempo puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más años. Típicamente, las células madre de embriones pueden ser administradas a un receptor utilizando un número relativamente pequeño de células madre de embriones de tal manera

que las células madre de embriones administradas pueden dar como resultado la producción de células (por ejemplo cardiomiocitos) sin producir células tumorales. Por ejemplo, las células madre de embriones pueden ser administradas en una cantidad menor de aproximadamente 1500 células madre de embriones por mg de tejido cardiovascular (por ejemplo menos de aproximadamente 1400, 1200, 1000, 800, 500 o 300 de células madre de embriones por mg de tejido cardiovascular).

Cualquiera de los métodos descritos aquí para tratar tejido cardiovascular pueden incluir tratamientos adicionales. Por ejemplo, pueden administrarse factores de crecimiento o citoquinas tales como TNF α o γ -interferón o cualquier combinación de los mismos al tejido cardiovascular que está siendo tratado. Los factores de crecimiento o citoquinas pueden ser administrados a tejido cardiovascular antes o después de que son administradas las células madre (por ejemplo, las células madre descritas aquí, células madre de embriones, o una combinación de las mismas). En algunos casos, los factores de crecimiento o citoquinas pueden ser administrados con las células madre (por ejemplo, las células madre descritas aquí, células madre de embriones, o una combinación de las mismas). Mientras que no se limita a ningún modo particular de acción, los factores de crecimiento y las citoquinas tales como TNF α o γ -interferón pueden producir tejido cardiovascular (por ejemplo tejido del corazón) para producir polipéptidos que crean un ambiente favorable para la diferenciación de las células madre en cardiomiocitos sin producir células tumorales.

La invención será descrita adicionalmente en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Materiales y métodos para terapia con células madre de embriones en infarto del miocardio

Células madre de embriones. La línea de células madre de embriones CGR8 murínica fue preparada en medio BHK21 o Glasgow MEM suplementado con piruvato, aminoácidos no esenciales, mercaptoetanol, suero de ternera fetal al 7.5% y el factor inhibidor de leucemia (Meyer et al., 2000, FEBS Lett., 478:151-158; Perez-Terzic et al., 2003, Circ. Res., 92:444-452). Se manipuló un clon de células CGR8 para expresar la proteína fluorescente amarilla (YFP) o la proteína fluorescente cian potenciada (ECFP) bajo el control del promotor de α -actina específico del sistema cardíaco corriente arriba de ECFP utilizando los sitios de restricción *XhoI* y *HindIII* del vector pECFP sin promotor (Clontech). Este constructo del promotor de la α -actina fue lineal lisado utilizando *XhoI*, y sometido a electroporación en células madre CGR8 como está descrito (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Meyer et al., 2000, FEBS Lett., 478:151-158). Para generar imágenes de células madre por microscopía electrónica de barrido con emisión de campo, las células fueron fijadas en solución salina regulada con fosfato que contenía 1% de glutaraldehído y 4% de formaldehído (pH 7.2), se deshidrató con etanol y se secó en un secador de punto crítico. Las células, recubiertas con platino utilizando un sistema de aspersión de haz de iones de argón indirecto ion Tech (VCR Group), operando a voltajes de aceleración de 9.5 kV y 4.2 mA, fueron examinados en un microscopio electrónico de emisión de campo Hitachi 4700 (Perez-Terzic et al., 2001, J. Biol. Chem., 276:20566-20571). Para la microscopía electrónica de barrido por transmisión, las células madre fueron postfijadas en OsO₄ al 1% regulado con fosfato, teñidas en bloc con acetato de uranilo al 2%, deshidratada en etanol y óxido de propileno, y embebidas en resina epoxi de baja viscosidad. Se tiñeron secciones delgadas (90-nm) con citrato de plomo, y las micrografías fueron tomadas en un microscopio electrónico JEOL 1200 EXII (Hodgson et al., 2003, EMBO J., 22:1732-1742).

Cardiomiocitos derivados de células madre. Las células madre de embriones CGR8 fueron diferenciadas *in vitro* utilizando el método de gota colgante previamente establecido para generar cuerpos embrioides (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Maltsev et al., 1994, Circ. Res., 75:233-244). Después de la disociación con enzimas de los cuerpos embrioides, se utilizó el gradiente Percoll para aislar una población altamente enriquecida de cardiomiocitos derivados de células madre como se describe (Perez-Terzic et al., 2003, Circ. Res., 92:444-452). La presencia de marcadores cardíacos en células purificadas fue sondeada mediante microscopía confocal de láser (Zeiss LSM 510 Axiovert) utilizando anticuerpos anti-MEF2C (Cell Signaling Technology) y anti- α actinina (Sigma). La actividad eléctrica de la membrana fue determinada por pinza de parche registrando la configuración de la célula completa utilizando el modo de pinza de corriente o voltaje (Axopatch 1C, Axon Instruments). Los perfiles potenciales de acción y la relación voltaje corriente fueron adquiridos y analizados con el software Bioquest de células superfusionadas con solución Tyrode en (en mM: NaCl 137, KCl 5.4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, glucosa 10; pH 7.4 con NaOH) utilizando pipetas de parche (5-10 MW) que contenían (in mM) KCl 140, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 5, y suplementado con ATP 5 mM (ajustada a pH 7.2 con KOH). Las mediciones electrofisiológicas fueron llevadas a cabo a 31 \pm 1°C, utilizando un controlador de temperatura (HCC-100A, Dagan Corp.) equipado con un Termopaff Peltier (Zingman et al., 2002, J. Biol. Chem., 277:14206-14210). Para establecer la dinámica intracelular Ca²⁺ se cargaron las células con la sonda fluorescente para Ca²⁺ Fluo3-AM (Molecular Probes), escaneado en línea con un microscopio confocal láser Zeiss y se analizaron utilizando un software para imágenes (Zeiss LSM Image Browser) como está descrito (Perez-Terzic et al., 2003, Circ. Res., 92:444-452; Zingman et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:13278-13283).

Modelo de infarto del miocardio. Se indujo infarto del miocardio a las 6 semanas de edad por ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratas Sprague Dawley macho dando como resultado un modelo establecido con un ventrículo izquierdo infartado aproximadamente en 30% (Charles River). Consecuentemente, la fracción de eyección ventricular izquierda fue deprimida desde $75\pm 2\%$ en la línea base hasta $47\pm 3\%$ postinfarto. Los animales infartados fueron aleatorizados en grupos de tratamiento simulado y con células madre de embriones. Ocho semanas después del infarto, los animales fueron anestesiados con isoflurano (3% de inducción, 1.5% de mantenimiento), se llevó a cabo electrocardiografía de 12 cables, y el corazón fue expuesto por toracotomía. Se inyectó medio (20 μ L Glasgow MEM) sin células (simulación) o células madre de embriones CGR8 (3×10^5 en 20 μ L de medio), manipulados para expresar la proteína fluorescente cian potenciada (ECFP) bajo control del promotor de actina específico cardíaco, fueron inyectados a través de una aguja de calibre 28 en tres sitios (en la base ventricular izquierda justo por debajo del atrio izquierdo, en la región anterior media, y en el ápice) a lo largo del límite de las áreas ventriculares izquierdas infartadas.

Electrocardiografía. Se llevó a cabo electrocardiografía de doce cables bajo anestesia con isoflurano utilizando electrodos y agujas subcutáneos (Grass Instruments) y un amplificador electrocardiográfico diferencial (Modelo RPS312, Grass Instruments). Se registraron los cables estándar y aumentados en miembros (I, II, III, aVR, aVL, aVF) así como cables precordiales (V1 - V6) antes de la inyección de la simulación/células madre y serialmente después de la misma.

Ecocardiografía. Bajo anestesia con isoflurano, se obtuvieron dos imágenes ecocardiográficas en modo M bidimensional de la vista de eje corto parasternal con una sonda de 5 MHz en la base ventricular (Vingmed System FIVE, GE Medical Systems). Utilizando la convención de borde de guía de la American Society of Echocardiography, la fracción de eyección (EF) fue calculada como $EF = 100(D^2 - S^2)/D^2$ donde D es el diámetro de la cavidad diastólica terminal y S es el diámetro de la cavidad sistólica terminal (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Hodgson et al., 2003, EMBO J., 22:1732-1742).

Histopatología. En la autopsia se llevó a cabo un examen patológico superficial sobre corazones cortados transversalmente fijados en formalina al 4%, seguido por microscopía de luz de secciones en parafina de 0.5 μ m de espesor teñidas con hematoxilina-eosina (Zingman et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:13278-13283). La fracción de la circunferencia de cámara con cicatriz ventricular izquierda residual postinfarto fue determinada en secciones estandarizadas través de la base ventricular izquierda y el nivel medio del infarto. Se realizó microscopía de fluorescencia (Zeiss) sobre secciones de parafina sin tinción. Para la microscopía electrónica de transmisión, los especímenes de miocardio fueron postfijados en OsO₄ al 1% regulado con fosfato, teñido en *bloc* con acetato de uranilo al 2%, deshidratados en etanol y óxido de propileno, y embebidos en resina epóxica de baja viscosidad. Se cortaron secciones delgadas (90 nm) con un ultramicrotomo (Reichert Ultracut E), se colocaron sobre rejillas de cobre de malla de 200 μ m, y se tiñeron con citrato de plomo. Las micrografías fueron tomadas en un microscopio electrónico JEOL 1200 EXII que operaba a 60 kV (Hodgson et al., 2003, EMBO J., 22:1732-1742).

Estadística. Los valores son expresados como media \pm error estándar. Los grupos tratados con células madre de embriones versus los de tratamiento de simulación fueron comparados utilizando la prueba t de Student con un valor p <0.05 considerado significativo. La prueba de rango logarítmico Wilcoxon fue utilizada para la evaluación no paramétrica de la aleatorización.

Ejemplo 2 – Terapia con células madre de embriones en infarto de miocardio

Potencial cardiogénico de células madre de embriones y administración en un corazón infartado. La colonia de células madre de embriones CGR8, utilizada aquí (Figura 1A), demostró características típicas de células no diferenciadas incluyendo una relación núcleo a citosol alta, nucléolos prominentes y mitocondrias con unas pocas crestas (Figura 1 B). La capacidad cardiogénica de esta línea de células madre de embriones fue sondeada por diferenciación *in vitro*, con células fácilmente derivadas que expresan el factor de transcripción cardíaco MEF2C (Lin et al., 1997, Science, 276:1404-1407), la proteína α -actinina contráctil cardíaca y estrías sarcoméricas (Figura 1C). Consistente con la diferenciación apropiada hacia la línea cardíaca, los cardiomiocitos derivados de las células madre demostraron actividad potencial de acción asociada con corrientes prominentes hacia dentro de Na⁺ y Ca²⁺ (Figura 1D) críticos para el acoplamiento de excitación-contracción manifestado como transientes intracelulares de Ca²⁺ rítmicos (Figura 1E). La inyección de células CGR8 en el miocardio dio como resultado la retención local de estas células madre de embriones (Figura 1F) sin dispersión detectable en tejidos no cardíacos (Figura 1G). Para determinar el resultado de la terapia con células madre para la reparación cardíaca en infarto de miocardio, las ratas fueron asignadas aleatoriamente a grupos de tratamiento con células madre o con simulación. Ocho semanas después de la ligación de la arteria coronaria descendente interior izquierda el infarto fue confirmado por evidencia electrocardiográfica de necrosis del miocardio (Figura 2A), así como por inspección visual directa del miocardio después de una toracotomía (Figura 2B). Las células madre CGR8 de embriones provenientes de la colonia preprobada o de preparaciones acelulares (controles de simulación) fueron inyectadas entonces en la zona del periinfarto (Figura 2B), para establecer el impacto funcional y estructural con el tiempo.

Beneficio funcional sostenido de los corazones infartados tratados con células madre versus los de simulación. La función contráctil cardíaca, establecida por ecocardiografía a las 3 semanas postinyección fue superior en corazones infartados tratados con células madre en comparación con los tratamientos de simulación (Figura 3A). En promedio, la fracción de eyección ventricular izquierda fue de 0.80 ± 0.05 versus 0.52 ± 0.05 en el grupo con células madre versus el de simulación, respectivamente ($p < 0.05$). Además, mientras que los corazones infartados tratados con simulación fallaron en aumentar la función bajo el desafío inotrópico, los corazones infartados tratados con células madre demostraron una respuesta inotrópica positiva significativa. Las pruebas de estrés farmacológico por inyección del agonista β -adrenérgico isoproterenol ($3 \mu\text{g}/\text{kg}$), produjo un incremento de 12% en la fracción de eyección de los corazones infartados tratados con células madre versus la respuesta no significativa observada en el grupo con tratamiento de simulación (Fig. 3A). Las imágenes en modo M bajo estrés demostraron adicionalmente que en contraste con las paredes ventriculares izquierdas anteriores hipocinéticas o acinéticas en corazones infartados tratados con la simulación, los corazones infartados tratados con inyección de células madre exhibe un movimiento de paredes anteriores dinámico con función ventricular vigorosa (Figura 3B). Un seguimiento a largo plazo no encontró descenso en la ventaja contráctil de la terapia con células madre (Figura 4). En efecto, el beneficio del rendimiento contráctil de los corazones infartados tratados con células madre versus el tratamiento de simulación se mantuvo a las 3, 6, 9 y 12 semanas postinyección, de tal forma que a los 3 meses después de la administración de las células la fracción de eyección izquierda fue de $83 \pm 4\%$ y $62 \pm 4\%$, respectivamente ($p < 0.05$; Figuras 4A y 4B). En imágenes en modo M 3 meses postterapia, las anomalías en la dilatación ventricular izquierda y en el movimiento de la pared regional anterior persistieron en el grupo de simulación pero no fueron vistas en el grupo tratado con células madre (Figura 4A). Adicionalmente, la electrocardiografía llevada a cabo 3 meses postterapia reveló en el grupo tratado con células madre un descenso del 33% en el número total de cables anteriores y laterales con ondas Q, reflejando una reducción neta en la necrosis del miocardio ($P < 0.05$), no visto en el grupo de simulación (Figuras 4C-4E). A lo largo del periodo siguiente, los electrocardiogramas en serie no documentaron ectopia ventricular ni los animales experimentaron muerte cardíaca súbita. Así, la administración de células madre de embriones en corazones infartados estuvo asociada con un beneficio funcional en la línea base y con estrés, y fue sostenido durante el seguimiento sin evidencia de proarritmia en este modelo.

