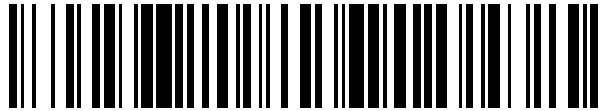


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 581**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2011 E 11711408 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2542669**

54 Título: **ETS2 y Mesp1 generadores de progenitores cardíacos a partir de fibroblastos**

30 Prioridad:

05.03.2010 US 339509 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2015

73 Titular/es:

**TEXAS HEART INSTITUTE (33.3%)
6770 Bertner Avenue
Houston, TX 77030, US;
UNIVERSITY OF HOUSTON (33.3%) y
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SCHWARTZ, ROBERT J.;
POTAMAN, VLADIMIR N. y
ISLAS, JOSE FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 581 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

ETS2 y Mesp1 generadores de progenitores cardíacos a partir de fibroblastos

Campo de la invención

5 La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la Solicitud de Patente Provisional US número de serie 61/339.509, presentada el 5 de marzo de 2010, titulada ETS2 AND MESP1 GENERATE CARDIAC PROGENITORS FROM FIBROBLASTS, de la que todo el contenido se incorpora en la presente memoria por referencia.

10 Un aspecto de la presente invención se refiere, en general, al campo de la diferenciación celular y, más específicamente, a una estrategia para la regeneración de tejido cardiovascular a través del aislamiento, renovación y diferenciación dirigida, de fibroblastos en tipos de células cardíacas maduras específicas, de marcapasos, musculares lisas y endoteliales.

Antecedentes

15 El daño a los tejidos del corazón de mamíferos frecuentemente resulta en la pérdida de un gran número de células cardíacas, incluyendo células maduras cardíacas, células del marcapasos, musculares lisas y células endoteliales. Aunque hay alguna indicación de que las células cardíacas se pueden regenerar en los seres humanos (Bergmann et al., 2009), el mecanismo no se entiende bien y el proceso no parece proceder con la suficiente rapidez para reparar tipos comunes de daño cardíaco, tal como isquemia, infarto, traumatismo o lesión debido a toxinas o infecciones virales. Por lo tanto, un objetivo central de la medicina cardíaca experimental ha sido el desarrollo de un medio para la regeneración de células cardíacas que se han perdido debido al daño cardíaco. Se han realizado estudios de los mecanismos detrás de la cardiogénesis embrionaria, con el objetivo de replicar la cardiogénesis in vitro o in vivo para los fines de la regeneración de tejido dañado.

20 Investigaciones recientes han identificado células progenitoras cardiovasculares multipotentes (MICP) (ISL1 +), que son capaces de diferenciarse para formar el tejido cardíaco maduro. Las células MICP derivadas de células madre embrionarias (ES), que pueden dar lugar a células endoteliales, cardíacas, y musculares lisas, se han aislado (Moretti et al., 2006). Los estudios genéticos han demostrado que estas células MICP expresan *Isl1*, *Nkx2.5* y *Fli1*.

25 Los sistemas modelo para la investigación de cardiogénesis incluyen la ascidia *Ciona intestinalis* (Beh et al., 2007). Los estudios de linaje han demostrado que el corazón *Ciona* adulto se deriva de dos células fundadoras que expresan *Ci-Mesp*, un factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico (bHLH), y también *Ci-Ets1/2* (Imai et al., 2004; Satou et al., 2004). Además, se expresan ortólogos de ascidia de genes de especificación de corazón conservado *NK4* (tinman *Nkx2.5*), *GATAa* (*pannier* / *GATA4* / *5/6*), *Hand* and *Hand-like* (Imai et al., 2003; Davidson, 2007; Davidson and Levine, 2003; Satou et al., 2004). Los embriones *knockdown-Ci-Mesp* no desarrollaron primordios de corazón, y la inhibición diana de la actividad de *Ets1/2* también bloqueó la especificación cardíaca y la expansión del campo del corazón. Del mismo modo, los homólogos murinos de *Ci-Mesp*, *Mesp1* y *Mesp2* se expresan en el mesodermo temprano destinado a convertirse en mesodermo cráneo-cardíaco (Saga et al., 2000). Sólo el ratón doble-knockout *Mesp1/Mesp2* carecía de cualquier mesodermo cardíaco (Saga et al., 1999; Kitajima et al., 2000), lo que indica un papel para estos genes en la dirección de la aparición de progenitores cardíacos en vertebrados superiores. Las repeticiones de los genes *Mesp* han hecho que otros estudios en embriones sean una tarea de enormes proporciones.

40 Lo que se necesita en la técnica es un procedimiento para inducir la cardiogénesis con el fin de regenerar las células cardíacas para el uso en el tratamiento de tejido cardíaco dañado. La reprogramación de células somáticas humanas en células pluripotentes por un número limitado de factores de transcripción importantes para el mantenimiento de la autorrenovación y pluripotencia ha sido reportada por los grupos de Yamanaka, Thomson and Daley (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Park et al., 2008). Un aspecto de la presente invención proporciona un medio para la reprogramación de las células somáticas y diferenciación dirigida en células progenitoras cardíacas. Por lo tanto, una realización de la presente solicitud proporciona una forma de probar un paradigma regulador único que *ETS2* y *Mesp1* son transformadoras y, a diferencia de *NKX2.5* e *ISL1*, convierten los fibroblastos no embrionarios normales humanos dérmicos (NHDF) en progenitores cardíacos primarios. Otro aspecto de la presente solicitud fue dilucidar el papel de *Mesp1* en la jerarquía reguladora que dirige la aparición de progenitores cardíacos.

Sumario

50 La presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una célula progenitora cardíaca de acuerdo con la reivindicación 1.

También se describe la modulación de las capacidades de diferenciación celular utilizando la expresión génica heteróloga. Algunas realizaciones de la invención se refieren a un procedimiento para inducir una célula progenitora cardíaca mediante la entrega de un factor de reprogramación a la célula, en el que el factor de reprogramación comprende *ETS2* o una combinación de *ETS2* y *Mesp1*.

El procedimiento proporciona una célula progenitora cardiaca que ha sido inducida mediante la reprogramación de una célula somática, en el que la reprogramación comprende la entrega de un factor de reprogramación que comprende el gen ETS2 a la célula somática, la célula somática es un fibroblasto dérmico humano normal (NHDF), y el factor de reprogramación puede ser ETS2 o Mesp1, o una combinación de los mismos.

- 5 También se describe un procedimiento de reprogramación de una célula somática para producir una célula progenitora cardiaca, en el que la reprogramación comprende la entrega de un factor de reprogramación que comprende el gen ETS2 a la célula somática. La célula somática puede ser una NHDF, y el factor de reprogramación puede ser ETS2 o Mesp1, o una combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

15 La FIGURA 1 muestra un mapa esquemático de lentivirus con la inserción de secuencias de codificación de ADN de longitud completa de ETS2 y ELK4. Elementos funcionales y abreviaturas: promotor alfa Ef-1 constitutivo, múltiples sitios de clonación (MCS), sitio de entrada al ribosoma independiente (IRES) del virus de la poliomielitis humana, secuencia de codificación para una mejora en la proteína verde fluorescente (EGFP), elemento regulador posterior a la transcripción del virus de hepatitis de la marmota (WPRES), dominio de activación (AD), dominio ETS de unión al ADN. Estos plásmidos se generaron mediante técnicas de clonación de ADN recombinante estándar y luego se utilizaron para hacer los lentivirus para infectar fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF);

20 La FIGURA 2 muestra (panel superior) NHDF tratados con lentivirus vacíos (pWPI-GFP), lentivirus pWPI-ELK4-GFP, o lentivirus pWPI-ETS2-GFP, y (panel inferior) niveles de expresión de GAPDH, NANOG, OCT3/4, Sox2 en células infectadas con virus vacío, virus portador de ETS2, virus portador de ELK4, o paso NHDF no infectado 3 (NHDF-P3);

25 La FIGURA 3 muestra la tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo a un marcador de células madre NANOG en células NHDF-P3 infectadas con lentivirus que porta ETS2, pero no ELK4 o vector vacío (panel superior). Una transferencia de proteína usando anticuerpo anti-ETS2 reveló la expresión de ETS2 en NHDF infectados con lentivirus que porta ETS2 durante 4 semanas, mientras que NHDF infectados con lentivirus vacío no mostraron ninguna expresión (panel inferior izquierdo). La tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-ETS2 confirmó la expresión inducida en las células infectadas con lentivirus ETS2 (panel inferior derecho);

30 La FIGURE 4 muestra la inducción de marcadores de células madre NANOG, OCT3/4, SOX2, REX1 y c-MYC en colonias similares a células madre después de 4 semanas de cultivo. Los colores fluorescentes (colores no representados en las figuras) son los siguientes: DAPI (azul), GFP (verde), NANOG y OCT3/4 (rojo), una mezcla de los tres colores se observa en los paneles de "fusión". Las imágenes de colores fluorescentes están disponibles bajo petición;

35 La FIGURA 5 muestra la citometría de flujo que demuestra el porcentaje de células madre embrionarias humanas H9 (A), NHDF no infectados (b), o células infectadas con ETS2 (C) que se tiñeron para el marcador de superficie de células madre SSEA-3. Controles negativos, líneas negras; tinción de SSEA-3, líneas grises;

40 La FIGURA 6 muestra la citometría de flujo que demuestra el porcentaje de células madre embrionarias humanas H9 (A), NHDF no infectados (B), o células infectadas con ETS2 (C) que se tiñeron para el marcador de superficie de células madre Tra-1-81. . Controles negativos, líneas negras; tinción de Tra-1-81, líneas grises;

45 La FIGURA 7 muestra imágenes de células EPS después de la infección con lentivirus Mesp1. Las células se tiñeron con DAPI para visualizar los núcleos (paneles de la izquierda) y con anticuerpos específicos contra ISL1, NKX2.5, GATA4, MEF2C, TNT y MHC3 para visualizar las proteínas progenitoras cardíacas indicadas (paneles de la derecha). Los paneles del medio muestran imágenes de contraste de fase de células. Los colores fluorescentes son los siguientes: DAPI (azul), tinción específica de la proteína (rojo). Las imágenes con colores fluorescentes están disponibles a solicitud;

50 La FIGURA 8 muestra que la expresión de NKX2.5, ISL1, GATA4, MEF2C, TBX5, MHC3, TNT, MLC2, CX43 y CX45, detectada mediante RT-PCR, sólo se indujo por la combinación de ETS2 y Mesp1. Ni ETS2 o Mesp1 solos son capaces de inducir estos genes cardiogénicos en NHDF;

55 La FIGURA 9 muestra la inducción del programa de progenitores cardíacos de novo secuencial. NHDF fueron infectados con lentivirus ETS2, se hicieron crecer durante 4 semanas, fueron infectados con lentivirus Mesp1 y se cultivaron durante 7 días, luego fueron agregados por el procedimiento de caída de presión y se colocaron en una placa revestida con gelatina;

La FIGURA 10 muestra la activación de la expresión génica del programa de progenitores cardíacos, medida por fluorescencia de la proteína indicadora Rojo-Tomate que se expresa sólo cuando se expresa el factor progenitor cardíaco NKX2.5. Los colores fluorescentes (colores no mostrados en las figuras) son los siguientes: GFP (verde), Red (rojo), una mezcla de los dos colores se observa en el panel de "fusión";

5 La FIGURA 11 muestra la citometría de flujo de células progenitoras cardíacas obtenidas de NHDF por la infección con lentivectores ETS2 y Mesp1 y fueron clasificados, ya sea por GFP o GFP y proteína indicadora Rojo-Tomate;

La FIGURA 12 muestra la visualización de marcadores de superficie de células endoteliales y cardíacas CD31, CD34 y CD144 en células progenitoras cardíacas después de 9 días en cultivo; y

10 La FIGURA 13 muestra los datos de ritmo cardíaco en las células progenitoras cardíacas reprogramadas. Las células EPS fueron infectadas con lentivirus Mesp1, así como con el virus que lleva un promotor de cadena pesada de miosina que dirige el gen de resistencia a la puomicina. Para seleccionar las células progenitoras cardíacas resistentes a los antibióticos, las células fueron tratadas con 50 ug/ml de puomicina. Después de 9 días, se observó el ritmo cardíaco en los cultivos celulares y fueron capturados por microscopía de vídeo y convertidos en vídeos MPEG. Los golpes por agregado cultivado por placa se contaron durante 20 segundos y luego se multiplicaron por 3, dando como resultado latidos por un minuto. Se realizaron tres mediciones independientes por agregado en una placa o pocillo de cultivo de tejido.

Descripción detallada de realizaciones preferentes

20 Una realización de la presente invención se refiere a la modulación de la diferenciación celular utilizando la expresión génica heteróloga. Algunas realizaciones de la invención se refieren a un procedimiento para inducir una célula progenitora cardíaca mediante la entrega de un factor de reprogramación a la célula, en el que el factor de reprogramación comprende ETS2 o una combinación de ETS2 y Mesp1.

25 Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para inducir una célula progenitora cardíaca por la reprogramación de una célula somática, en el que la reprogramación comprende la entrega de un factor de reprogramación que comprende un solo gen heterólogo a la célula somática. La célula somática puede ser un fibroblasto, preferiblemente un fibroblasto dérmico humano normal. El gen heterólogo puede ser ETS2. El gen heterólogo puede comprender la secuencia de codificación de ETS2 humana (SEC ID NO: 9) o el gen ETS2 (SEC ID NO: 7), o el gen heterólogo puede codificar la secuencia de la proteína ETS2 humana (SEC ID NO: 8). La célula similar a las células madres inducida puede exhibir características de cardiogénesis o de otro tipo de células progenitoras cardíacas como consecuencia de la programación, incluyendo la expresión de factores progenitores cardíacos tales como NKX2.5, ISL1, MEF2C, dHAND and GATA4, o ritmo cardíaco.

30 Otra realización de la presente invención proporciona un procedimiento para inducir una célula progenitora cardíaca mediante la reprogramación de una célula somática, en el que la reprogramación comprende la entrega de un factor de reprogramación que comprende dos genes heterólogos a la célula somática. La célula somática puede ser un fibroblasto, preferiblemente un fibroblasto dérmico humano normal. Los genes heterólogos pueden ser ETS2 y Mesp1. Los genes heterólogos pueden comprender la secuencia de codificación de ETS2 humana (SEC ID NO: 9), el gen ETS2 (SEC ID NO: 7), o una secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína ETS2 humana (SEC ID NO: 8) y la secuencia de codificación de Mesp1 de ratón (SEC ID NO: 6), el gen Mesp1 de ratón (SEC ID NO: 4), o una secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína Mesp1 de ratón (SEC ID NO: 5). La célula similar a las células madres inducida puede exhibir características de cardiogénesis o de otro tipo de células progenitoras cardíacas como consecuencia de la programación, incluyendo la expresión de factores progenitores cardíacos tales como NKX2.5, ISL1, MEF2C, dHAND y GATA4, o ritmo cardíaco.

35 Aún otra forma de realización de la presente invención, la reprogramación de una célula somática, puede lograrse mediante la entrega de un factor de reprogramación a la célula somática utilizando un vector recombinante. El factor de reprogramación también se puede suministrar usando un sistema de transducción lentiviral para expresar el factor de reprogramación en la célula somática. En estas realizaciones, el factor de reprogramación puede ser ETS2 y Mesp1.

40 Otra forma de realización de la presente invención proporciona una célula somática que ha sido reprogramada, en la que la reprogramación comprende la entrega de un factor de reprogramación que comprende un único gen heterólogo o múltiples genes heterólogos a la célula somática. La célula somática puede ser un fibroblasto, preferiblemente un fibroblasto dérmico humano normal. Los genes heterólogos pueden ser ETS2 o múltiples genes heterólogos pueden ser ETS2 y Mesp1. La célula similar a las células madres inducida puede exhibir características de cardiogénesis o de otro tipo otros de células progenitoras cardíacas como consecuencia de la programación, incluyendo la expresión de factores progenitores cardíacos tales como NKX2.5, ISL1, MEF2C, dHAND y GATA4, o ritmo cardíaco.

55 **Ejemplo 1**

Selección del factor de reprogramación

Se observó que el dominio ETS (Fig. 1), un dominio de unión a ADN altamente conservado, es capaz de unirse a un motivo central de ADN 5'-GGA(A/T)-3' encontrado en los promotores de muchos genes marcadores de células madre. La expresión de ETS2 está vinculada a la inmortalización de las células, la mediación de la oncogénesis, y mejora de la actividad de la telomerasa.

- 5 ETS2 y ELK4, un gen de la familia ETS homólogo a ETS2 en su región de unión al ADN, fueron transducidos usando vectores lentivirales en NHDF-P3. En una semana, los fibroblastos transducidos con vectores lentivirales que contenían ETS2 fueron sustituidos por células redondeadas pequeñas de altamente proliferativas. Estas células altamente proliferativas no se observaron en los controles transducidos con lentivirus vacío, o en los fibroblastos transducidos con vectores lentivirales que contenían ELK4 (Fig. 2-3).

10 **Ejemplo 2**

Sistema de transducción lentiviral

- La figura 1 muestra un mapa esquemático de lentivirus con la inserción de ETS2 (SEC ID NO: 9); y secuencias de codificación de ADN de ELK4 (SEC ID NO 3). Obsérvese que sólo ETS2 tiene un dominio indicado. Estos plásmidos se utilizan para hacer que los lentivirus infecten NHDF. La secuencia de longitud completa ETS2 (SEC ID NO: 7) comprende una secuencia de codificación de ETS2 (SEC ID NO: 9) que codifica una secuencia de la proteína ETS2 (SEC ID NO: 8). La secuencia de longitud completa de ELK4 (SEC ID NO: 1) comprende una secuencia de codificación de ELK4 (SEC ID NO: 3) que codifica una secuencia de proteína (SEC ID NO: 2).

- El vector vacío de lentivirus pWPI-EGFP fue un regalo del doctor D. Trono (Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Suiza). El ADNc para clonar los genes ETS2 y ELK4 humanos (ID de Clon 3852274 y 4364006) se obtuvieron de Open Biosystems, mientras que el ADNc Mesp1 fue un regalo del Dr. Y. Saga (Instituto Nacional de Genética, Mishima, Japón). La secuencia de consenso Kozak para la iniciación de la traducción de proteínas y el epítipo HA-tag se añadieron respectivamente a los extremos 5' y 3' de las secuencias de codificación ETS2, ELK4 y Mesp1 mediante clonación por PCR.

- El embalaje e infección de lentivirus procedió de la siguiente manera: Las células 293 FT sembradas en placas de 6 cm fueron transfectadas con pWPI-eGFP, o pWPI-ELK4-eGFP (secuencia de codificación de ELK4 humana, SEC ID NO: 3), o pWPI-ETS2-eGFP (secuencia de codificación de ETS2 humana, SEC ID NO: 9), o pWPI-Mespl-eGFP (secuencia de MesP1 de ratón, SEC ID NO: 6), o SMPU-alphaMHC/puro-Rex1/Blast (regalo del Dr. M. Mercola, Instituto de Investigación Médica Burnham, La Jolla, CA). 4,5 ug de cualquier construcción se mezcló en una solución de 458 ul de medio de Eagle modificado por Dulbecco libre de suero (DMEM) y 27,5 ul de Eugene (Roche), 2,8 ug de vector de embalaje psPAX2 y 1,9 ug de vector envolvente pMD2.G durante 25 minutos a temperatura ambiente. Después de la mezcla se añadió a células 293FT cultivadas en DMEM, libre de rojo fenol (Invitrogen) suplementado con FBS al 10% (inactivado por calor), aminoácidos no esenciales MEM 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM y L-glutamato 6 mM. Después de 24-26 horas de cultivo, se recogió el medio con partículas virales durante 3 días y se utilizó para la infección.