Injerto de células madre asociado con cardiogénesis *de novo* y arquitectura del miocardio normalizada. En el examen patológico, el grupo completo de corazones infartados tratados con células madre ($n=4$) demostró una población de miocitos cianofluorescentes dispersados dentro del miocardio anfitrión no fluorescente (Figura 5, filas 1 y 4). Esta población fluorescente, ausente del grupo inyectado con la simulación ($n=3$), indica el origen de las células madre de embriones a través de la expresión de la proteína cian fluorescente bajo el control del promotor de actina cardíaco (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566). En contraste con los corazones infartados tratados con simulación que demostraron una arquitectura ventricular marcadamente alterada con paredes libres adelgazadas y cicatriz fibrótica o áreas con aneurismas que comprendía $34 \pm 11\%$ del ventrículo, la presencia de cardiomiocitos derivados de células madre fue asociada con una remodelación residual adversa de solamente $6 \pm 4\%$ al ventrículo ($p < 0.05$) y una apariencia del miocardio más compatible con el corazón no infartado de control (Figura 5, filas 2-3 y 5-6). Los corazones inyectados con células madre no demostraron infiltrados inflamatorios que de alguna otra manera sugerirían una respuesta inmune hacia las células injertadas (Figura 6A). En magnificación alta, el patrón fluorescente de los cardiomiocitos derivados de células madre reveló estrías sarcoméricas distinguibles que indican el desarrollo del aparato contráctil (Figuras 6B y 6C). Los sarcómeros en el área de infarto de los corazones tratados con células madre demostraron una ultraestructura cardíaca normal por microscopía electrónica, en contraste con las áreas infartadas acelulares de corazones tratados con la simulación (Figuras 6D y 6E). Así las células madre de embriones fueron capaces de incorporarse en el territorio infartado del huésped, demostrar diferenciación cardiogénica y contribuir a la reparación del miocardio.

Los resultados descritos aquí demuestran un impacto favorable estable de la terapia con células madre de embriones. Este se manifestó como un beneficio sostenido sobre el rendimiento contráctil cardíaco y la remodelación ventricular asociados con la cardiogénesis documentada en la zona de infarto a partir de células madre inyectadas. Estos hallazgos indican que la ventaja de la administración de células madre de embriones ocurre de manera temprana, como se evidenció primero en el diseño actual a las 3 semanas postterapia y no está comprometido por un fallo espontáneo de los cardiomiocitos derivados de las células madre y/o por rechazo de este trasplante alogénico por parte del anfitrión. La carencia de efecto de disminución con el tiempo sugiere el potencial del uso terapéutico de células madre de embriones en el manejo crónico de lesiones del miocardio.

Sin estar limitados a ningún modo particular de acción, pueden tenerse en cuenta varios mecanismos potenciales para el beneficio demostrado de la terapia con células madre de embriones. Los cardiomiocitos derivados de células madre de embriones, a través de acoplamiento eléctrico y mecánico con miocardio nativo, podría contribuir a un incremento neto en el tejido contráctil. Los cardiomiocitos derivados de células madre se alinearon con y dentro de las fibras de miocardio anfitriones. En efecto, el miocardio anfitrión había mostrado secretar factores de crecimiento cardiogénico que interactúan en una forma paracrina con receptores sobre las células madre que soportaban la diferenciación cardíaca con expresión de proteínas de unión contráctil cardíaca y de brecha (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Mery et al., 2003, J. Muscle Res. Cell. Motil., 24:269-274). El fallo presente en observar ectopia es adicionalmente consistente con la integración

eléctrica de los cardiomiocitos derivados de células madre y el tejido anfitrión. El efecto de los cardiomiocitos derivados de células madre sobre las propiedades del miocardio activas es evidenciado adicionalmente aquí por una respuesta inotrópica mejorada al reto β -adrenérgico. Un mecanismo potencial sinérgico para la mejora funcional por cardiomiocitos derivados de células madre es a través de la alteración de las propiedades mecánicas pasivas del miocardio (Askari et al., 2003, Lancet, 362:697-703), como se muestra aquí por la aparición limitada de cicatrices y menos dilatación del ventrículo izquierdo en comparación con los corazones infartados tratados con simulación. Esto puede ocurrir a través de la repoblación directa de la cicatriz por cardiomiocitos derivados de células madre, así como por la limitación de una remodelación adversa (Britten et al., 2003, Circulation, 108:2212-2218; Mangi et al., 2003, Nat. Med., 9:1195-201). Además, la fusión celular después del injerto *in vivo* ha sido documentada recientemente con células madre de adulto en tejido no cardíaco, así como con células progenitoras cardíacas en el corazón mismo (Oh et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:12313-12318; Vassilopoulos et al., 2003, Nature, 422:901-904; Wang et al., 2003, Nature, 422:897-901). Mientras que se carece de evidencia directa para la propensión de las células madre de embriones para fusionarse con miocardio residente, tal posibilidad podría en principio contribuir adicionalmente a la reparación cardíaca prestando una capacidad proliferativa al músculo cardíaco anfitrión. De esta manera, la fusión celular complementaría la cardiogénesis *de novo* que ocurre con la diferenciación cardíaca de las células madre. Como mecanismo potencial adicional, podrían surgir directamente otros tipos celulares cardiovasculares a partir de células madre inyectadas o a través del reclutamiento *in situ* llevando a una neovascularización y así a un soporte metabólico aumentado del miocardio anfitrión (Aicher et al., 2003, Nat. Med., 9:1370-1376; Levenberg et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:4391-4396; Yang et al., 2002, J. Appl. Physiol., 93:1140-1151). Mientras que el mecanismo de reparación cardíaca basado en células madre es así probablemente multifactorial, los resultados provistos aquí indican que más bien una reorganización transiente que es de vida corta debido al rechazo o fallo en el trasplante, el beneficio reparador inicial de la terapia con células madre es estable. En efecto, no se encontró evidencia de rechazo de las células trasplantadas a pesar del xenotrasplante de células madre de embrión murínico en corazón de rata. Esta carencia de reacción del anfitrión versus el injerto puede ser dependiente del injerto y/o del anfitrión debido a la baja expresión de antígenos inmunogénicos por células madre, generación de quimerismo mixto, subregulación de respuesta inmune del anfitrión y/o inducción de tolerancia mejorada (Drukker et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9864-9869; Frandrich et al., 2002, Nat. Med., 8:171-178; Lila et al., 2002, Circulation, 105:1949-1954). Finalmente, la diferenciación desorganizada que lleva a la formación de tumores no fue observada, aunque las células madre pluripotentes llevan el riesgo (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Thomson et al., 1998, Science, 282:1145-1147) cuando interactúan con el anfitrión (Erdo et al., 2003, J. Cereb. Blood Flow Metab., 23:780-785). Como se demostró previamente, la protección frente a la tumorigénesis es conferida por el mantenimiento de una señalización en el huésped apropiada que guía la diferenciación específica cardíaca de las células madre previniendo así un crecimiento incontrolado (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Mery et al., 2003, J. Muscle Res. Cell. Motil., 24:269-274).

Así, el beneficio estable y de la terapia con células madre de embriones sobre la estructura y función de miocardio en este modelo experimental soporta el potencial del tratamiento reparativo basado en células madre del infarto de miocardio. Al regenerar el miocardio enfermo y promover la reparación cardíaca, las células madre de embriones proveen una modalidad terapéutica única que tiene el potencial de reducir la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad cardíaca prevalente.

Ejemplo 3 – Materiales y métodos para células madre alogénicas dosificadas para asegurar cardiogénesis

Células madre de embriones y cardiomiocitos derivados. La microscopía electrónica de barrido con emisión de campo fue utilizada para visualizar células madre de embriones murínicos en cultivo (Perez-Terzic et al., 2003, Circ. Res., 92:444-452; Hodgson et al., 2004, Am. J. Physiol., 287:H471-H479). La diferenciación *in vitro* fue lograda utilizando el método de gota colgante para generar cuerpos embrioides a partir de los cuales, después de la disociación enzimática, se aisló una población altamente enriquecida de cardiomiocitos con un protocolo de gradiente de densidad (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Perez-Terzic et al., 2003, Circ. Res., 92:444-452). La expresión de marcadores cardíacos fue sondeada mediante microscopía confocal con láser, con actividad potencial de acción capturada por el método de parche-pinza en el modo de corriente pinza (Hodgson et al., 2004, Am. J. Physiol., 287:H471-H479).

Trasplante de células madre en corazón anfitrión. Para seguir las células trasplantadas *in vivo*, se manipularon células madre de embriones para expresar la proteína fluorescente cian potenciada (ECFP) bajo control del promotor de α -actina específico cardíaco (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Meyer et al., 2000, FEBS Lett., 478:151-158). Utilizando una aguja de calibre 28, se suministraron células madre manipuladas directamente en paredes ventriculares izquierdas saludables o infartadas de ratones o ratas anestesiados con isoflurano, respectivamente (Hodgson et al., 2004, Am. J. Physiol., 287:H471-H479). Los resultados funcionales fueron monitorizados por ecocardiografía 2D de eje corto y en modo M o por registros de presión ventricular utilizando un catéter de micropresión (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Hodgson et al., 2004, Am. J. Physiol., 287:H471-H479; O'Coilain et al., 2004, Hum. Mol. Genet., 13:2505-2518). De cuatro a diez y seis semanas después de la inyección, los corazones fueron seccionados y examinados con microscopía de luz y de campo amplio epifluorescente para establecer la estructura y presencia de cardiomiocitos derivados de las células madre, así como para registrar la actividad eléctrica del miocardio utilizando la técnica electrocardiográfica de 12 cables (Hodgson et al., 2004, Am. J. Physiol., 287:H471-H479).

Estadísticas. Los valores se expresan como media \pm error estándar. Los grupos tratados con células madre de embriones versus los de tratamiento simulado fueron comparados utilizando la prueba t de Student con un valor $p < 0.05$ considerado como significativo. La prueba de clasificación logarítmica Wilcoxon fue utilizada para la evaluación no paramétrica de la aleatorización.

5 Ejemplo 4 – Células madre alogénicas dosificadas para asegurar la cardiogénesis

10 Potencial cardiogénico de células madre de embriones *in vitro*. Una vez establecidas en cultivo, las células madre de embriones tienen la capacidad de diferenciarse a partir de un fenotipo pluripotente a uno cardíaco (Figuras 7A-B). Esto está demostrado aquí puesto que las células derivadas recapitulaban las características de cardiomiocitos típicas incluyendo traslocación nuclear de factores de transcripción cardíacos, el Factor Potenciador de Miocitos Iniciales 2C (MEF2C) y el factor de transcripción de homeodominio (Nkx2.5) que lleva a sarcomerogénesis (Figuras 7B-C) y a formación de potencial de acción asociado con la expresión del canal de Ca^{2+} tipo L (Figuras 7C-E). Así, las células madre de embriones sirven como una fuente basada en células confiable para cardiogénesis de *nov*o.

15 La administración de células madre tituladas asegura la cardiogénesis *in vivo*. La administración de células madre de embriones, manipuladas para hacer seguimiento por fluorescencia *in vivo*, dio como resultado la incorporación en un corazón anfitrión de nuevas células cardíacas fluorescentes cian dentro del área de trasplante de las células madre (Figuras 8A-B). El injerto de cardiomiocitos derivados de células madre fue asociado con morfología (Figuras 8A) y función (Figura 8C, recuadro) cardíacas normales. Fue establecido un umbral en la capacidad del corazón anfitrión para aceptar la implantación de células madre, por encima del cual una carga de células madre excesiva compromete la cardiogénesis postrasplante debido a una diferenciación no controlada que da como resultado tumorigénesis (Figuras 8C-D). Así, el corazón anfitrión tiene una capacidad finita para guiar la cardiogénesis en soporte de la diferenciación e injerto de células madre *in vivo* (Figura. 8E).

20 Reparación de infarto con trasplante de células madre produce resultados estables. Un modelo de infarto de miocardio fue generado por ligación coronaria, dando como resultado una pared aneurismática y cicatrizada anterior con compromiso significativo en el rendimiento cardíaco (Figuras 9A-B). Para probar la eficacia de la regeneración basada en células madre de embriones de un miocardio enfermo, las células madre de embriones manipuladas para generar fluorescencia por cardiogénesis fueron administradas por trasplante directo al miocardio en el área periinfarto (Figura 9C). El examen histopatológico mostró beneficios en los corazones infartados tratados con células madre con áreas de reparación pobladas por células cardíacas fluorescentes que indican una cardiogénesis de *nov*o basada en células madre (Figuras 9D-E). En contraste con miocardio de contracción pobre en corazones infartados no tratados, los corazones tratados con células madre demostraron funcionalidad sincrónica recuperada del músculo cardíaco mediante el seguimiento por ecocardiografía (Figura 10A). La reparación estructural se tradujo en mejora en la fracción de eyección global en el grupo tratado con células madre, un beneficio mantenido durante el periodo de observación de cinco meses, sin evidencia de infiltrados inflamatorios (Figuras 10B-C) o arritmogénesis (Figura 10D).

Ejemplo 5 - Materiales y métodos para la obtención de cardioprogenitores

35 Diferenciación cardíaca dependiente de cuerpos embrioides. Se diferenciaron células madre de embriones murínicos en cuerpos embriónicos, con cardiogénesis monitorizada por epifluorescencia utilizando el anticuerpo de α -actinina (1:1,000) y microscopía en vivo (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566; Perez-Terzic et al., 2003, Circ. Res., 92:444-452). El ARN fue procesado por Q-RT-PCR, en tiempo real utilizando el Light Cycler (Roche) y el kit QuantiTect SYBR Green (Qiagen), para cuantificar Nkx2.5 (cebadores de avance, reversos: 5'-TGC AGA AGG CAG TGG AGC TGG ACA AGC C-3' (SEQ ID NO:1), 5'-TTG CAC TTG TAG CGA CGG TTC TGG AAC CA-3' (SEQ ID NO:2)), MEF2C (5'-AGA TAC CCA CAA CAC ACC ACG CGC C-3' (SEQ ID NO:3), 5'-ATC CTT CAG AGA CTC GCA TGC GCT T-3' (SEQ ID NO:4)), GATA4 (5'-GGA ATT CAA GAT GAA CGG CAT CAA C-3' (SEQ ID NO:5), 5'-TGA ATT CTC AAC CTG CTG GCG TCT TAG A-3' (SEQ ID NO:6)) y β MHC (5'-GCC AAA ACA CCA ACC TGT CCA AGT TC-3' (SEQ ID NO:7), 5'-CTG CTG GAG AGG TTA TTC CTC G-3' (SEQ ID NO:8)) de expresión de ARNm normalizada a β -tubulina (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566).