- El medio recogido se utilizó para infectar NHDF cultivados en medio basal de fibroblastos (FBM, Lonza) hasta 80% de confluencia. Antes de la transfección, las células se volvieron a sembrar en placas de Petri de 6 cm a una densidad de 2.5×10^6 células / placa, el medio se cambió a StemPro y se añadieron las partículas virales y polibreno (8 ug / ml de concentración final). Para aumentar la eficacia de la infección, se repitió el procedimiento dentro de las 48 horas. Todas las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂.

40 **Ejemplo 3**

Expresión génica en células reprogramadas

- Fig. La figura 2 muestra que los lentivirus ETS2 pero no los lentivirus ELK4 indujeron la aparición de células madre y la inducción de proteínas marcadoras de células madre, NANOG, OCT3/4 y Sox2 dentro de los 7 días de cultivo. El panel superior de la figura. 2 muestra NHDF (Lonza, EE.UU., cc-2509) cultivadas bajo FBM, suplementadas (suplementos proporcionados por Lonza) con hFGF-beta, insulina, gentamicina / anfotericina y FBS al 2%, a una confluencia de aproximadamente 80% antes de la infección viral. Los lentivirus pWPI-EGFP y pWIELK4-EGFP y pWPI-ETS2-EGFP vacíos se utilizaron para infectar NHDF-P3 en forma separada. Las células NHDF-P3 no infectadas e infectadas se cultivaron en medio pluripotente inducido humano StemPro hES SFM (Invitrogen) en placas de Petri recubiertas con colágeno durante 7 días. La proteína fluorescente verde clonada en los vectores lentivirales se expresó en las células infectadas, como lo revela la microscopía de fluorescencia verde. Durante este período de cultivo, se observaron cambios morfológicos en los que los NHDF infectados con ETS2 cambiaron su apariencia de formas fibroblásticas pleomórficas alargadas a "células similares a las células madre" redondeadas. En comparación, los NHDF infectados con vectores lentivirales ELK4 o vacíos no alteraron la forma celular.

- El panel inferior de la figura. 2 muestra el análisis de PCR de transcripción inversa (RT-PCR), de células reprogramadas.

Las células se lavaron en PBS frío y el ARN se aisló con el Kit Qiagen RNeasy. El ARN se transcribió utilizando

5 transcriptasa inversa MMLV (Invitrogen), y la amplificación por PCR (30 ciclos) se realizó para GAPDH, NANOG, OCT3/4, SOX2 (remitirse a la Tabla 1 para los conjuntos de cebadores) utilizando mezcla de polimerasa LA16. Esta mezcla de enzimas se preparó utilizando 15 ul de KlenTaq1 (25 unidades / ul, Ab Peptides, St Louis, MO) y 1 ul de Pfu (2,5 unidades / ul, Stratagene, La Jolla, CA). Las muestras de ADN amplificadas fueron entonces sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 2% y la tinción con bromuro de etidio reveló la expresión inducida de genes marcadores de células madre NANOG, Oct3/4 y Sox2 en células infectadas con ETS2 pero no en NHDF-P3 o células infectadas ya sea con ELK4 o lentivirus vacío.

Tabla 1. Cebadores para el estudio de progenitores cardíacos

Cebador	SEC ID NO	Secuencia	Tamaño de producto
GapdhFP ctrl exp	11	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	202
GapdhRP ctrl exp	12	CTCCACGACGTA CTCTCAGCG	

ES 2 533 581 T3

Cebador	SEC ID NO	Secuencia	Tamaño de producto
hNanogFP ctrl exp	13	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC	225
hNanogRP ctrl exp	14	TATAGAAGGGACTGTTCCAGGC	
hOct ¾FP ctrl exp	15	CTTGAATCCCGAATGGAAAGGG	206
hOct ¾ RP ctrl exp	16	CCTCCCAAATAGAACCCCA	
Sox2 HPB F	17	TGGACAGTTACGCGCACAT	215
Sox2 HPB R	18	CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	
hRex1FP ctrl exp	19	GCTGACCACCAGCACACTAGGC	298
hRex1RPctrl exp	20	TTTCTGGTGTCTTGTCTTTGCCCG	
c-Myc HPB F	21	AGGCGAACACACAACGTCTT	
c-Myc HPB R	22	TTGGACGGACAGGATGTATGC	
hKlf4FP ctrl exp	23	ATGGCTGTCAGCGACGCGCTGCTC	293
hKlf4RP ctrl exp	24	CGTTGAACTCCTCGGTCTCTCTCC	
Nkx 2.5 FP	25	ccctgaccgatcccacctaac	358
Nkx 2.5 RP	26	GGCGGGCGACGGCGAGATAGC	
Mesp 1 FP	27	tgaagtgggtccttggcagac	162
Mesp 1 RP	28	CCTCCTGCTTGCCTCAAAGTGTC	
Mesp 2 FP	29	CGCTGCGCCTGGCCATCCGCTACAT	113
Mesp 2 RP	30	GCCCCAAGGGGACCCCGCGAC	
Mef2c FP	31	gcaccagtgcagggaaacggg	202
Mef2c RP	32	GACTGAGCCGACTGGGAGTTA	
Sox 17 FP	33	gcggcgcaagcaggtgaag	205
Sox 17 RP	34	ACTCTGGCAGTCGCGGTAGTGGC	
FoxA2 FP	35	ctgaagccggaacaccactacgc	214
FoxA2 RP	36	TCCAGGCCCGTTTTGTTCTGTGAC	
FGF8 FP	37	agctcagccgcccctcatccg	313
FGF8 RP	38	AGCCCTCGTACTTGGCATTCTGC	
MyoD FP	39	AggggctaggttcagcttctcG	240
MyoD RP	40	CTCCTGCTCTGGCAAAGCAACTC	
BMP2 HBP FP	41	ACTTTATGGAGGGAAACCCA	201
BMP2 HBP RP	42	CCGGATCTGGTTCAAGCATGA	
hTert HBP FP	43	AACCTTCCTCAGCTATGCCC	210
hTert HBP RP	44	GCGTGAAACCTGTACGCCT	
Islet-1 HPB F	45	GTGGAGAGGGCCAGTCTAGG	250
Islet-1 HPB R	46	CCGTCATCTCTACCAGTTGCT	
Troponin T HPB F	47	GAGTTGCAGGCGCTGATTG	229
Troponin T HPB R	48	TCTGGATGTAACCCCCAAAATG	
Dhand HPB F	49	ATGAGTCTGGTAGGTGGTTTTCC	205
Dhand HPB R	50	CATACTCGGGGCTGTAGGACA	
T HPB F	51	GATCACGCAGCTCAAGATTGC	230
T HPB R	52	TCTCTGGTGTGTTCCTAGACG	
T5 HPB F	53	CACTTCTCCGCTCACTTCACC	210
T5 HPB R	54	TGGCACGCCATGAGAGTAGA	
ETS-2 HPB F	55	AAAGCTACCTTCAGTGCTTC	225
ETS-2 HPB R	56	AATGTCACCCACAAAGTCAGG	
Dkk-1 FP	57	ATTCCAACGCTATCAAGAACC	384
Dkk-1 RP	58	CCAAGGTGCTATGATCATTACC	
TBX 20 FP	59	tccagattcctttaccg	190
TBX 20 RP	60	tcagactcaggtgagca	

Cebador	SEC ID NO	Secuencia	Tamaño de producto
SM actin HBP F	61	CGGTGCTGTCTCTCTATGCC	156
SM actin HBP R	62	CACGCTCAGTCAGGATCTTCA	
hGATA1 F	63	AGAAGCGCCTGATTGTCTAGTA	229
hGATA1 R	64	AGAGACTTGGGTTGTCCAGAA	
hGTAT2 F	65	GGCCACTCTCTGTGTACC	243
hGATA2 R	66	CATCTTCATGCTCTCCGTCAG	
TBX3-1 F	67	GTGTCTCGGGCCTGGATTTC	164
TBX3-1 R	68	ACGTGTAGGGGTAAGGGAACA	
TBX3-2 F	69	TTAAAGTGAGATGTTCTGGGCTG	298
TBX3-2 R	70	ACTATAATTCCCCTGCCACGTA	
TBX4 F	71	TGACCATCGCTACAAGTTCTGT	163
TBX4 R	72	GGTGTTGTTTGTCTAGCTTCAG	
TBX6 F	73	ACACCCCTAAACTGGATTGCT	229
TBX6 R	74	CCTCCAGCTTTGGTGATGAT	
TBX10 F	75	CCTCGGCATACTTGCACCC	208
TBX10 R	76	ATTCCTCCCACAGAGGCTTCA	
TBX18 F	77	GCCCCTGCTGACTATTCTGC	227
TBX18 R	78	CTGCATGGATAAGCTGGTCTG	
TBX19 F	79	AAGAATGGCAGACGGATGTTT	204
TBX19 R	80	CCGGGTGAATGTAGACGCAG	
RUNX2 F	81	CGGCAAATGAGCGACGTG	268
RunX2 R	82	CACCGAGCACAGGAAGTTG	
LMO2 F	83	GGCCATCGAAAGGAAGAGCC	221
LMO2 R	84	GGCCAGTTTGTAGTAGAGGC	
TAU F	85	CCCCTGGAGTTCACGTTTCAC	240
TAU R	86	GCGAGCTTTGAGTTGAGGGA	

Ejemplo 4

Proteínas marcadoras de células madre en células reprogramadas

- 5 La figura 3 muestra la tinción de inmunofluorescencia de NHDF-P3 infectados con el anticuerpo contra el marcador de células madre NANOG. La tinción inducida por NANOG se revela en las células infectadas con ETS2 pero no en las células infectadas con vector vacío o ELK4. Además, una transferencia de proteína usando anticuerpo específico de ETS2 reveló su expresión en células infectadas con lentivirus ETS2 pero no en NHDF infectados con lentivirus vacíos.
- 10 La Fig. 4 muestra colonias similares a células madre inducidas por lentivirus ETS2 y la inducción de las proteínas marcadoras de células madre NANOG, OCT3/4, SOX2, REX1 y c-MYC después de 4 semanas de cultivo. El panel superior izquierdo muestra que los NHDF infectados con el virus ETS2 convertidos en colonias de pequeñas células redondeadas recuerda mucho a células madre de embriones humanos y murinos. Obsérvese que las colonias fueron etiquetadas con GFP a través de la infección por lentivirus ETS2. Los fibroblastos no infectados no lograron redondearse y no se tiñeron por GFP o no formaron colonias celulares.
- 15 El panel superior derecho de la figura 4 muestra la expresión de genes marcadores de células madre NANOG, OCT3/4, Sox2, REX1, KLF4 y c-myc en colonias celulares inducidas con ETS2 analizadas por RT-PCR. Debajo está la representación gráfica de RT-PCR cuantitativa para NANOG, OCT3/4, Sox2 y c-MYC en las células infectadas con ETS2.
- 20 Los paneles inferiores de la Fig. 4 confirman la presencia de proteínas NANOG y Oct3/4 en colonias celulares inducidas con ETS2 por tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.

Ejemplo 5

Características de las células transducidas con ETS2

La Fig. 5 muestra que aproximadamente el 97% de las células madre embrionarias humanas H9 se mancharon por

el marcador de superficie de células madre SSEA-3 (Panel A). Más del 60% de las células infectadas con ETS2 también mostraron marcador de superficie SSEA-3 (Panel C), en comparación con la tinción de menos del 2% de los NHDF infectados con lentivirus vacío (Panel B). Por lo tanto, ETS2 convirtió de manera eficiente los NHDF en células con marcador de superficie SSEA-3 semejando las células madre embrionarias humanas.

5 La citometría de flujo se realizó utilizando un analizador de BD Biosciences LSR II. Las células formadoras de colonias confluentes se disociaron por tripsina, se lavaron con PBS y se diluyeron hasta una concentración de 5×10^6 células/ml de PBS en 8 muestras (100 ul de cada una).
A partir de entonces se utilizaron 10 ul de suero humano normal para el bloqueo durante 5 minutos. Los anticuerpos contra SSEA-3-PE (Becton Dickinson) se diluyeron y se añadieron de acuerdo a las especificaciones del fabricante,
10 y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. A continuación, se añadieron 400 ul de PBS y la mezcla se centrifugó y la mitad del sobrenadante se retiró y se añadieron 200 ul de PBS y se analizó por citometría de flujo.

La Fig. 6 muestra la citometría de flujo de células teñidas por el marcador de superficie de células madre Tra-1-81 realizado como para SSEA-3. Aproximadamente el 45% de las células madre embrionarias humanas H9 se teñieron por Tra-1-81 (Panel A). No se detectó ninguna tinción de Tra-1-81 (Panel B) por NHDF infectados con lentivirus vacío (no lleva un gen heterólogo). La infección con el virus ETS2 dio lugar a aproximadamente 39% de células que mostraron marcador de células madre embrionarias Tra-1-81 (Panel C). Esto indica que ETS2 eficientemente convirtió los NHDF en células con el marcador de superficie Tra-1-81 semejando las células madre embrionarias humanas.
15

Las transcripciones de genes OCT3/4, NANOG y Sox2 se observaron sólo después de que NHDF-P3 fueron transducidos con el vector lentiviral que contenía ETS2 pero no después de la transducción con lentivirus vacío o vector que contenía ELK4. Las transcripciones de OCT3/4, NANOG y SOX2 se visualizaron (Fig. 2) y la inducción de NANOG se visualizó mediante inmunofluorescencia (Fig. 3).
20

La transducción lentiviral de células NHDF-P3 con ETS2 dio lugar a poblaciones enteras que mostraron expresión robusta de ETS2 durante 4 semanas visualizada mediante transferencias de proteína (Fig. 3). Estas células transducidas con ETS2 formaron grandes colonias fluorescentes verdes similares a aquellas de células madre (iPS) pluripotentes inducidas y/o ES pluripotentes.
25

La reprogramación de fibroblastos con ETS2 resultó en una fuerte expresión de los genes marcadores pluripotentes NANOG, OCT3/4, SOX2 y c-Myc medidos por RT-PCR y PCR cuantitativa e inmunotinción. Además, la citometría de flujo muestra que ETS2 convirtió de manera eficiente los NHDF en células con marcadores de superficie SSEA-3 y Tra1-81 semejando las células madre embrionarias humanas. Por lo tanto, estas células de fibroblastos humanos tratados con ETS2 se asemejan a las células iPS en su capacidad para expresar proteínas marcadoras de células madre pluripotentes. Por tanto, estas células fueron nombradas células "EPS".
30

Ejemplo 6

La combinación de ETS2 y Mesp1 induce el programa de progenitores cardiacos de novo en fibroblastos

35 A continuación, las células EPS se sometieron a transducción lentiviral con Mesp1 de ratón. Las células EPS resultantes que expresaban Mesp1 pudieron ser inducidas para formar cuerpos embrioides utilizando protocolos para la formación de cuerpos embrioides a partir de células ES. Los agregados celulares en placas fueron tratados además con activina y BMP4 durante 4 días y luego se examinaron a los 10 días. La expresión constitutiva de marcadores de células madre continuó incluso después de la transducción con Mesp1 y la adición de morfógenos del factor de crecimiento.
40

La inducción robusta de los factores progenitores cardiacos ISL1, NKX2.5, GATA4, MEF2C, TNT y MHC se observó por inmunotinción sólo en las células EPS infectadas con lentivirus que expresaban Mesp1. La figura 7 muestra células teñidas con DAPI para visualizar los núcleos (paneles de la izquierda), imágenes de contraste de fase (medio) y células teñidas con anticuerpos específicos para visualizar las proteínas indicadas (paneles de la derecha).
45

La figura 8 muestra que la infección con MesP1 de las células EPS induce el programa de progenitores cardiacos de novo en la célula que era originalmente NHDF. Las células progenitoras cardíacas posteriores a la agregación se colocaron en placas durante una semana y después fueron llevadas para el aislamiento de ARN. El ARN se transcribió utilizando transcriptasa inversa MMLV y la amplificación por PCR de 30 ciclos se realizó para GAPDH, NKX2.5, ISLI, GATA4, MEF2C, TBX5, MHC3, TNT, MLC2, CX43 y CX45 (remitirse a la Tabla 1 para los conjuntos de cebadores), utilizando la mezcla de polimerasas LA-16.
50

La Fig. 8 muestra que en EPS, las células crecieron durante 4 semanas, fueron agregadas y colocadas en placas por 7 días, no se observaron transcripciones de los marcadores del desarrollo del corazón temprano por RT-PCR. Del mismo modo, no se detectó expresión apreciable de los marcadores de desarrollo de corazón tempranos después de la infección de NHDF con Mesp1 solo. Sin embargo, la adición de Mesp1 a células EPS indujo la expresión robusta de marcadores progenitores mesodermos cardiacos incluyendo NKX2.5, ISLI, GATA4, MEF2C, TBX5, y la expresión de genes de proteínas cardiacas contráctiles incluyendo alfa MHC y troponina T.
55

La figura 9 muestra que la infección con MesP1 de las células EPS indujo el programa de progenitores cardíacos de novo secuencial según lo determinado por RT-PCR. Las células NHDF-P3 fueron infectadas con lentivirus ETS2, se hicieron crecer durante 4 semanas, luego fueron infectadas con lentivirus Mesp1, fueron agregadas y colocadas en placa durante 7 días. Se aisló el ARN diariamente y se analizó por RT-PCR en cuanto a la expresión de genes cardiogénicos.

La Fig. 10 muestra que la infección con MesP1 de las células EPS indujo la expresión génica del programa cardíaco de novo, como se muestra por la aparición de la tinción de fluorescencia de color Rojo-Tomate a partir de la construcción indicadora NKX2.5-Rojo Tomate. El potenciador NKX2.5/Smad/GATA, que se activa en progenitores cardíacos, estaba relacionado con el promotor mínimo Hsp68 adyacente al gen de resistencia a puromicina y una secuencia IRES y el poderoso indicador td-tomate (ADNc fue un regalo del doctor R. Tsien, Universidad de California, San Diego). Como puede observarse más arriba, la tinción de GFP resultó de la infección con lentivirus ETS2 y Mesp1 a progenitores cardíacos por la inducción de la expresión génica de NKX2.5. Obsérvese el aspecto de muchas células triangulares y rectangulares que aparecen que son altamente similares en forma a los miocitos cardíacos.

Fig. 11, el Panel A muestra un resumen de la clasificación FACS de células progenitoras cardíacas obtenidas a partir de tratamiento secuencial de NHDF con lentivirus ETS2 y después de las resultantes células EPS con lentivirus Mesp1. La citometría de flujo se realizó utilizando un analizador de BD Biosciences LSR II. Las células formadoras de colonias confluentes se disociaron con tripsina, se lavaron con PBS y se diluyeron hasta una concentración de 5×10^6 células/ml de PBS en 8 muestras. El panel A muestra células teñidas con GFP que representan la infección con lentivirus total, ya que cada virus es etiquetado con GFP. El panel B muestra que aproximadamente el 19% de las células infectadas con ETS2 y Mesp1 estaban manchadas por GFP y Rojo-Tomate (área sombreada). Como lo demuestra la activación de un indicador cardiogénico clave NKX2.5 Rojo-Tomate, ETS2 y Mesp1 convierten eficientemente NHDF en células con características muy parecidas a los progenitores cardíacos.

La Fig. 12 muestra que aproximadamente el 10 a 40% de células NHDF infectadas con ETS2 y Mesp1 mostraron marcadores de superficie de células endoteliales y cardíacos, CD31, CD34 y CD144 después de 9 días en cultivo. Esta es una línea adicional de evidencia de que ETS2 y Mesp1 convierten de manera eficiente NHDF en células con características muy parecidas a los miocitos cardíacos y endoteliales embrionarios.