45 Diferenciación cardíaca libre de cuerpos embrioides. Una población similar a endodermo visceral (Mummery et al., 2003, Circulation, 107:2733-2740) fue derivada a partir de células F9 (ATCC) con ácido retinoico (1 μ M), dbcAMP (0.5 mM) y teofilina (0.5 mM). El medio condicionado fue obtenido después de 24 horas de cultivo para estimular la cardiogénesis de células madre de embriones (cultivadas hasta 100 células/cm²) monitorizado por microscopía confocal.

50 Aislamiento de células madre cardiopoyéticas. A partir de cuerpos embriónicos de 7 días, se aislaron células madre cardiopoyéticas por purificación Percoll y se visualizaron a través de examen confocal por láser utilizando MEF2C (1:400, Cell Signaling Technologies), Nkx2.5 (1:300), GATA4 (1:300, Santa Cruz Biotech), α -actinina (1:1,000, Sigma) y anticuerpos fosfo-Smad3 (1:2,000). Alternativamente cuando se reclutó a partir de una monocapa de células madre de embriones la población cardiopoyética fue enriquecida utilizando un gradiente Percoll de doble interfase para separar cardiomiocitos de

- 5 alta densidad ricos en sarcómeros (Perez-Terzic et al., 2003, *Circ. Res.*, 92:444-452) a partir del fenotipo cardiopoyético pobre en sarcómeros de densidad más baja. La proliferación y pureza de las células madre cardiopoyéticas fue establecida mediante microscopía automatizada de fluorescencia de canal múltiple de alto rendimiento ArrayScan (Cellomics) utilizando anticuerpos de MEF2C y α -actinina, junto con tinción con DAPI. Los perfiles de potencial de acción y las relaciones voltaje-corriente fueron tomados mediante electrofisiología de parche-pinza (Hodgson et al., 2004, *Am. J. Physiol.*, 287:H471-H479). La dinámica del calcio fue seguida, en células cargadas con Fluo 4-AM, utilizando barrido en línea confocal con láser (Perez-Terzic et al., 2003, *Circ. Res.*, 92:444-452; Hodgson et al., 2004, *Am. J. Physiol.*, 287:H471-H479).
- 10 Genómica. Los perfiles de expresión genética comparativos de células madre de embriones versus las cardiopoyéticas o cardiomiocitos, así como el endodermo no cebado versus el cebado con TNF α fueron obtenidos por hibridación con ARNc marcado a la disposición de genoma de ratón 430 2.0 utilizando protocolos estándares (Affymetrix). Los datos fueron obtenidos con un GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix), y analizados con el software GeneSpring (Silicon Genetics). Los conjuntos de población de datos fueron normalizados al fenotipo no diferenciado o no cebado, y la calidad se filtró para eliminar ruido de fondo antes de la aglomeración jerárquica.
- 15 Proteómica. Las células endodérmicas fueron cultivadas con GMEM libre de suero. El medio acondicionado derivado fue centrifugado, filtrado, cuantificado (ensayo de Bradford), concentrado (corte Amicon Ultra 5 kDa), y recuantificado para normalización volumétrica. El equivalente en proteína de 5 ml de medio acondicionado fue resuspendido en regulador de enfoque isoelectrico (IEF) que contenía urea (7 M), tiourea (2 M), CHAPS (2% p/v) y DeStreak (15 mg/ml, Amersham). Las proteínas fueron resueltas en la primera dimensión utilizando bandas IEF de gradiente de pH inmovilizadas (BioRad) a pH 3-10, 4-7 y 6-11, y en la segunda dimensión mediante SDS-PAGE al 7.5% y 15%. Las proteínas, visualizadas por tinción con plata, fueron aisladas, limpiadas de la tinción y digeridas con tripsina (Arrell et al., 2001, *Circ. Res.*, 89:480-487) con péptidos extraídos sometidos a espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida-ionización por electroaspersión (ThermoFinnigan LTQ). Las proteínas fueron identificadas utilizando los algoritmos de búsqueda SEQUEST y Mascot para el minado *in silico* de la base de datos SwissProt database. Las proteínas identificadas fueron cuantificadas posteriormente con un ensayo inmunsorbente enlazado a enzima.
- 20 Trasplante de células madre. Bajo anestesia con isoflurano, una ecocardiografía en ratón con una sonda de 15-MHz (Acuson) fue utilizada para guiar la administración en miocardio de células madre de embriones o cardiopoyéticas manipuladas para seguimiento *in situ* (Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566). El rendimiento cardíaco fue monitorizado por imágenes de ultrasonido en el eje corto parasternal con una sonda en modo M 2D en el eje largo. El análisis de ondas de pulso doppler y por electrocardiografía de 12 cables (Hodgson et al., 2004, *Am. J. Physiol.*, 287:H471-H479), e invasivamente con microcateterización intraventricular (Millar). Para histopatología, el tejido cardíaco recolectado fue fijado durante 1 hora en paraformaldehído al 3%, seccionado en parafina, y sometido a recuperación de antígenos seguida por examen confocal utilizando el anticuerpo CFP para seguimiento celular (1:500, Molecular Probes) en combinación con α -actinina para la visualización de sarcómeros y tinción nuclear con DAPI.
- 30 La sobreexpresión restringida cardíaca transgénica de la citoquina TNF α fue lograda utilizando el promotor de cadena pesada de α -miosina enlazado al transgen TNF α (Sivasubramanian et al., 2001, *Circulation*, 104:826-831). Al perturbar el dominio de quinasa del receptor de TGF- β (Δ TGF β RII) o la sobreexpresión del inhibidor de BMP nogina se utilizó para reducir la capacidad de las células madre de embriones para responder a las claves cardiogénicas (Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566).
- 35 Análisis estadístico. La comparación entre grupos fue llevada a cabo utilizando una prueba t estándar de variables con 95% de intervalos de confianza.

Ejemplo 6 – Obtención de cardioprogenitores y su uso en la terapia con células madre

- 45 A pesar de su proclividad a la cardiogénesis, el riesgo del escape neoplásico de las señales cardiogénicas ha hecho que la terapia con células madre de embriones (ES) sea controvertida, necesitando el descubrimiento de una alternativa segura (Chien et al., 2004, *Science*, 306:239-240; Menasche, 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22:1237-1238; Foley & Mercola, 2004, *Trends Cardiovasc. Med.*, 14:121-125; Kehat et al., 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22:1282-1289; Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566). Dentro de la continuación de la diferenciación celular de embriones, la sobreexpresión de factores de transcripción cardíacos (por ejemplo, Nkx2.5, MEF2C y GATA4) (Srivastava & Olson, 2000, *Nature*, 407:221-226) precedió a la expresión de genes sarcoméricos (por ejemplo, β MHC) distinguiendo el proceso de la predeterminación cardíaca en el cuerpo embrioide temprano (Figura 11 A). La disección del cuerpo embrioide durante esta ventana cardiopoyética descubrió una población de células precursoras que demostró la importación nuclear de factores de transcripción que guían la diferenciación cardíaca por aislamiento a partir de su origen mesodérmico derivado de células madre de embriones (Figuras 11B-C). Las células madre cardiopoyéticas capturadas estaban en ruta a la maduración, experimentando miofibrillogénesis para formar cardiomiocitos con contracción (CM; Figura 11D). La disección ultraestructural con desconvolución a

nanoescala subcalificó el estado transicional de células madre cardiopoyéticas durante la metamorfosis cardiogénica a partir de un fenotipo de alta relación núcleo a citosol, típico de las células madre de embriones, hacia la adquisición de estructura cardíaca estriada (Figuras 11e-f). Con un perfil gen/proteína distinguible de la fuente pluripotente o de la progenie de cardiomiocitos (véase, por ejemplo, Tabla 1), la huella molecular de las células madre cardiopoyéticas indicó un compromiso definitivo con el programa cardíaco (Figuras 11G-H). La subregulación de los marcadores pluripotentes (por ejemplo, Oct4) (Nichols et al., 1998, Cell, 95:379-391) y oncógenos (por ejemplo, BRCA1, MYC) (Shachaf et al., 2004, Nature, 431:1112-1117) junto con la activación de rutas cardiogénicas, que preceden la expresión de la maquinaria de excitación-contracción, aseguraron la conversión desde un estado no diferenciado tumorigénico al acoplamiento en una línea celular específica cardíaca (Figura 11 H).

5

10 Tabla 1. Marcadores presentes en células madre de embriones, células madre cardiopoyéticas, y cardiomiocitos

Gen/nombre de proteína	Expresión ESC	Expresión CSC	Expresión CM
Oct4	++		-
DEK	++	+	-
BRCA1	++	+	-
Ect2	++	+	-
MYC	++	+	-
Fosb	-	+	++
NRAP	-	+	++
MEF2A	-	+	++
Furina	-	+	++
TGB β 1	-	+	++
Receptor α de fibronectina	-	+	++
Receptor 1 de dominio de discoidina	-	+	++
bag2	-	+	++
Proteína rica en cisteína	-	+	++
CUGBP2	-	+	++
NDRG4	-	+	++
Proteína 1 inhibidora CBP/p300	-	+	++
Proteína 1 inducible por interferón	-	+	++
Tropomiosina 1, alfa	-	+	++
Proteína 1 activadora de Rho GTPasa	-	+	++
Carboxipeptidasa D	-	+	++

ES 2 532 909 T3

Profilina 2	-	+	++
Transcripto 1 inducido por el factor beta 1 de transformación de crecimiento	-	+	++
Tropomiosina 1, alfa	-	+	++
Receptor de la hormona de crecimiento	-	+	++
Vinculina	-	+	++
Adenilato ciclasa 6	-	+	++
Proteína A1 de enlazamiento de calcio S100	-	+	++
Tropomiosina 2, beta	-	+	++
Proteína 1 de enlazamiento de retinol, celular	-	+	++
Moesina	-	+	++
Anexina A6	-	-	++
Factor de crecimiento de tejido conectivo	-	-	++
Smad6	-	-	++
Canal de Na ⁺	-	-	++
Canal de Ca ²⁺ tipo L	-	-	++
Ca ²⁺ ATPasa	-	-	++
MLC2V	-	-	++
MLC2a	-	-	++
α-MHC	-	-	++
α-actina	-	-	++
α-actinina	-	-	++
Troponina T2	-	-	++
Titina	-	-	++
Proteína 2A integral de membrana	-	++	-
Proteína 4 de enlazamiento del factor de crecimiento similar a insulina	-	++	-
Antígeno 1 de célula de timo, theta	-	++	-
Selenoproteína P, plasma, 1	-	++	-
Glicoproteína 38	-	++	-

ES 2 532 909 T3

Sustrato 8 de la ruta del receptor del factor de crecimiento epidérmico	-	++	-
Proteína 1A de choque por calor	-	++	-
Proteína 1 de enlazamiento de ácido retinoico celular	-	++	-
8 específica de placenta	-	++	-
Matriz de metaloproteínasa 2	-	++	+
Glicoproteína rica en cisteína ácida secretada	-	++	+
Manosidasa 1, alfa	-	++	+
Lectina, enlazamiento de galactosa, soluble 1	-	++	+
Proteína A6 de enlazamiento a calcio S100 (calciclina)	-	++	+
Epóxido hidrolasa 1, microsómica	-	++	+
1 similar a gen de adenoma pleiomórfico	-	++	+
Factor 2 de crecimiento similar a insulina	-	++	+
Proteína 4 similar a proteína Tubby	-	++	+
Proteína prion	-	++	+
Proteína 10 de enlazamiento a FK506	-	++	++
Ciclina D2	-	++	++
Reticulocalbina 3, dominio de enlazamiento a calcio del lado EF	-	++	++
Selenoproteína M	-	++	++
Inhibidor 1A (P21) de quinasa dependiente de ciclina	-	++	++
Caldesmon 1	-	++	++
Beta 1 integrina (receptor beta de fibronectina)	-	++	++
Transcoblina 2	-	++	++
Anexina A2	-	++	++
Inhibidor 1A (P21) de quinasa dependiente de ciclina	-	++	++
Trombospondina 1	-	++	++
Monocito para macrófago asociado con	-	++	++

diferenciación			
Receptor AXL de tirosina quinasa	-	++	++
Anexina A5	-	++	++
2 similar a enlazamiento a músculo	-	++	++
Anexina A1	-	++	++
Procolágeno, tipo IV, alfa 1	-	++	++
Calpaina 2	-	++	++
Proteína 1 de membrana epitelial	-	++	++
Proteasa, serina, 11	-	++	++
Tropomiosina 2, beta	-	++	++
Lectina, enlazamiento a galactosa, soluble 9	-	++	++
Anexina A3	-	++	++

5 En el embrión, la transformación cardíaca del mesodermo requiere señalización endodérmica (Foley & Mercola, 2004, Trends Cardiovasc. Med., 14:121-125; Srivastava & Olson, 2000, Nature, 407:221-226). La cardiopoyesis fue alojada en
 10 cuerpos embrioides por la reprogramación del factor alfa de necrosis tumoral de citoquina (TNF α) (Locksley et al., 2001, Cell, 104:487-501), según se demostró a través de la expresión sobreexpresada de los factores de transcripción, aceleración
 15 de la cardiogénesis y contenido cardíaco incrementado (Figuras 12A-D). El máximo entre el día 2 y el día 5 de la diferenciación de los cuerpos embrioides (Figura 12E), el efecto de TNF α sobre la cardiogénesis manifestado como una
 duplicación de la concentración de proteína dentro del secretoma endodérmico (Figura 12F). La aplicación del medio
 20 condicionado derivado de la diferenciación vigorosa guiada por el endodermo cebado con TNF α de células madre de
 embriones pluripotentes directamente en células madre cardiopoyéticas, eliminando la necesidad de tránsito a través de un
 cuerpo embriode (Figuras 12G-J). Las células madre cardiopoyéticas derivaron en actividad mitótica mantenida
 25 extraembrión, expansión y resiliencia clonal a estrés hipóxico (5% de O₂), remanentes de su fuente embrionaria, si bien
 adquirieron inhibición por contacto y pudieron generar reproduciblemente sarcómeros para completar el programa cardíaco
 (Figura 12K). De esa manera, las células madre cardiopoyéticas proveyeron una fuente renovable que produjo
 30 cardiomiocitos funcionales con transientes de calcio, corriente de iones y actividad potencial de acción, demostrativa del
 fenotipo cardíaco sin evidencia de desdiferenciación (Figuras 12L-O).