Ejemplo 7

Propiedades cardíacas de células reprogramadas

La transducción lentiviral de un sistema seleccionable de puromicina usando un promotor de cadena pesada de alfa-miosina específica cardíaca lentiviral (alfa-MHC) y potenciador unido al gen de resistencia a puromicina dio lugar a un enriquecimiento de las células progenitoras cardíacas y la posterior observación de un ritmo cardíaco de las células transducidas, similares a las observadas en los miocitos cardíacos.

Un promotor de cadena pesada de miosina que impulsa la construcción del gen seleccionable de puromicina se transdujo en NHDF que fueron luego secuencialmente transducidos con ETS2 y Mesp1. Los agregados celulares obtenidos durante la formación de cuerpos embrioides de caída de presión se trataron entonces con 50 ug/ml de puromicina para seleccionar células resistentes a la puromicina y por lo tanto con el promotor específico cardíaco activo alfa-MHC.

Después de 9 días se observó latido en cultivos celulares y se capturaron utilizando microscopía de vídeo y se convirtieron en vídeos MPEG. Se contó el latido por agregado cultivado por placa durante 20 segundos y luego se multiplicó por 3 para latidos por un minuto (Fig. 13). Se realizaron tres mediciones independientes por agregado en una placa de cultivo de tejido o pocillo.

La reprogramación de células EPS con Mesp1 resultó en una fuerte expresión de genes progenitores cardíacos según lo determinado por RT-PCR y la inmunotinción. Además, la citometría de flujo mostró que Mesp1 eficientemente convirtió las células EPS en células con marcadores de superficie CD31, CD34 y CD144 semejando células cardíacas humanas. Finalmente, el ritmo cardíaco se observó en los cultivos celulares. Esto completó la conversión de fibroblastos de piel a células cardiogénicas terminalmente diferenciadas.

REFERENCIAS CITADAS

DOCUMENTOS PATENTE ESTADOUNIDENSES

Publicación de patente Estadounidense No. 2009/0227032 para S.Yamanaka.

REFERENCIAS NO PATENTES

Bergmann, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science 324: 5923, 98-102, 2009.

Beh, J. et al. FoxF is essential for FGF-induced migration of heart progenitor cells in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* 134: 3297-3305, 2007.

5 Davidson, B. *Ciona intestinalis* as a model for cardiac development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18: 16-26, 2007. Davidson, B. and Levine, M. Evolutionary origins of the vertebrate heart: Specification of the cardiac lineage in *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11469-11473.

Imai, K.S., Satoh, N. and Satou, Y. A Twist-like bHLH gene is a downstream factor of an endogenous FGF and determines mesenchymal fate in the ascidian embryos. *Development* 130: 4461-4472, 2003.

10 Imai, K.S., Hino, K., Yagi, K., Satoh, N. and Satou, Y. Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks. *Development* 131: 4047-4058, 2004.

Kitajima, S. et al. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development* 127: 3215-3226, 2000.

Moretti, A. et al. Multipotent embryonic isl+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle and endothelial cell diversification. *Cell* 127: 1151-1165, 2006.

15 Park, I.H. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141-146, 2008.

Saga, Y. et al. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126:3437-3447, 1999.

20 Saga, Y., Kitajima, S. and Miyagawa-Tomita, S. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med.* 10:345-352, 2000.

Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872, 2007.

Yu, J. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920, 2007.

LISTADO DE SECUENCIAS

25

<110> Schwartz, Robert J.

<120> ETS2 y MESP1 generan progenitores cardíacos a partir de fibroblastos

<130> 134615.00006

<160> 86

<170> |Patente en versión 3.5

<210> 1

<211> 1820

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> |Secuencia del gen ELK4 humano

<400> 1

30

ES 2 533 581 T3

ggagccccgc	gcgcggcgtc	gctcattgct	atggacagtg	ctatcacctc	gtggcagttc	60
cttcttcagc	tctgcagaa	gcctcagaac	aagcacatga	tctggtggac	ctctaataat	120
gggcagttta	agcttttgca	ggcagaagag	gtggctcgtc	tctgggggat	tcgcaagaac	180
aagcctaaca	tgaattatga	caaactcagc	cgagccctca	gatactatta	tgtaaagaat	240
atcatcaaaa	aagtgaatgg	tcagaagttt	gtgtacaagt	ttgtctctta	tccagagatt	300
ttgaacatgg	atccaatgac	agtgggcagg	attgaggggtg	actgtgaaag	tttaaacttc	360
agtgaagtca	gcagcagttc	caaagatgtg	gagaatggag	ggaaagataa	accacctcag	420
cctggtgcc	agacctctag	cgcgaatgac	tacatacact	ctggcttata	ttcttcattt	480
actctcaact	ctttgaactc	ctccaatgta	aagcttttca	aattgataaa	gactgagaat	540
ccagccgaga	aactggcaga	gaaaaaatct	cctcaggagc	ccacaccatc	tgtcatcaaa	600
tttgtcacga	caccttccaa	aaagccaccg	gttgaacctg	ttgctgccac	catttcaatt	660
ggcccaagta	tttctccatc	ttcagaagaa	actatccaag	ctttggagac	attggtttcc	720
ccaaaactgc	cttccctgga	agcccccaacc	tctgcctcta	acgtaatgac	tgcttttgcc	780
accacaccac	ccatttcgtc	catacccctt	ttgcaggaac	ctcccagaac	accttcacca	840
ccactgagtt	ctcaccacaga	catcgacaca	gacattgatt	cagtggcttc	tcagccaatg	900
gaacttccag	agaatttgtc	actggagcct	aaagaccagg	attcagtctt	gctagaaaag	960
gacaaagtaa	ataattcatc	aagatccaag	aaaccctaaag	ggttagaact	ggcaccacc	1020
cttgtgatca	cgagcagtga	tccaagccca	ctgggaatac	tgagcccatc	tctccctaca	1080
gcttctctta	caccagcatt	tttttcacag	gtagcttgct	cgctctttat	ggtgtcacca	1140
ttgctttcat	ttatttgccc	ttttaagcaa	atccagaatt	tatacactca	agtttgcttt	1200
ctgttactta	ggtttgctt	agaaaggta	tgtgtgactg	tcatgtgaaa	gtaaccccat	1260
ttctcatctt	aattaggatt	gctaaaatag	aaagtttggga	gtattttctt	aaaaaattca	1320_

ES 2 533 581 T3

ttgttctaca agtaaataaa tattttgatt tttctatttc ctctaaaga aagtacacac	1380
actctctcgc tctctctcgg tcttataaaa ctcgttggtg tcttataaaa caaacagtga	1440
taatctcaag ttagaaaaca gtaggtcctg agaaccataa gaaaaatgac tgggtgtgatg	1500
ttgagtaaca agttggtaca gttactttag ctatttatta acttgctcat ctcatagaac	1560
atthtaatag atthttcaca cacctcatta ttaaaaaaaaa acaaacatgc tgggtgtcttg	1620
gtaaccatt attcctctgt acctgaattc aggttggttt ttctatttgg aaaagacttt	1680
ataaatggtg gcttaaaaag aggttgagca ccagaatctc agaatttacc accaaagaac	1740
tcatccatgt aaccaaaaac cacttgtacc cccaaaaact attgaaataa aaatttaaaa	1800
aattaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1820

<210> 2

<211> 405

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> |Secuencia de proteína ELK4 humana

<400> 2

5

10

15

ES 2 533 581 T3

Met Asp Ser Ala Ile Thr Leu Trp Gln Phe Leu Leu Gln Leu Leu Gln
 1 5 10 15

Lys Pro Gln Asn Lys His Met Ile Cys Trp Thr Ser Asn Asp Gly Gln
 20 25 30

Phe Lys Leu Leu Gln Ala Glu Glu Val Ala Arg Leu Trp Gly Ile Arg
 35 40 45

Lys Asn Lys Pro Asn Met Asn Tyr Asp Lys Leu Ser Arg Ala Leu Arg
 50 55 60

Tyr Tyr Tyr Val Lys Asn Ile Ile Lys Lys Val Asn Gly Gln Lys Phe
 65 70 75 80

Val Tyr Lys Phe Val Ser Tyr Pro Glu Ile Leu Asn Met Asp Pro Met
 85 90 95

Thr Val Gly Arg Ile Glu Gly Asp Cys Glu Ser Leu Asn Phe Ser Glu
 100 105 110

Val Ser Ser Ser Ser Lys Asp Val Glu Asn Gly Gly Lys Asp Lys Pro
 115 120 125

Pro Gln Pro Gly Ala Lys Thr Ser Ser Arg Asn Asp Tyr Ile His Ser
 130 135 140

5

10

15

ES 2 533 581 T3

Gly Leu Tyr Ser Ser Phe Thr Leu Asn Ser Leu Asn Ser Ser Asn Val
 145 150 155 160

Lys Leu Phe Lys Leu Ile Lys Thr Glu Asn Pro Ala Glu Lys Leu Ala
 165 170 175

Glu Lys Lys Ser Pro Gln Glu Pro Thr Pro Ser Val Ile Lys Phe Val
 180 185 190

Thr Thr Pro Ser Lys Lys Pro Pro Val Glu Pro Val Ala Ala Thr Ile
 195 200 205

Ser Ile Gly Pro Ser Ile Ser Pro Ser Ser Glu Glu Thr Ile Gln Ala
 210 215 220

Leu Glu Thr Leu Val Ser Pro Lys Leu Pro Ser Leu Glu Ala Pro Thr
 225 230 235 240

Ser Ala Ser Asn Val Met Thr Ala Phe Ala Thr Thr Pro Pro Ile Ser
 245 250 255

Ser Ile Pro Pro Leu Gln Glu Pro Pro Arg Thr Pro Ser Pro Pro Leu
 260 265 270

Ser Ser His Pro Asp Ile Asp Thr Asp Ile Asp Ser Val Ala Ser Gln
 275 280 285

Pro Met Glu Leu Pro Glu Asn Leu Ser Leu Glu Pro Lys Asp Gln Asp
 290 295 300

Ser Val Leu Leu Glu Lys Asp Lys Val Asn Asn Ser Ser Arg Ser Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Lys Gly Leu Glu Leu Ala Pro Thr Leu Val Ile Thr Ser Ser
 325 330 335