La amplificación por TNF α de la cardiopoyesis (Figuras 12F-J) fue debida a una redistribución del contenido de proteína
 20 secretada endodérmica (Figuras 13A-D). En particular, un cóctel de más de doce proteínas dentro del secretoma
 endodérmico fue encontrado subregulado, variando desde factores involucrados en la sarcomerogénesis (profilina, cofilina)
 (Obinata et al., 1997, Cell Struct. Funct., 22:181-189; Mohri et al., 2000, J. Muscle Res. Cell. Motil., 21:49-57), señalización
 25 de calcio (calciclina) (Edgeworth et al., 1989, Nature, 342:189-192), reprogramación del miocardio (NDPK) (Lutz et al., 2004,
 Methods Enzymol., 390:403-418) y formación cardíaca (FKBP12, cistatina, ubiquitina) (Xin et al., 2002, Nature, 416:334-338;
 Smart et al., 2002, Gene Expr. Patterns, 2:61-67; Kwon et al., 2002, Science, 297:96-99) hasta factores de crecimiento
 30 cardiogénicos potentes incluyendo miembros de la superfamilia TGF- β y FGF (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566;
 Mummery et al., 2003, Circulation, 107:2733-2740), catalogados por sondeo proteómico y/o genómico (Figuras 13A-D). La
 cuantificación de proteínas secretadas por el endodermo confirmó el perfil generado del cóctel cebado por TNF α ,
 ejemplificado por el ensayo inmunosorbente enlazado a enzimas de TGF- β cuyos niveles fueron corroborados
 adicionalmente por activación de la señalización intracelular de P-Smad3 (Daniels et al., 2004, J. Clin. Invest., 114:1308-
 1316) en células madre que experimentan cardiopoyesis (Figuras 13E-F). La suplementación del medio acondicionado no
 cebado derivado de endodermo con TGF- β , titulado para coincidir con la sobreexpresión inducida por TNF α , estimuló a las
 células madre cardiopoyéticas purificadas para proliferar y diferenciarse (Figuras 13G-H). La identificación de los
 componentes dentro del secretoma endodérmico facilitó así la manipulación de la cardiopoyesis, facilitando la conmutación
 de la pluripotencia a la transformación cardiogénica para la producción a macroescala de células madre cardiopoyéticas *ex vivo*.

El valor terapéutico del uso de las células madre cardiopoyéticas fue establecido *in vivo* por trasplante guiado por ecocardiografía. Cargas de $\leq 3 \times 10^5$ células pluripotentes por corazón llevó a la incorporación de cardiomiocitos derivados de células madre de embriones en músculo cardíaco correceptor (Figuras 14a-c), pero los incrementos en la dosis celular precipitaron la invasión neoplásica (Figuras 14D-F) demostrando el bajo índice terapéutico del tratamiento basado en células madre de embriones. En contraste, la administración de $\geq 3 \times 10^6$ células madre cardiopoyéticas, reclutadas *in vitro* a partir de una monocapa de células madre de embriones utilizando el cóctel cardiogénico identificado aquí (Figura 14G), dio como resultado el acoplamiento electricomecánico en el corazón receptor con rendimiento contráctil robusto que refleja el alineamiento exitoso de las células trasplantadas dentro del miocardio (Figuras 14H-J). En efecto, las células madre cardiopoyéticas trasplantadas experimentaron de manera reproducible diferenciación cardíaca e inserción extensiva dentro del miocardio anfitrión, sin evidencia de formación de tumores por examen histopatológico (Figuras 14K-M). En efecto, el uso de células madre cardiopoyéticas sobrepasó los resultados terapéuticos máximos obtenibles con la administración de células madre de embriones (Figura 14N). El impedimento de la cardiopoyesis a través de la ablación genética de la capacidad de las células madre para reconocer los componentes del cóctel (por ejemplo TGF β /BMP) exageró el riesgo de tumorigenesis (Figura 14o). Por el contrario, la sobreexpresión de TNF α transgénico restringido cardíaco (TNF α -TG) aumentó la capacidad cardiogénica del corazón anfitrión (Figura 14o recuadro) y redujo el riesgo de carcinogénesis por trasplante de células madre de embriones (Figura 14o), demostrando que el mimetismo de la cardiopoyesis puede ser logrado *in situ*.

La promesa de células madre de embriones en esta era de la medicina regenerativa ha permanecido sin satisfacer, limitada por la propensión a la transformación carcinogénica inherente a la pluripotencia. Este impase, que evita la aplicación terapéutica, ha sido resuelto aquí por reclutamiento específico del linaje de un intermediario derivado de células madre de embriones para servir como una alternativa segura y eficaz. El paradigma de perfeccionar la plasticidad celular para anular el riesgo maligno provee así de un medio mediante el cual se evitan los inconvenientes de la terapia con células madre de embriones.

Ejemplo 7 – Componentes de un cóctel cardiogénico

Con base en los experimentos antes descritos, se determinaron los siguientes componentes para ser derivados endodérmicos: caspasa-4; ligando 1 de quimioquina; ligando 2 de quimioquina; ligando 5 de quimioquina; ligando 7 de quimioquina; ligando 11 de quimioquina; ligando 20 de quimioquina; hepatoglobina; factor 1 estimulador de colonias; lectina; colesterol 25-hidroxilasa; syntaxina 8; syntaxina 11; ceruloplasmina; componente 1 de complemento; componente 3 de complemento; factor de crecimiento derivado de plaquetas; integrina alfa 6; lipasa 1 ácida lisosómica; factor inhibidor de leucemia; factor 1 de crecimiento de insulina; interleucina 6; beta-2 microglobulina**; ubiquitina; factor inhibidor de la migración de macrófagos; ácido retinoico; TGF- β 1; TGF- β 2; BMP1; BMP2; BMP4; BMP5; BMP6; FGF4; FGF5; FGF12; FGF13; FGF15; FGF20; VEGF C; cofilina; ciclofilina A; FKBP12; NDPK; profilina 1; cistatina C; calciclina; y ubiquitina.

Se generó un cóctel cardiogénico que contenía la cantidad indicada de cada componente: TGF- β 1 (2.5 ng/ml); TGF- β 2 (2.5 ng/ml); BMP-1 (5 ng/ml); BMP-2 (5 ng/ml); BMP-5 (5 ng/ml); BMP-6 (5 ng/ml); FGF-4 (10 ng/ml); FGF-5 (10 ng/ml); FGF-12 (10 ng/ml); FGF-13 (10 ng/ml); FGF-15 (10 ng/ml); FGF-20 (10 ng/ml); factor inhibidor de leucemia (1000 U/ml); VEGF-C (15 ng/ml); e interleucina 6 (100 ng/ml).

Los siguientes componentes fueron agregados de manera exógena al derivado de endodermo descrito más arriba. IGF-1 (50 ng/ml); IL-6 (100 ng/ml); FGF-4 (10 ng/ml); TGF β (25 ng/ml); BMP (5 ng/ml); LIF (100 U/ml); y α -trombina (40 nM).

En resumen, el cóctel cardiogénico descrito aquí contiene 54 componentes; 47 componentes que son derivados de endodermos y 7 componentes que son agregados por vía exógena.

Ejemplo 8 – Materiales y métodos adicionales

Cultivo de células madre de embriones y diferenciación del cuerpo embriode. Las líneas de células madre embrionarias murínicas pluripotentes (por ejemplo, CGR8, D3, 129 y R29) fueron propagadas en medio GMEM con piruvato, aminoácidos no esenciales, mercaptoetanol, suero de ternera fetal al 7.5% (FCS) y factor inhibidor de la leucemia (LIF, ESGRO), tal como fue descrito (Terzic et al., 2003, *Circ Res.*, 92:444-452; Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566). Las células fueron divididas cada dos días para mantener el estado no diferenciado o diferenciado utilizando el método de "gota colgante" (Terzic et al., 2003, *Circ Res.*, 92:444-452; Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566). Las gotas de medio diferenciación (GMEM con selenio, piruvato, aminoácidos no esenciales, mercaptoetanol, FCS al 20%, sin LIF) que contenían células madre de embriones, fueron colocadas durante dos días en una placa tapa para permitir la organización del cuerpo embriode. Los cuerpos embrioides, suspendidos durante tres días, fueron sembrados sobre placas recubiertas con gelatina durante siete días. La formación de áreas de contracción en el mesodermo fueron monitorizadas con microscopía, estableciéndose el contenido cardíaco mediante el anticuerpo de α -actinina sarcomérico cardíaco monoclonal (Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566).

Disociación y caracterización embriode. Los cuerpos embrioides, en diferentes etapas de diferenciación, fueron desprendidos de las placas con tripsina al 0.05%, y disociados utilizando 1 mg/ml de colagenasa (CLSII, Worthington) y 0.25 mg/ml de pancreatina en (en mmol/L) NaCl 117, HEPES 20, NaH₂PO₄ 1.2, KCl 5.4, MgSO₄ 1 y glucosa 5 (pH 7.35) (Terzic et al., 2003, *Circ Res.*, 92:444-452). Las suspensiones de células de cuerpos embrioides fueron caracterizadas en cuanto al contenido de progenitores mediante sondeo inmunofluorescente confocal además de microscopía con vídeo. La purificación de células madre cardiopoyéticas y de cardiomiocitos fue lograda a través del uso de un gradiente de densidad Percoll de dos capas discontinuo con base en sus propiedades masa a volumen (cardiomiocitos - D=1.07/1.09; cardiopoyéticos-D=1.07/1.09 primero, luego D=1.05/1.09). La misma metodología puede ser aplicada para purificar células madre cardiopoyéticas y cardiomiocitos siguiendo la diferenciación guiada de monocapas de células madre de embriones. Para monitorizar la división celular, las células purificadas fueron cultivadas en una cámara a temperatura y gas controlados (37°C, 5% de CO₂), dispuesta sobre la platina de un microscopio acoplado con cámara CCD, con adquisición seriada de imágenes de contraste de fases.

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Las células madre de embriones, las células madre cardiopoyéticas y los cardiomiocitos derivados, cultivados sobre portaobjetos fueron enjuagados con solución salina regulada con fosfato (PBS), fijados en paraformaldehído al 3% (PFA) y permeabilizados con 0.1% de TritonX-100. Para prevenir la tinción no específica, las láminas fueron incubadas con un regulador de bloqueo (Superblock™, Pierce Biotech) después de la fijación. El regulador de bloqueo fue retirado, y los anticuerpos fueron agregados (Nkx2.5 1:400; MEF2C 1:500; GATA4 1:300; α -actinina 1:1000; canal de Ca²⁺ tipo L 1:400; Cx43 1:500; Kir6.2 1:500; GFP 1:400) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, los anticuerpos primarios fueron enjuagados utilizando regulador, y se aplicaron los anticuerpos secundarios conjugados con ALEXA (1:500). El anticuerpo secundario fue enjuagado utilizando regulador de lavado y el ADN con tinción con DAPI fue incubado antes del montaje. La excitación fluorescente de los componentes celulares teñidos fue lograda mediante el uso concurrente de líneas de láser UV (350-370 nm), Arg/Kry (488 nm), y HeNe (568, 633 nm) para microscopía confocal basada en Meta multicolor (Zeiss). Las imágenes adquiridas fueron analizadas utilizando el software Axioplan (Zeiss). Adicionalmente, la proliferación de células madre cardiopoyéticas y su pureza fue establecida mediante microscopía automatizada de fluorescencia multicanal de alto rendimiento ArrayScan (Cellomics) utilizando los anticuerpos MEF2C y α -actinina, junto con la tinción con DAPI.

Aislamiento de ARN y perfil genómico. El ARN total fue aislado a partir de los cuerpos embrioides, así como de células madre de embriones y luego fue derivado a partir de células madre cardiopoyéticas y de la progenie de células cardíacas utilizando el kit de aislamiento Micro-to-Midi (Invitrogen). El ARN total también fue obtenido a partir de las células endodérmicas cebadas con TNF α y no cebadas. Las muestras de ARN fueron analizadas utilizando microarreglos Affymetrix en donde los perfiles de expresión genética comparativos de los cuerpos embrioides, así como las células madre de embriones versus las cardiopoyéticas o de cardiomiocitos, y en estudios separados endodermos no cebados versus cebados con TNF α fueron obtenidos mediante hibridización de ARNc al genoma de ratón 430 2.0 con el arreglo utilizando protocolos estándar (Affymetrix). Los datos fueron adquiridos con un GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix), y analizados con el software GeneSpring (Silicon Genetics). Los conjuntos de población de datos fueron normalizados al fenotipo no diferenciado o no cebado y filtrados por calidad para eliminar ruido de fondo antes de la aglomeración jerárquica. Los datos fueron confirmados sometiendo el ARN total de la muestra a Q-RT-PCR en tiempo real, utilizando cebadores que especifican la identidad de cada gen (Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566).

Electroforesis en gel en dos dimensiones. Para resolver el fenotipo proteómico de células madre cardiopoyéticas versus su fuente y progenie las proteínas celulares fueron solubilizadas utilizando regulador de enfoque isoelectrico (IEF) (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2%, con concentraciones de proteína determinadas por ensayo de proteínas. La electroforesis en gel bidimensional (2-DE) fue llevada a cabo en la primera dimensión (IEF) utilizando una celda Protean® IEF (Bio-Rad). Las muestras de proteína fueron agregadas a 300 μ l de regulador IEF, suplementadas con DTT (ditiotreitól) y anfolitos (Bio-Rad), y luego fueron tomadas por rehidratación activa en Ready Strips™ inmovilizados con gradiente de pH (IPG) (bandas de gradiente lineal de 170 mm, pH 3-10 o 4-7, Bio-Rad) a 50 voltios (V) durante 10 horas. Siguió luego la IEF, utilizando una serie de etapas de rampa de voltaje rápidas durante 15 minutos cada una a 100, 500, y 1000 V, seguidas por 10000 V para 60 kiloV-h. Una variación de este proceso utilizando rehidratación pasiva fue utilizada para IEF de proteínas básicas (pH 6-11). Antes de la electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida en segunda dimensión (SDS-PAGE), las bandas IPG enfocadas fueron equilibradas en un proceso de dos etapas para asegurar la solubilidad de la proteína, primero por incubación en regulador de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8.8, urea 6 M, glicerol al 30% v/v, SDS al 2% p/v), suplementado con 10 mg/ml de DTT, seguido por incubación en regulador de equilibrio suplementado con 25 mg/ml de yodo acetamida. Las bandas fueron enjuagadas entonces con regulador SDS-PAGE (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, SDS al 0.1% p/v), y las proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE al 12.5% utilizando un sistema Protean® II Xi (Bio-Rad). Después de la SDS-PAGE, los geles de 2-D fueron teñidos con plata para compatibilidad con el análisis subsecuente de proteína por espectrometría de masas (Shevchenko et al., 1996, *Anal. Chem.*, 68:850-858). Utilizando el software de análisis de gel proPDQuest 2-D (Bio-Rad), los geles teñidos con plata fueron barridos, detectándose las manchas de proteína, cuantificándose, comparándose con manchas en otros geles, normalizándose y analizándose estadísticamente para determinar la presencia y grado de cambios en los perfiles de expresión de proteína en las diferentes etapas de la

diferenciación cardíaca. Las manchas de proteína de interés fueron aisladas y desteñidas (Gharahdaghi et al., 1999, Electrophoresis, 20:601-605) para asegurar la remoción de plata, luego se digirieron con tripsina, se extrajeron, se secaron bajo vacío y se almacenaron a -20°C para el análisis espectrométrico de masas.

5 Espectrometría de masas en tándem. Los péptidos trípticos aislados a partir de manchas en gel de 2-D individuales fueron reconstituidos y resueltos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) sobre una columna de fase reversa (RP) C18. Los péptidos fueron eluidos de la columna de RP-HPLC con un gradiente creciente de acetonitrilo, y electroasperjados en un espectrómetro de masas de trampa de iones Finnigan LCQ Deca (Thermo Finnigan). Los espectros de los péptidos eluidos fueron adquiridos en una forma dependiente de datos adquiriendo primero un barrido de MS completo a partir de m/z (relación masa/carga) 150 a 2000 seguido por barridos MS/MS hasta m/z 2000 para determinar la secuencia de aminoácidos después de la disociación inducida por colisión de los péptidos que proveen los iones más intensos del barrido de MS completo previo. Los espectros MS/MS fueron comparados contra las bases de datos no redundantes SwissProt o NCBI utilizando los algoritmos de búsqueda SEQUEST y Mascot para buscar tanto los estados de carga 2+ y 3+ de los péptidos fragmentados. Los resultados de cada algoritmo fueron referenciados de manera cruzada, proveyendo un análisis más robusto de lo que lo haría el algoritmo solo (Sadygov et al., 2004, Nature Meth., 1:195-202).

15 Inmunoprecipitación Western. La expresión de proteínas individuales fue sondeada después de la recolección celular utilizando 100 µl de regulador RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-10 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%, pH 8.0) que contenía inhibidores de proteasa. Las muestras fueron ensayadas en cuanto a la concentración de proteínas y se creó una solución de reserva de trabajo que contenía 4 mg/ml diluyendo la muestra en un regulador Laemmli 2x. Las muestras fueron calentadas a 95°C y se cargaron 40-60 µg de proteína total sobre un gel de SDS-PAGE al 10% y se sometió a electroforesis. Las proteínas fueron transferidas sobre membranas de nitrocelulosa utilizando condiciones de transferencia semiseca o húmeda. Después de la transferencia, las membranas fueron incubadas con 10 ml de regulador de bloqueo (1x TBS, Tween-20 al 0.1%, leche en polvo desnatada al 5% (p/v), pH 7.5) a temperatura ambiente y luego se incubaron con un anticuerpo primario (1:1,000) diluido en solución primaria (1x TBS, Tween-20 a 0.1%, leche en polvo desnatada al 1% (p/v), pH 7.5). El anticuerpo secundario (1:10,000) constituido en la solución primaria fue agregado al día siguiente después de enjuagar el primario con regulador de lavado (1x TBS, Tween-20 al 0.1%, pH 7.5). Las inmunoprecipitaciones Western fueron desarrolladas utilizando el kit de quimioluminiscencia Pierce y visualizadas utilizando un UVP Bioimager.

30 Parche-pinza. La actividad eléctrica de la membrana fue determinada por el registro mediante parche-pinza en la configuración de celda total utilizando el modo corriente- o voltaje-pinza (Axopatch 1C, Axon Instruments). Los perfiles potenciales de acción y la relación voltaje-corriente fueron tomados y analizados con el software Bioquest de las células en diferentes etapas de diferenciación y maduración cardíaca, superfusionadas con solución Tyrode (en mM: NaCl 137, KCl 5.4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, glucosa 10; pH 7.4 con NaOH) utilizando pipetas de parche (5-10 MΩ) que contenía (en mM) KCl 140, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 5, y suplementado con ATP 5 mM (pH 7.2 ajustado con KOH). Las mediciones electrofisiológicas fueron llevadas a cabo a 31±1°C utilizando un controlador de temperatura (HCC-100A, Dagan Corp.) equipado con un termopad Peltier (1,10).

40 Imágenes de calcio. Las imágenes confocales bidimensionales (Zeiss LSM 510 Axiovert) de células madre que experimentaban transformación y maduración cardíaca, y cargadas con la sonda Ca²⁺ fluorescente Fluo3-AM (Molecular Probes), fueron adquiridas mediante microscopía confocal con láser con la línea 488 nm de un láser argón/criptón. Las imágenes fueron sometidas a desconvolución y analizadas utilizando el software Metamorph (Visitron Universal Imaging) (Terzic et al., 2003, Circ Res., 92:444-452; Hodgson et al., 2004, Am. J. Physiol., 287:H471-H479).

45 Microscopía electrónica de transmisión/barrido con emisión de campo y de fuerza atómica. Células en diferentes etapas de diferenciación cardíaca fueron fijadas en PBS con glutaraldehído al 1% y formaldehído al 4% (pH 7.2). Para la microscopía electrónica transmitida (TEM) las células fueron procesadas en OsO₄ al 1% regulado con fosfato, teñidas con acetato de uranilo al 2%, deshidratadas en etanol y óxido de propileno, y embebidas en resina epóxica. Se colocaron secciones delgadas (90-nm) en rejillas de cobre, se tiñeron con citrato de plomo, y se tomaron micrografías con un microscopio electrónico JEOL (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566). Para la microscopía electrónica de barrido con emisión de campo (FESEM), la membrana de plasma fue depurada utilizando una solución hipotónica y Tritón X-100 al 1%. Las células depuradas de la membrana o los cuerpos embrioides completos fueron fijados con glutaraldehído al 1% y formaldehído al 4% en PBS. Los especímenes fueron enjuagados en PBS con osmio al 1%, deshidratados con etanol y secados en un secador de punto crítico (Ted Pella). Recubiertas con platino, las muestras fueron examinadas sobre un microscopio de barrido Hitachi. La microscopía de fuerza atómica en modo de contacto (AFM) fue llevada a cabo con puntas de nitrato de silicio NP-S (constante de depuración: 0.58 N/m) utilizando un controlador Nanoscope III (Digital Instruments) (Behfar et al., 2002, FASEB J., 16:1558-1566). Las células depuradas de membrana de plasma fueron fijadas *in situ* y enjuagadas con agua nanopura y secadas con aire. Se utilizó un escáner tipo E, con frecuencias de barrido lineales (5-15 Hz) para construir imágenes de AFM de 512x512 píxeles. Los datos fueron analizados con el software Nanoscope IIIa, y las imágenes tridimensionales se generaron a partir de la información de altura topográfica.

- 5 Seguimiento de células *in vivo*. Los clones de células madre de embriones fueron manipulados para expresar bien sea la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína fluorescente cian potenciada (ECFP) o la lacZ citosólica (o nuclear) bajo el control del promotor de α -actina o α -miosina específico cardíaco corriente arriba del gen reportador (Clontech). Para seguir el destino de las células, los genes reportadores fueron subclonados corriente abajo del promotor 5'LTR del virus de las células madre murínicas modificadas (MSCV) o el promotor de la fosfoglicerato quinasa murínica (PGK), para una expresión estable y robusta postrasplante. Los constructos fueron linealizados, e introducidos en células madre de embriones por transfección con lipofectamina (Invitrogen) (Terzic et al., 2003, *Circ Res.*, 92:444-452; Behfar et al., 2002, *FASEB J.*, 16:1558-1566). Alternativamente, el gen reportado fue empacado en un sistema retroviral MMLV para una incorporación de alto rendimiento en las células madre de embriones.
- 10 Modelo de infarto del miocardio. El infarto fue generado por ligazón de la arteria coronaria izquierda (LCA) después de intubación endotraqueal, ventilación y toracotomía en ratones, C57BL/6. La oclusión coronaria fue confirmada por inspección aguda del cambio de color de la pared del ventrículo izquierdo, y elevación ST en el electrocardiograma antes del cierre del tórax. Los ratones operados en simulación sufrieron el mismo procedimiento quirúrgico sin ligazón de LCA. Esta experiencia revela una mortalidad <10% relacionada con la cirugía. Los ratones infartados recibieron diversos regímenes de
- 15 células madre, y fueron seguidos durante 1 a 12 meses. En un conjunto separado de experimentos, ratones deficientes en canales de K_{ATP} , generados por perturbación direccionada del gen Kir6.2 y retrocruzados durante cinco generaciones con un fondo C57BL/6, serán comparados con ratones de control coincidentes en edad y sexo (Seino & Miki, 2003, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 81:133-176). Todos los ratones reciben alimentación estándar, con un ciclo de 12 horas día/noche y fueron observados diariamente hasta la terminación de los estudios.
- 20 Función cardíaca. La fracción de eyección ventricular izquierda y el acortamiento fraccional fueron cuantificados por ecocardiografía en el animal despierto (Acuson c256) (Kane et al., 2004, *Diabetes*, 53:S169-175). Los registros de presión ventricular izquierda *in vivo* se miden de manera invasiva mediante un catéter de micropresión 1.4-F (SPR-671, Millar Instruments) después de la incanulación arterial carótida y avance a través de la válvula aórtica.
- 25 Remodelación cardíaca. Las dimensiones de la cámara ventricular izquierda y el espesor de la pared fueron cuantificadas *in vivo* por ecocardiografía transtorácica en ratones despiertos con un transductor lineal a 15-MHz (Acuson c256) (Kane et al., 2004, *Diabetes*, 53:S169-175). El peso total del corazón, y el ventrículo izquierdo incluyendo el septum (LV) fueron pesados *ex vivo* y normalizados al peso corporal. El LV fue entonces: i) fijado en formalina al 10%, embebido en parafina, y teñido con hematoxilina/eosina y tricromo de Masson para microscopía de luz. El área transversal de los miocitos, la fibrosis intersticial y perivascular fueron cuantificadas utilizando el software MetaMorph; ii) la ultraestructura de los miocitos fue examinada por microscopía electrónica de transmisión/barrido; iii) los miocitos fueron teñidos para marcación terminal en muesca de dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa (TUNEL) y caspasa 3, y experimentaron una prueba de escalamiento de ADN para apoptosis; iv) el contenido de colágeno en el miocardio fue medido por el ensayo de hidroxiprolina.
- 30 Electrocardiografía. Los electrocardiogramas fueron registrados teleméricamente en ratones conscientes sin ataduras a partir de trasmisores implantados quirúrgicamente (Data Sciences International) (Terzic et al., 2003, *Circ Res.*, 92:444-452; 10). Además, los electrocardiogramas de superficie con 12 cables fueron registrados en ratones anestesiados ligeramente con isoflurano.
- 35 Análisis estadístico. La comparación de los parámetros entre grupos distribuidos normalmente fue llevada a cabo utilizando la prueba t de Student o el análisis de varianza. La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada para comparar los datos no paramétricos. El procedimiento del rango múltiple de Duncan fue utilizado para ajustar comparaciones múltiples. El análisis de Kaplan-Meier con la prueba de calificación logarítmica fue empleado para el análisis de supervivencia. Una diferencia en $p < 0.05$ se considera significativa.
- 40

Reivindicaciones

1. Un método para hacer un cóctel cardiogénico, que comprende:

(a) cultivar células endodérmicas ventrales en un medio, en donde dichas células son obtenidas de un embrión tratado con TNF-alpha con la condición de que el embrión no es un embrión humano;

5 generando por tanto un medio de cultivo condicionado; y

(b) recolectar el medio de cultivo condicionado, obteniendo por lo tanto un cóctel cardiogénico.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: agregar uno o más componentes a dicho cóctel cardiogénico, en donde dichos uno o más componentes son seleccionados del grupo consistente de IGF-1, IL-6, FGF-4, TGF- β , BMP, LIF y α -trombina.