Asp Pro Ser Pro Leu Gly Ile Leu Ser Pro Ser Leu Pro Thr Ala Ser
 340 345 350

Leu Thr Pro Ala Phe Phe Ser Gln Val Ala Cys Ser Leu Phe Met Val
 355 360 365

Ser Pro Leu Leu Ser Phe Ile Cys Pro Phe Lys Gln Ile Gln Asn Leu
 370 375 380

Tyr Thr Gln Val Cys Phe Leu Leu Leu Arg Phe Val Leu Glu Arg Leu
 385 390 395 400

Cys Val Thr Val Met

<210> 3
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de codificación ELK4 humana

<400> 3

```

atggacagtg ctatcacect gtggcagttc ettcttcagc tcctgcagaa gcctcagaac      60
aagcacatga tctgttggac ctctaattgat gggcagttta agcttttgca ggcagaagag      120
gtggctcgtc tctgggggat tgcgaagaac aagcctaaca tgaattatga caaactcagc      180
cgagccctca gatactatta tgtaaagaat atcatcaaaa aagtgaatgg tcagaagttt      240
gtgtacaagt ttgtctctta tccagagatt ttgaacatgg atccaatgac agtgggcagg      300
attgaggggtg actgtgaaag tttaaacttc agtgaagtca gcagcagttc caaagatgtg      360
gagaatggag ggaaagataa accacctcag cctggtgcca agacctctag ccgcaatgac      420
tacatacact ctggcttata ttcttcattt actctcaact ctttgaactc ctccaatgta      480
aagcttttca aattgataaa gactgagaat ccagccgaga aactggcaga gaaaaaatct      540
cctcaggagc ccacaccatc tgtcatcaaa tttgtcacga caccttcaa aaagccaccg      600
gttgaacctg ttgctgccac catttcaatt ggcccaagta tttctccatc ttcagaagaa      660
actatccaag ctttgagagc attggtttcc caaaactgc cttccctgga agccccaacc      720
tctgcctcta acgtaatgac tgcttttgcc accacaccac ccatttcgtc cataccccct      780
ttgcaggaac ctcccagaac accttcaaca ccaactgagtt ctcaaccaga catcgacaca      840
gacattgatt cagtggcttc tcagccaatg gaacttccag agaatttgtc actggagcct      900
aaagaccagg attcagtctt gctagaaaag gacaaagtaa ataattcatc aagatccaag      960
aaacccaaag ggttagaact ggcaccacc cttgtgatca cgagcagtga tccaagccca     1020
ctgggaatac tgagcccatc tctccctaca gcttctctta caccagcatt tttttcacag     1080
gtagcttgct cgctctttat ggtgtcacca ttgctttcat ttatttgccc ttttaagcaa     1140
atccagaatt tatacactca agtttgcttt ctgttactta ggtttgcctt agaaaggtta     1200
tgtgtgactg tcatgtga
    
```

<210> 4
 <211> 1122
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 533 581 T3

<220>

<223> Secuencia del gen MesP1 de ratón

<400> 4

```

gatatcgaat tctggaaggg gcccgcttca cacctagggc tcaggataaa gctacagcgg      60
acccaatggt caggcctccg ttgccatggc ccagcccctg tgcgagccgc gctccgagtc      120
ctggatcctg agtcccctg gtccggcagcc accgatgcct tccgatggga acagcgtctg      180
ctccccagcc tggtcctcgg acccgtggga cgggtgccag gccagcagcc ctgcaccacc      240
ctgcgcccgc ccggcccggc gtgctgggac cccgggtagg cgcgggacgc acggtagccg      300
cctgggtagc ggacagcggc agagcgcagc cgagcgggag aagctacgta tgcgcacact      360
cgcccgcgcg ctgcacgagc tgcgccgctt cttgccgcca tccgtggcac caaccggcca      420
gaacctgacc aagatcgaga cgctgcgcct ggccatccgc tacattggcc acctgtcggc      480
tgtgctggga ctcagcgagg acaacctccg gcgacagcgg cacgcggtgt cacctcgagg      540
ctgcccctg tgcgccgaca gcgacctggc gcagtcgcag tcaactcggc ctggtttaag      600
cccggccctc tgcagcgggg tgtcgtgggg atccccgcct gcctacccta gaccccgagt      660
cgccgcagaa tcgtgggacc catcgttcca gtacgcagaa acagcatccc aggaaaggca      720
ggaaatggag cccagtccct catctccgct cttcagcagc gacatgctgg ctcttctaga      780
aacctggacg ccgccgcagg agtggccgcc tgcctgaaga gtggagggga caatgcaacg      840
gatgattgtc accctgtctg agcacagaca cttttccttt ggtcttggca ccttcggagg      900
gagtagatcc tggaaagaggc ggcagtgata ccaacatggg catcccgggg tgggagctgg      960
ccctcatcca gactgtacca ttccaaccct ccttgggaag aggcgcccaa tagggtacac     1020
gctctaaaga tgaagcaggc acaagctttg cctgggtgtg atttatttat ttgtgaataa     1080
accgattgtg ctagtgtcaa aacctggata gtcgatccac ta                               1122

```

<210> 5

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> lSecuencia de proteína MesP1 de ratón

<400> 5

ES 2 533 581 T3

atggcccagc ccctgtgcga gccgcgctcc gagtcctgga tcctgagtc ccctgggtcgg 60
cagccaccga tgccttccga tgggaacagc gtctgctccc cagcctggtc ctgggacccg 120
tgggacgggtg cccaggccag cagccctgca ccaccctgcg cccgcccggc ccggcgtgct 180
gggaccccggt gtagggcggg gacgcacggt agccgcctgg gtagcggaca gcggcagagc 240
gccagcgagc gggagaagct acgtatgccc aactcgcgcc gcgcgctgca cgagctgcgc 300

cgcttcttgc cgccatccgt ggcaccaacc ggccagaacc tgaccaagat cgagacgctg 360
cgcttgcca tccgctacat tggccacctg tcggctgtgc tgggactcag cgaggacaac 420
ctccggcgac agcggcacgc ggtgtcacct cgaggctgcc cgctgtgccc cgacagcgac 480
ctggcgcagt cgcagtcact cggtcctggt ttaagcccgg ccgtctgcag cgggggtgtcg 540
tggggatccc cgctgccta ccctagacct cgagtcgccc cagaatcgtg ggacccatcg 600
ttccagtacg cagaaacagc atcccaggaa aggcaggaaa tggagcccag tccctcatct 660
ccgctcttca gcagcgacat gctggctctt ctagaaacct ggacgcccgc gcaggagtgg 720
ccgctgcct ga 732

<210> 7

<211> 2500

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del gen ETS2 humano

<400> 7

ES 2 533 581 T3

gtgtcgctcc agctcagagc tcccggagcc gcccgccag cgtccggcct cctgatcgt 60
 ctctggccgg cgccctcgcc ctcgcccggc gcgcaccgag cagccgcggg cgccgagcag 120
 ccaccgtccc gaccaagcgc cggccctgcc cgcagcggca ggatgaatga tttcggaatc 180
 aagaatatgg accaggtagc ccctgtggct aacagttaca gagggacact caagcgccag 240
 ccagcctttg acacctttga tgggtccctg tttgctgttt ttccttctct aatgaagag 300
 caaacactgc aagaagtgcc aacaggcttg gattccattt ctcatgactc cgccaactgt 360
 gaattgcctt tgttaacccc gtgcagcaag gctgtgatga gtcaagcctt aaaagctacc 420
 ttcagtggct tcaaaaagga acagcggcgc ctgggcattc caaagaacc ctaggctgtgg 480
 agtgagcaac aggtatgcca gtggcttctc tgggccacca atgagttcag tctgggtgac 540
 gtgaatctgc agaggttcgg catgaatggc cagatgctgt gtaaccttgg caaggaacgc 600
 tttctggagc tggcacctga ctttgtgggt gacattctct gggaacatct ggagcaaatg 660
 atcaaagaaa accaagaaaa gacagaagat caatatgaag aaaattcaca cctcacctcc 720
 gttcctcatt ggattaacag caatacatta ggttttggca cagagcaggc gccctatgga 780
 atgcagacac agaattacc caaaggcggc ctctggaca gcatgtgtcc ggctccaca 840
 cccagcgtac tcagctctga gcaggagttt cagatgttcc ccaagtctcg gctcagctcc 900
 gtcagcgtca cctactgctc tgtcagtcag gacttcccag gcagcaactt gaatttgctc 960
 accaacaatt ctgggacgcc caagaccac gactcccctg agaacgggtgc ggacagcttc 1020
 gagagctcag actccctcct ccagtcctgg aacagccagt cgtccttctg ggatgtgcaa 1080
 cgggttcctt ccttcgagag cttcgaagat gactgcagcc agtctctctg cctcaataag 1140