10

FIGURA 1

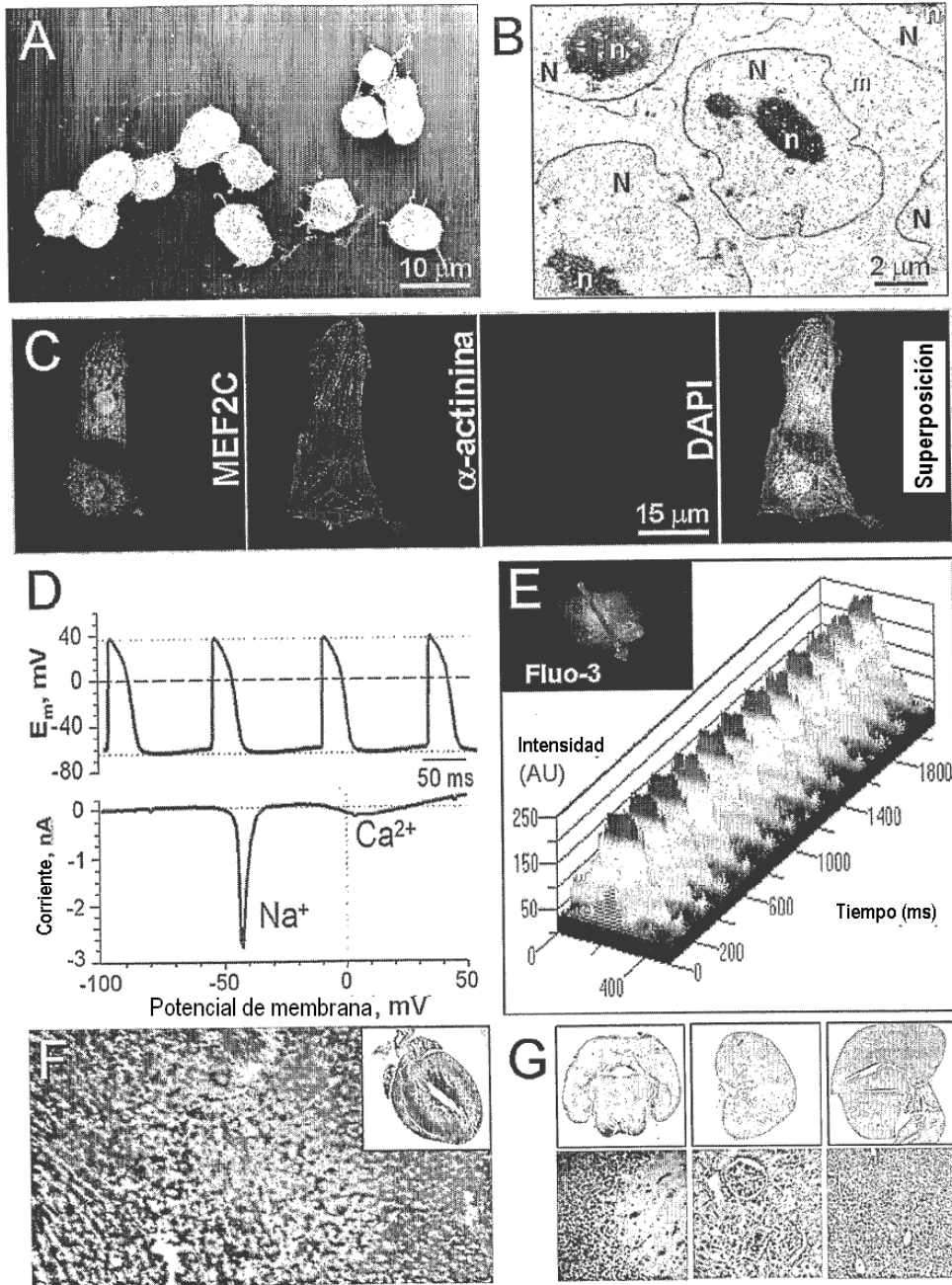
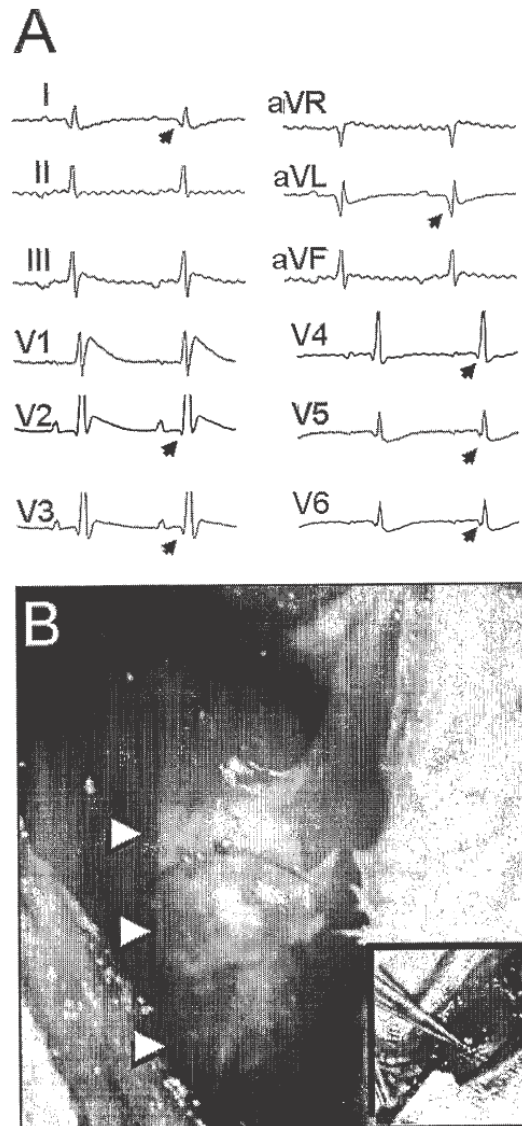


FIGURA 2



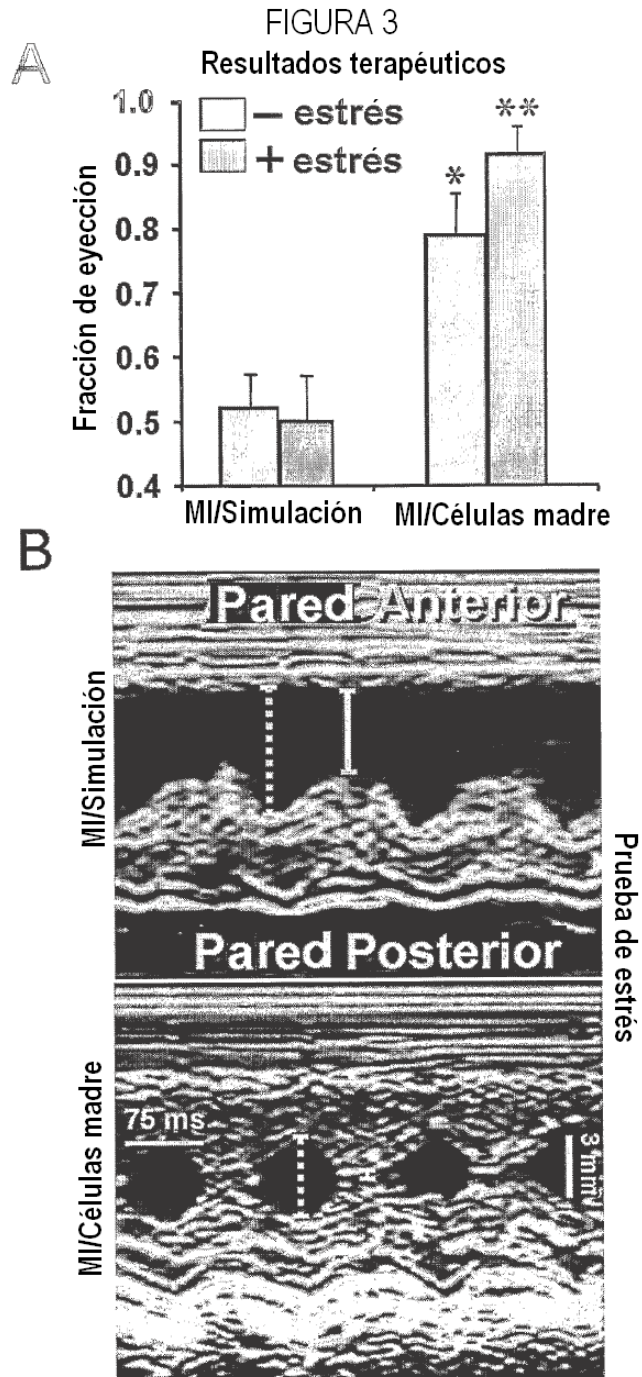


FIGURA 4

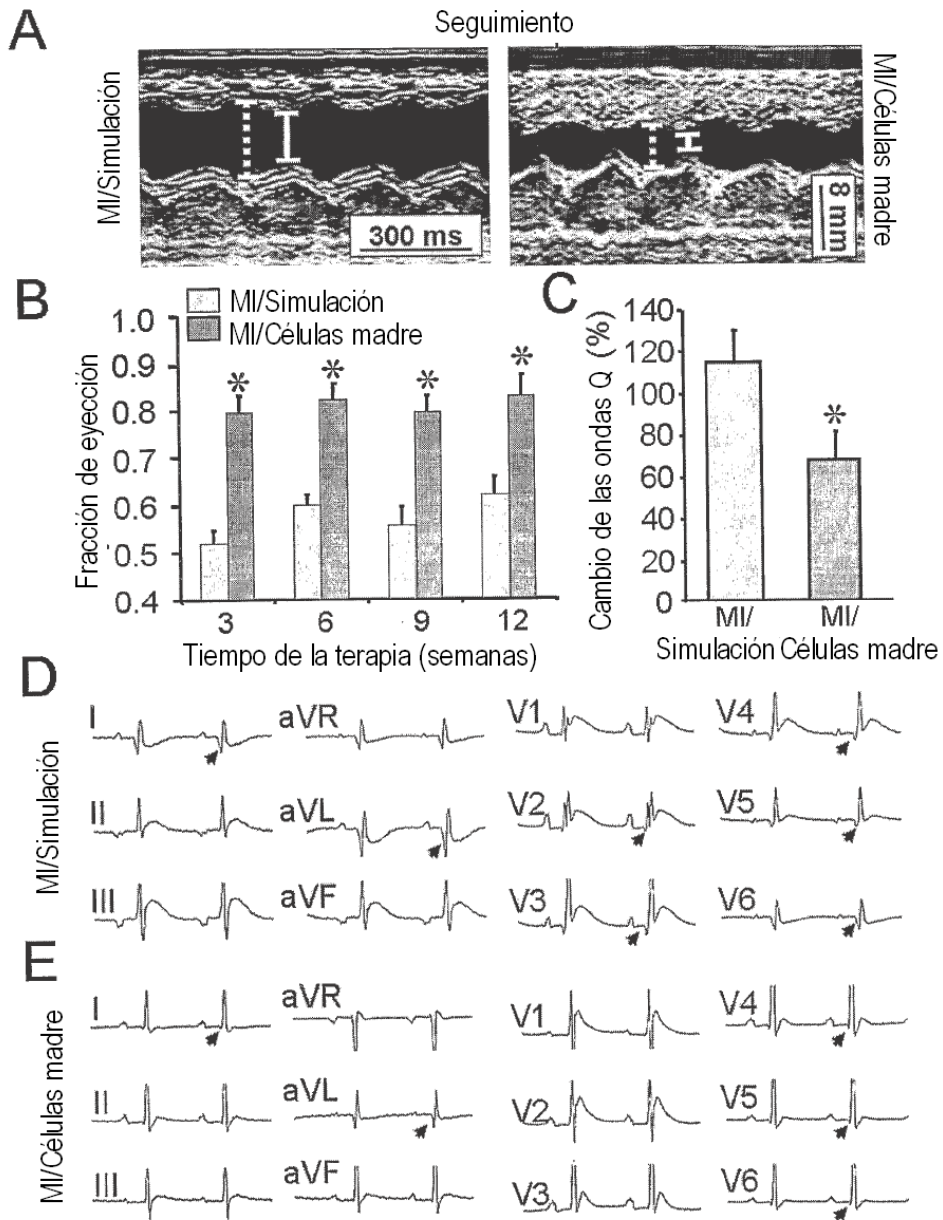


Figura 5

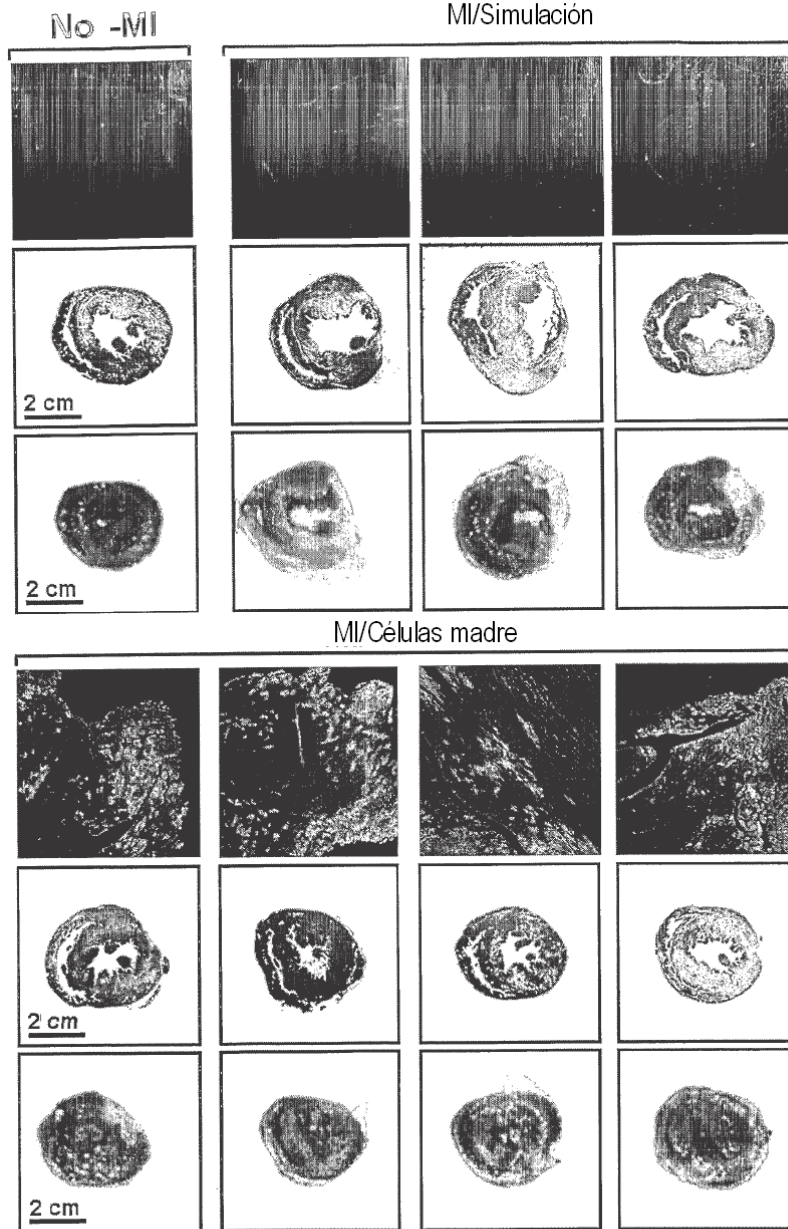


FIGURA 6

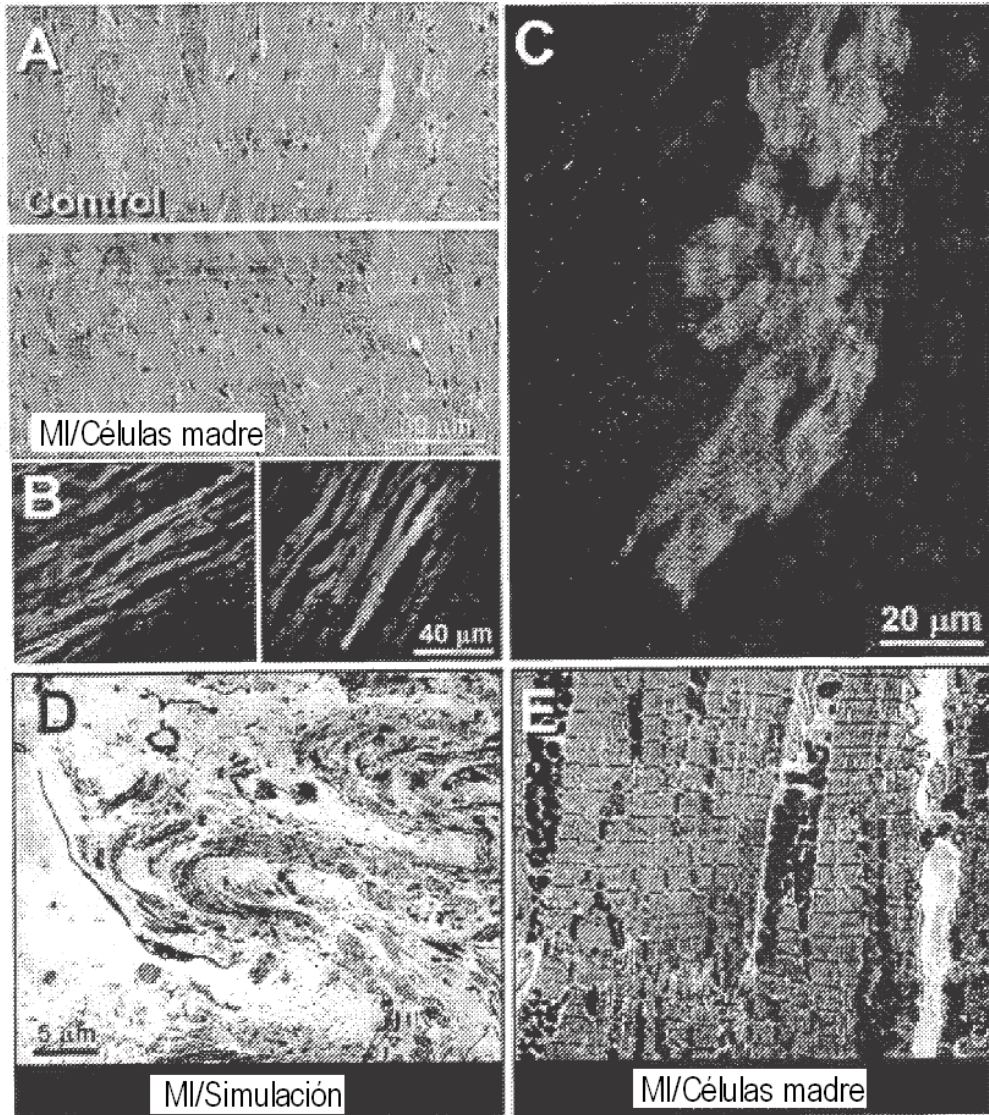


FIGURA 7

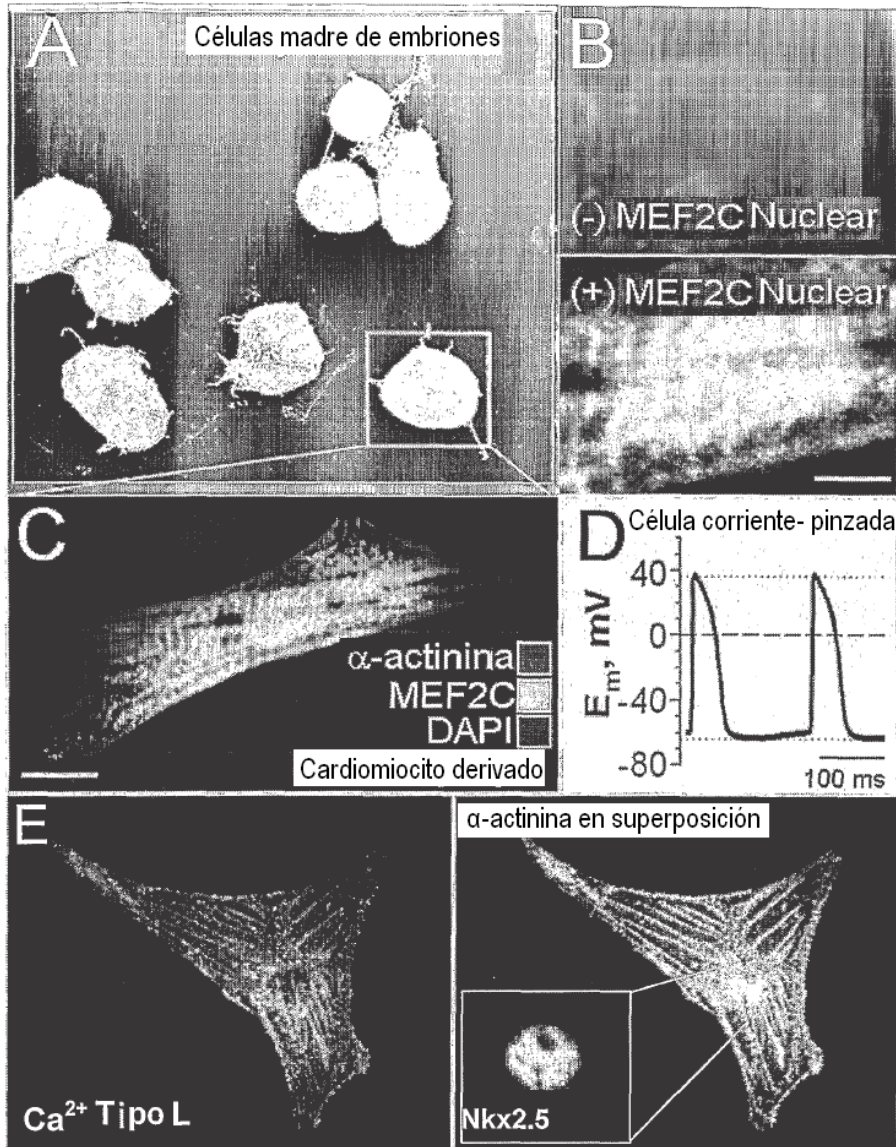


FIGURA 8

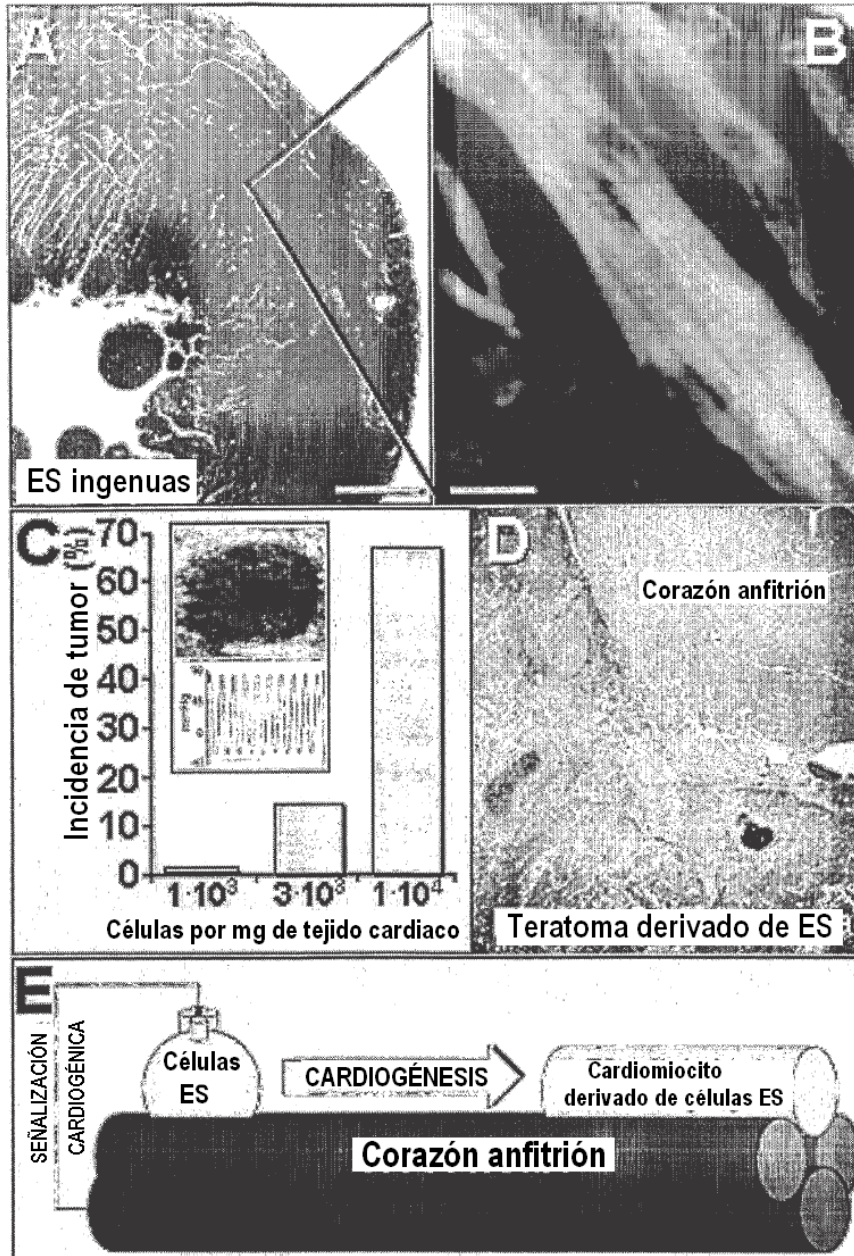