ES 2 533 581 T3

ccaaccatgt ctttcaagga ttacatccaa gagaggagtg acccgggtgga gcaaggcaaa 1200
 ccagttatac ctgcagctgt gctggccggc ttcacaggaa gtggacctat tcagctgtgg 1260
 cagtttctcc tggagctgct atcagacaaa tcttgccagt cattcatcag ctggactgga 1320
 gacggatggg agtttaagct cgccgacccc gatgaggtgg cccgcccggg gggaaagagg 1380
 aaaaataagc ccaagatgaa ctacgagaag ctgagccggg gcttacgcta ctattacgac 1440
 aagaacatca tccacaagac gtcggggaag cgctacgtgt accgcttctg gtgogacctc 1500
 cagaacttgc tggggttcac gcccgaggaa ctgcacgcca tcttgggctg ccagcccgac 1560
 acggaggact gaggtcgccg ggaccaccct gagccggccc caggctctgt gactgagtgg 1620
 gaagcccatc ctgaccagct gctccgagga cccaggaaag gcaggattga aaatgtccag 1680
 gaaagtggc aagaagcagt ggccttattg catcccaaac cacgcctctt gaccaggctg 1740
 cctcccttgt ggcagcaacg gcacagctaa ttctactcac agtgctttta agtgaaaatg 1800
 gtcgagaaaag aggaccagg aagccgtcct ggccgctggc agtccgtggg acgggatggt 1860
 tctggctgtt tgagattctc aaaggagcga gcatgtctgt gacacacaca gactatttt 1920
 agattttctt ttgccttttg caaccaggaa cagcaaatgc aaaaactctt tgagagggta 1980
 ggaggggtgg aaggaaacaa ccatgtcatt tcagaagtta gtttgtatat attattataa 2040
 tcttataatt gttctcagaa tcccttaaca gttgtattta acagaaattg tatattgtaa 2100
 tttaaaataa ttatataact gtatttgaaa taagaattca gacatctgag gttttatttc 2160
 atttttcaat agcacatatg gaattttgca aagatttaat ctgccaaagg ccgactaaga 2220
 gaagttgtaa agtatgtatt atttacattt aatagactta cagggataag gcctgtgggg 2280
 ggtaatccct gctttttgtg tttttttgtt tgtttgtttg tttgtttttg gggggttttc 2340
 ttgccttggg tgtctggcaa ggactttgta catttgggag tttttatgag aaacttaaat 2400
 gttattatct gggcttatat ctggcctctg ctttctcctt taattgtaa gtaaaagcta 2460
 taaagcagta ttttcttga caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2500

<210> 8

<211> 469

<212> PRT

<213> .Secuecnia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteína ETS2 humana

<400> 8

ES 2 533 581 T3

Met Asn Asp Phe Gly Ile Lys Asn Met Asp Gln Val Ala Pro Val Ala
1 5 10 15

Asn Ser Tyr Arg Gly Thr Leu Lys Arg Gln Pro Ala Phe Asp Thr Phe
 20 25 30

5

10

15

20

25

30

ES 2 533 581 T3

Asp Gly Ser Leu Phe Ala Val Phe Pro Ser Leu Asn Glu Glu Gln Thr
 35 40 45

 Leu Gln Glu Val Pro Thr Gly Leu Asp Ser Ile Ser His Asp Ser Ala
 50 55 60

 Asn Cys Glu Leu Pro Leu Leu Thr Pro Cys Ser Lys Ala Val Met Ser
 65 70 75 80

 Gln Ala Leu Lys Ala Thr Phe Ser Gly Phe Lys Lys Glu Gln Arg Arg
 85 90 95

 Leu Gly Ile Pro Lys Asn Pro Trp Leu Trp Ser Glu Gln Gln Val Cys
 100 105 110

 Gln Trp Leu Leu Trp Ala Thr Asn Glu Phe Ser Leu Val Asn Val Asn
 115 120 125

 Leu Gln Arg Phe Gly Met Asn Gly Gln Met Leu Cys Asn Leu Gly Lys
 130 135 140

 Glu Arg Phe Leu Glu Leu Ala Pro Asp Phe Val Gly Asp Ile Leu Trp
 145 150 155 160

 Glu His Leu Glu Gln Met Ile Lys Glu Asn Gln Glu Lys Thr Glu Asp
 165 170 175

 Gln Tyr Glu Glu Asn Ser His Leu Thr Ser Val Pro His Trp Ile Asn
 180 185 190

 Ser Asn Thr Leu Gly Phe Gly Thr Glu Gln Ala Pro Tyr Gly Met Gln
 195 200 205

 Thr Gln Asn Tyr Pro Lys Gly Gly Leu Leu Asp Ser Met Cys Pro Ala
 210 215 220

 Ser Thr Pro Ser Val Leu Ser Ser Glu Gln Glu Phe Gln Met Phe Pro
 225 230 235 240

 Lys Ser Arg Leu Ser Ser Val Ser Val Thr Tyr Cys Ser Val Ser Gln
 245 250 255

 Asp Phe Pro Gly Ser Asn Leu Asn Leu Leu Thr Asn Asn Ser Gly Thr
 260 265 270

 Pro Lys Asp His Asp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Asp Ser Phe Glu Ser
 275 280 285

 Ser Asp Ser Leu Leu Gln Ser Trp Asn Ser Gln Ser Ser Leu Leu Asp

ES 2 533 581 T3

atgaatgatt tCGgaatcaa gaatatggac caggtagccc ctgtggctaa cagttacaga 60
 gggacactca agcGCCagcc agcctttgac acctttgatg ggtccctggt tgctgttttt 120
 ccttctctaa atgaagagca aacctgcaa gaagtGCCaa caggcttggga ttccatttct 180
 catgactccg ccaactgtga attgcctttg ttaaccccgt gcagcaaggc tgtgatgagt 240
 caagccttaa aagctacctt cagtggcttc aaaaaggaac agcggcgcct gggcattcca 300
 aagaaccctt ggctgtggag tgagcaacag gtatgccagt ggcttctctg ggccaccaat 360
 gagttcagtc tggTgaacgt gaatctgcag aggttcggca tgaatggcca gatgctgtgt 420
 aaccttggca aggaacgctt tctggagctg gcacctgact ttgtgggtga cattctctgg 480
 gaacatctgg agcaaatgat caaagaaaac caagaaaaga cagaagatca atatgaagaa 540
 aattcacacc tcacctccgt tcctcattgg attaacagca atacattagg ttttggcaca 600
 gagcaggcgc cctatggaat gcagacacag aattaccca aaggcggcct cctggacagc 660
 atgtgtccgg cctccacacc cagcgtactc agctctgagc aggagtttca gatgttcccc 720
 aagtctcggc tcagctccgt cagcgtcacc tactgctctg tcagtcagga cttcccaggc 780
 agcaacttga atttgctcac caacaattct gggacgcca aagaccacga ctcccctgag 840
 aacgggtcgg acagcttcca gagctcagac tccctcctcc agtcctggaa cagccagtcc 900
 tccttctctg atgtgcaacg ggTtccttcc ttcgagagct tcgaagatga ctgcagccag 960
 tctctctgcc tcaataagcc aacctgtct ttcaaggatt acatccaaga gaggagtgac 1020
 ccggTggagc aaggcaaacc agttatacct gcagctgtgc tggccggctt cacaggaagt 1080
 ggacctattc agctgtggca gtttctcctg gagctgctat cagacaaatc ctgccagtca 1140
 ttcatcagct ggactggaga cggatgggag tttaaagctc cggaccccga tgaggTggcc 1200
 cgccggTggg gaaagaggaa aaataagccc aagatgaact acgagaagct gagccggggc 1260
 ttacgctact attacgaaa gaacatcatc cacaagacgt cggggaagcg ctacgtgtac 1320
 cgcttctgtg gcgacctcca gaacttgctg gggTtcagc cggaggaact gcacgccatc 1380
 ctgggcgtcc agcccGacac ggaggactga 1410

<210> 10
 <211> 5143
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ETS humano

<400> 10

ES 2 533 581 T3

agttgaaaag agaccacaga ctttgagga agctcactca ggatctgctc tccggcaaag	60
tagtaagtga ggtgctgaga gcagaatgag ctactttgtg gattctgctg ggagcagccc	120
cgtcccttac tcagcgcctc gtcctgcagt ggtgaggcaa ggacctagca aacttatga	180
agatcctcga atgaactgtg gtttccagtc caattatcac cagcaaagac cttgctaccc	240
cttttgggat gagatggcaa ctcaggaagt tcctactggt cttgaacact gtgtctcaga	300
tatggaatgt gcagatgtcc cactattaac tccaagcagc aaagaaatga tgtctcaagc	360
attaaaagct actttcagtg gtttcaactaa agaacagcaa cgactgggga tcccaaaaga	420
ccccggcag tggacagaaa cccatgttcg ggactgggtg atgtgggctg tgaatgaatt	480

5

10

15

20

25

ES 2 533 581 T3

cagcctgaaa ggtgtagact tccagaagtt ctgtatgaat ggagcagccc tctgcgcctt 540
 gggtaaagac tgctttctcg agctggcccc agactttggt ggggacatct tatgggaaca 600
 tctagagatc ctgcagaaag aggatgtgaa accatatcaa gttaatggag tcaaccagc 660
 ctatccagaa tcccgtata cctcggatta cttcattagc tatggtattg agcatgccca 720
 gtgtgttcca ccatcggagt tctcagagcc cagcttcac acagagtcct atcagacgct 780
 ccatcccatc agctcggag agctcctctc cctcaagtat gagaatgact acccctcgg 840
 cattctccga gaccctctcc agacagacac cttgcagaat gactactttg ctatcaaca 900
 agaagtctgc accccagaca acatgtgcat ggggaggacc agtcgtggta aactcggggg 960
 ccaggactct ttgaaagca tagagagcta cgatagttgt gatcgcctca ccagtcctg 1020
 gagcagccag tcatctttca acagcctgca gcgtgttccc tcctatgaca gcttcgactc 1080
 agaggactat cgggtgccc tgcccaacca caagcccaag ggcacctca aggactatgt 1140
 gcgggaccgt gctgacctca ataaggaca gcctgtcatt cctgctgctg ccctagctgg 1200
 ctacacaggc agtggacca tccagctatg gcagtttctt ctggaattac tactgataa 1260
 atcctgtcag tctttatca gctggacagg agatggctgg gaattcaaac tttctgacc 1320
 agatgaggtg gccaggagat ggggaaagag gaaaaacaaa cctaagatga attatgagaa 1380
 actgagccgt ggcctacgct actattacga caaaaacatc atccacaaga cagcggggaa 1440
 acgctacgtg taccgctttg tgtgtgacct gcagagcctg ctgggtaca cccctgagga 1500
 gctgcacgcc atgctggacg tcaagccaga tgccgacgag tgatggcact gaaggggctg 1560
 gggaaaccct gctgagacct tccaaggaca gccgtgttg ttggactctg aattttgaat 1620
 tgttattcta tttttatct tccagaactc atttttacc ttcaggggtg ggagctaagt 1680
 cagttgcagc tgtaatcaat tgtgcgagc tgggaaagga aagccaggac ttgtgggtg 1740
 ggtgggacca gaaattcttg agcaaatttt caggagaggg agaagggcct tctcagaagc 1800
 ttgaaggctc tggcttaaca gagaaagaga ctaatgtgtc caatcatttt taaaaatcat 1860
 ccatgaaaaa gtgtcttgag ttgtggacct attagcaagt gacattgtca catcagaact 1920
 catgaaactg atgtaaggca attaatctgc ttctgttttt aggtctggga gggcaaaaaa 1980
 gaggtgggtg ggatgaaaca tgttttggg ggggatgcac tgaaaatctg agaactattt 2040
 acctatcact ctagttttga agcaaagatg gacttcagtg gggaggggcc aaaaccgttg 2100
 ttgtgttaaa atttatttta ttaaattttg tgccagtatt tttttctta aaaatcgtct 2160
 taagctctaa ggtggtctca gtattgcaat atcatgtaag tttgttttta tttgccgct 2220
 gaggattctg tcacaatgaa agaaaactgt ttatatagac cccattggaa aagcaaacg 2280
 ctctcactga gatcagggat cccaaattca tgggacttat ataagaagga caattaatgc 2340
 tgatttgggt acaggggaat tatgtgtgtg aatgtcatct acaattaaaa aaaattagca 2400
 catcccttta cttacttggt atcagtggt tctcggggtt tggacttaat gttgagctaa 2460