FIGURA 9

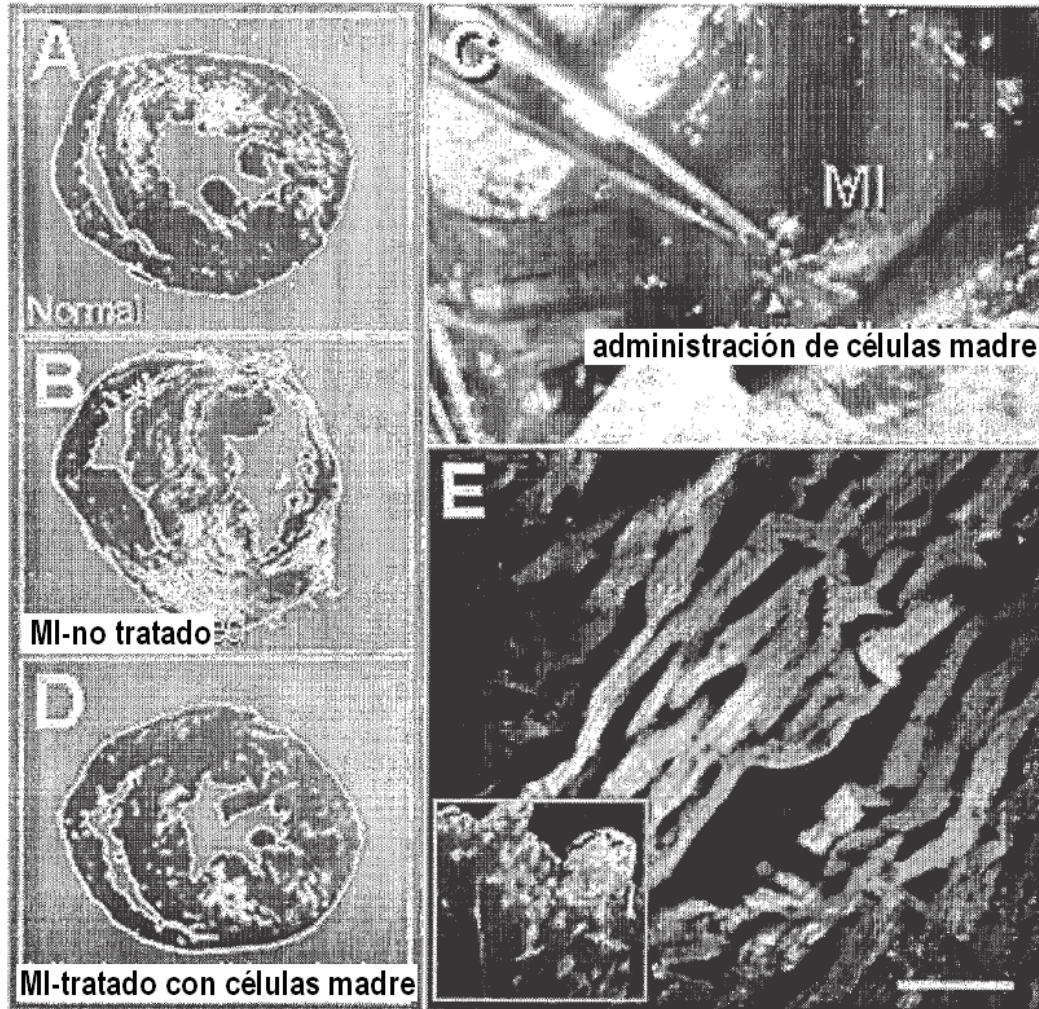


FIGURA 10

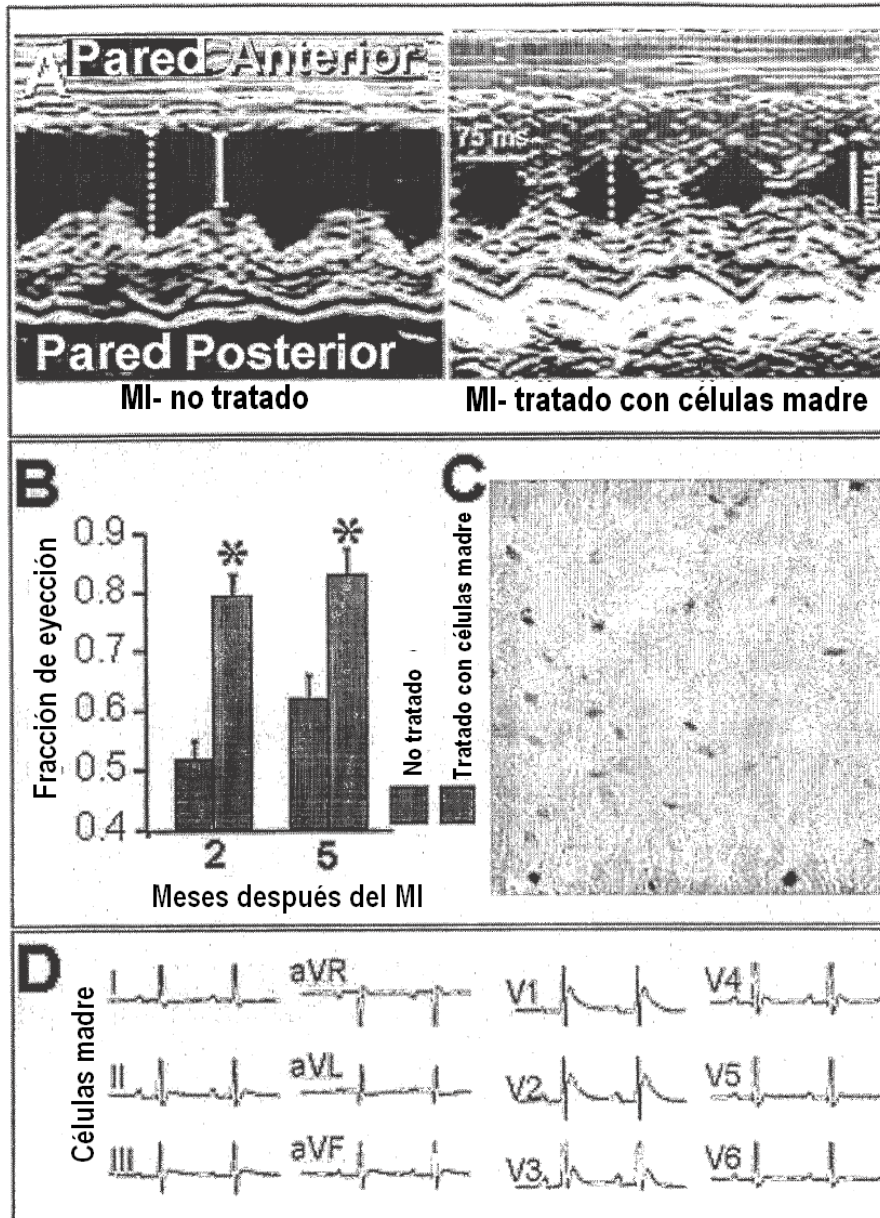


FIGURA 11

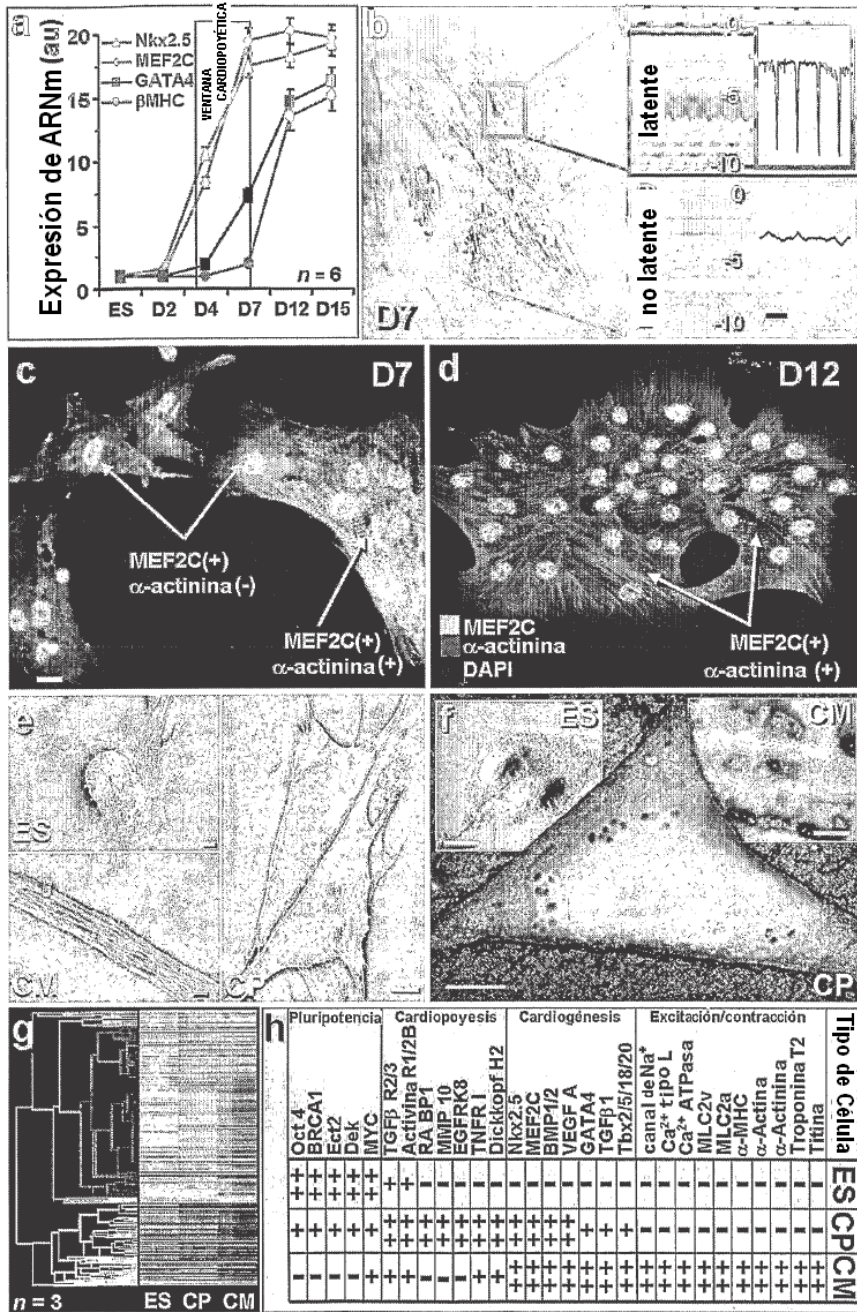


FIGURA 12

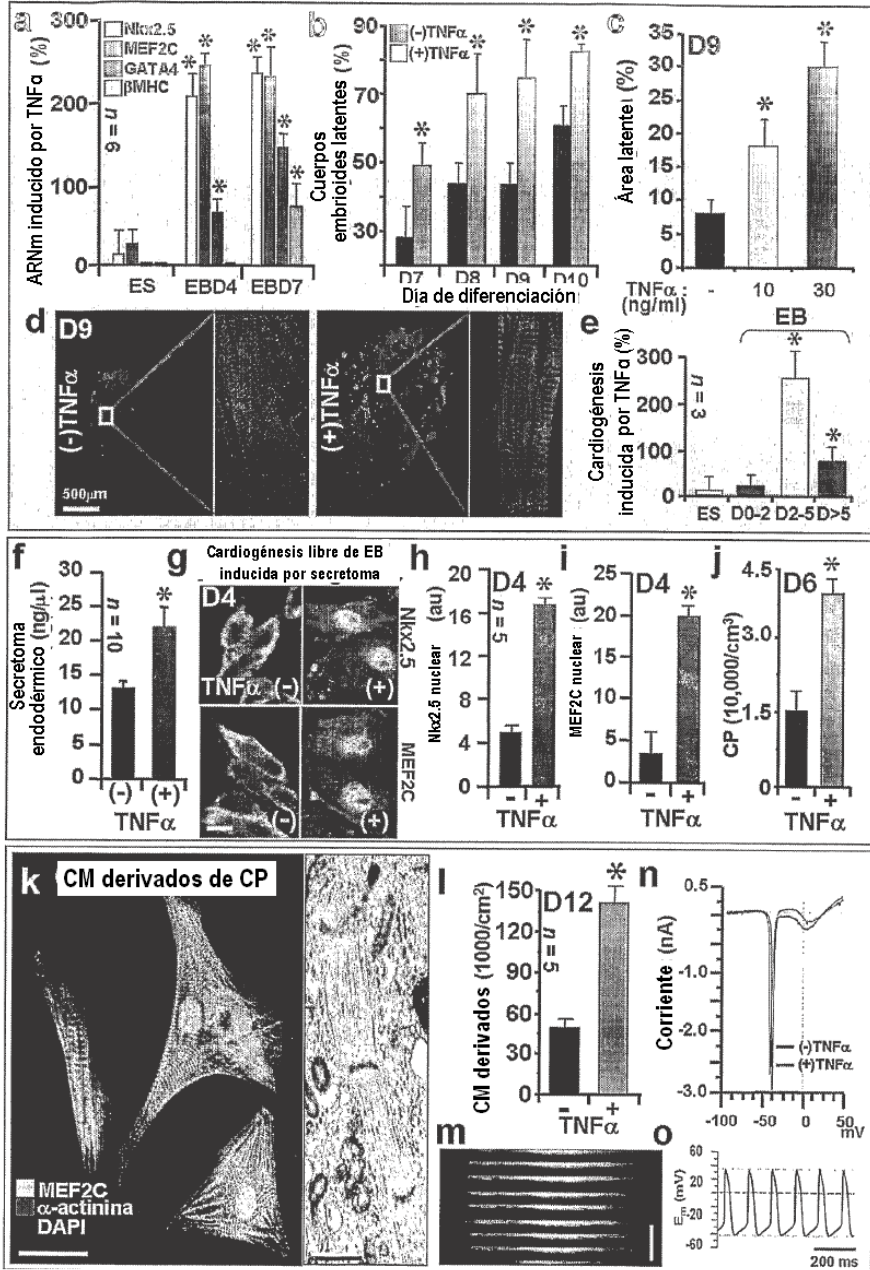


FIGURA 13

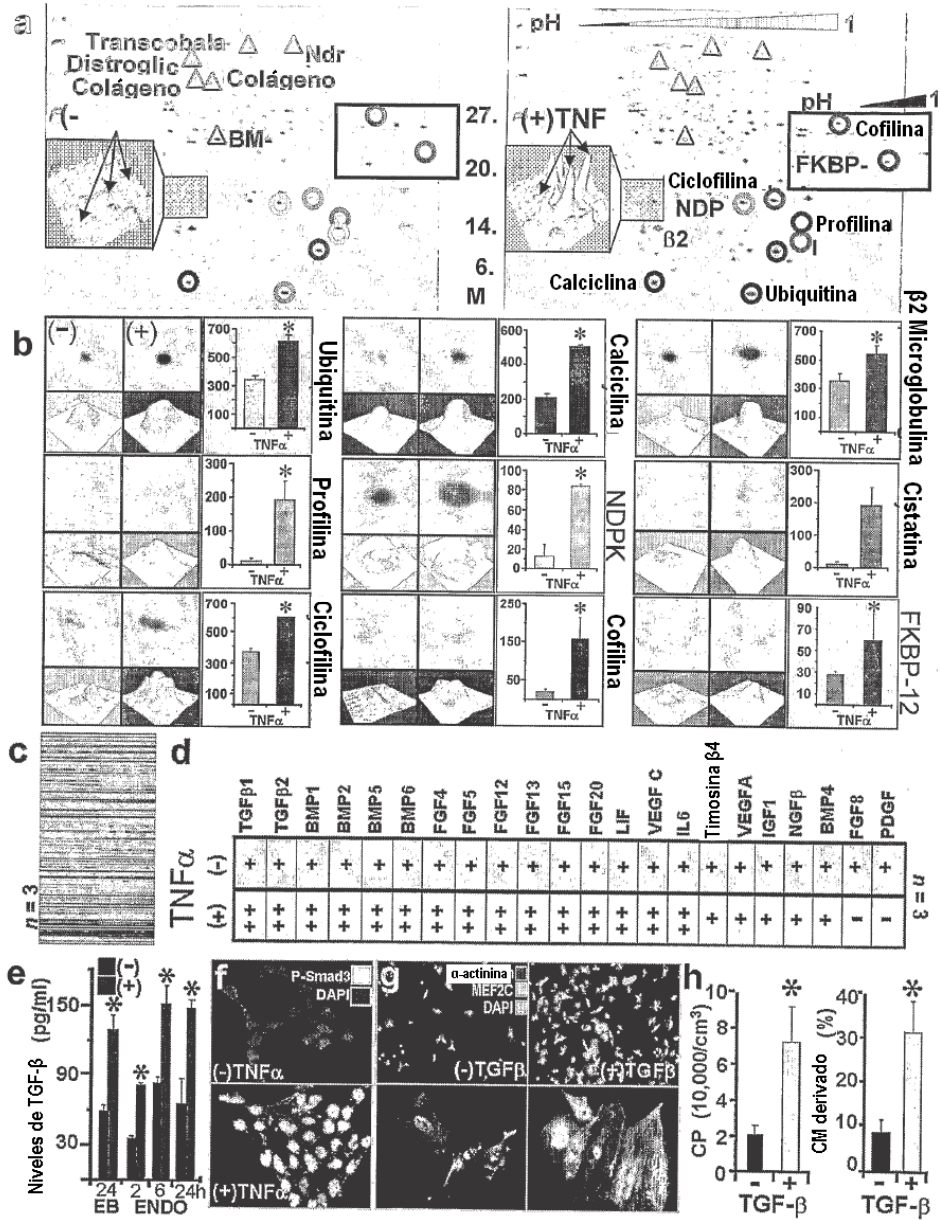


FIGURA 14