ES 2 533 581 T3

gaagcattaa gtctttgaac tgaatgtatt ttgcatccct ggttttggac gacagtaaac 2520
 gtaggagcac tgttgaagtc ctggaagggg gatcgaagga ggaagattga cttggttcct 2580
 tcttagtcct atatctgtag catagatgac ttggaataaa agctgtatgc atgggcatta 2640
 ccctcaggt cctaagaaat aagtctgaa tgcattgctg tccaaactaa cactctgtaa 2700
 tttttctttt atgtcttatt ttccaagagt cctccatttt ttgcaccccc tcaccgcaa 2760
 ctctgttatt cagtagagag aagtgtacgg ctttctgatt ggtgagtga aaagtaactt 2820
 gagacacgac ctaagttgaa gagtttagac ttgctgagtt ttagaagtga tggaaattaa 2880
 gagagcattt caataaaatg tgacttggct gtctttggaa gagaagtgca aggctttcct 2940
 ttgaagaatt taaattagtc cggtaggatg tcaggtgaga ctgtgtatgc aaaatgaatg 3000
 gcacaggtga tgccagggcc tcttgcttgg gtctgatgct ttggcacagg gtaagtgaag 3060
 gttaattcca gaagagagga atgactttaa ggcaaaggaa actaaggaa gaggttcagt 3120
 gaggaaaata aggttgcaca tgagatttga atagattttt agttcccca aggtttaaat 3180
 acaaacatag tcaagcaagg tagtcatctt tctgctggtt gtgaggggga atctgaaaat 3240
 ggagttttag aggaaaagtc aacatctaac tagtgaggaa aagtgcctaa tacaattaga 3300
 atctccctca ctctatagtt gccagttga aaggataagg aggaggggtg gcttttatgg 3360
 acttccatga gagaaggaaa gaaatatttc aggttaagctt ctcagggctg gccctttttg 3420
 ggatttggat gagaaattgg aagtactaac tactttctag catatcttta agaaaattga 3480
 ttgttattta ctcccagatc ctcttgcaga cccagaatta tcaggaacat agctctgtga 3540
 ttcatgagtg tccccatact gatgaattgg agcatccata tggaaagcaa aggcagaatt 3600
 atcccagctg tattattttg atcttttggg tgcaggtgcc ttaatgaagc tctcaaaata 3660
 ttttaggagc tgctcagggg gtgttgggtg gaactgtttg gactacattg ttttctctta 3720
 gattatgtga tttttgttgg gcactggcaa aagggtgtgtg tgtgaatgtg tgcattgtgtg 3780
 tgaatgttgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtttgcagac 3840
 atgcaaaact gcagctgaaa taatacctta gatttctagc taagtcttcc cacatttcaa 3900
 taatgggtaa gagtagaac agggccgggt atcaattatt gcttgcctgt tgcaaccagg 3960
 cataaaatca ctttctcaa tcatccaccg ttctatttaa atttatgccg gaaactctcc 4020
 ttctgtgagt ataactcctg cagttcctat agcagataag atataagaaa gtgcctccta 4080
 gtgctcctcc gcccgcttgt ttgctaaaat tccctttctc tctaagtcca ccattttcaa 4140
 gattttaga tagtgtatta gtttaagacag ctttgcgat ctggccagat gttttttctc 4200
 ctttgcctca aggccagaga ccatcccagg aagagtgggt ggtggtttat aactggaaa 4260
 tgttgcgttt atgcttttta aaaacacacg ttaacttcag aggaaggatg ggcaaatctg 4320
 gtctagctgg gtgaaacctt tttttcca gagatgcctt aacctttgtt ggttttggct 4380

ES 2 533 581 T3

ttagggttca gaggcacttt tgggtcccttc tccattctgg agagggactt cccctacata 4440
 gagccctgat ttttgtggct gtggggattg gaggtagcat tcaaagatca gatgtgcttt 4500
 tcctcacttt ggagatgaac actctggggtt ttacagcatt aacctgccta accttcatgg 4560
 tgagaaatac accatctctc ttctagtcac gctgtgcatg ccgcttactc tgttggggtc 4620
 tatataaatt tgttgaactc ttacctacat tccaaagaag tttcaaggaa ccataaatat 4680
 atgtatacat atacatatat aaaatatata tattaataa aaattatcag gaatactgcc 4740
 tcagttattg aacttttttt ttttaagaata cttttttttt aagctgagaa gtatagggat 4800
 gaaaaagatg ttatattgtg ttgactatt ttccaacttg tattttcata taatttatat 4860
 tttttaaaag ctgaaaattt agaagcaaga tgaaaaaaag gaaaagcagg tgctttttta 4920
 aatcagaac tgaggtagct tagagatgta gcgatgtaag tgcgatggt tttttaaaaa 4980
 aaaatgcaaa aaaattctta tggcggagtt ttttgtttgt ttattttagt agctgatgct 5040
 ggcacatcat tttgctggag agttttttat atactgtagc ctgatttcat attgtatttt 5100
 aaactgtgtg aaattaaaaa caaagaattt cattcataat gct 5143

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador GapdhFP ctrl exp

<400> 11
 tttgccaac aatgaccct t 21

<210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador GapdhRP ctrl exp

<400> 12
 ctccacgacg tactcagcg 19

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador hNanogFP ctrl exp

<400> 13
 cagaaggcct cagcacctac 20

<210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador hNanogRP ctrl exp

 <400> 14
 tatagaaggg actgtccag gc 22

 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador hOct 3/4FP ctrl exp

 <400> 15
 ctggaatccc gaatgaaag gg 22

 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador hOct 3/4 RP ctrl exp

 <400> 16
 ccttcccaaa tagaaccocc a 21

 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador Sox2 HPB F

 <400> 17
 tggacagta cgcgacat 19

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador Sox2 HPB R

 <400> 18
 cgagtaggac atgctgtagg t 21

 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador hRex1FP ctrl exp

<400> 19

gctgaccacc agcacactag gc 22

<210> 20

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador hRex1RPctrl exp

<400> 20

ttctggtgt ctgtctttg cccg 24

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador c-Myc HPB F

<400> 21

aggcgaacac acaacgtctt 20

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador c-Myc HPB R

<400> 22

ttggacggac aggatgtatg c 21

<210> 23

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador hKlf4FP ctrl exp

<400> 23

atggctgtca gcgacgcgct gctc 24

<210> 24

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador hKlf4RP ctrl exp

<400> 24
cggtgaactc ctcggtctct ctcc 24

<210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Nkx 2.5 FP

<400> 25
ccctgaccga tcccacctca ac 22

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Nkx 2.5 RP

<400> 26
ggcgggacgac ggcgagatag c 21

<210> 27
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Mesp 1 FP

<400> 27
tcgaagtggc tcctggcag ac 22

<210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Mesp 1 RP

<400> 28
cctcctgctt gctctaaagt gtc 23

<210> 29
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Mesp 2 FP

<400> 29

cgctgcgctt ggccatccgc tacat 25

<210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador Mesp 2 RP

<400> 30
 gcccccaaggg gaccccgga c 21

<210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador Mef2c FP

<400> 31
 gcaccagtgc aggaacggg 20

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador Mef2c RP

<400> 32
 gactgagccg actgggagtt a 21

<210> 33
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador Sox 17 FP

<400> 33
 gcggcgcaag caggtgaag 19

<210> 34
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

<220>
 <223> ACTCTGGCAGTCGCGGTAGTGGC

<400> 34
 actctggcag tcggtagt ggc 23

<210> 35

<211> 23
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador FoxA2 FP

 <400> 35
 ctgaagccgg aacaccacta cgc 23

 <210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador FoxA2 RP

 <400> 36
 tccaggcccg tttgttctg gac 23

 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador FGF8 FP

 <400> 37
 agctcagccg ccgctcatc cg 22

 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador FGF8 RP

 <400> 38
 agccctcgta cttggcattc tgc 23

 <210> 39
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador MyoD FP

 <400> 39
 aggggctagg ttcagcttc tcg 23

 <210> 40
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador MyoD RP

 <400> 40
 ctctgtctt ggcaaagcaa ctc 23

 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador BMP2 HBP FP

 <400> 41
 accttatgg agggaaacct a 21

 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador BMP2 HBP RP

 <400> 42
 ccggatctgg ttcaagcatg a 21

 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador hTert HBP FP

 <400> 43
 aaccttctc agctatgccc 20

 <210> 44
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador hTert HBP RP

 <400> 44
 gcgtgaaacc tgtacgct 19

 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador Islet-1 HPB F

<400> 45
gtggagaggg ccagtctagg 20

<210> 46
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Islet-1 HPB R

<400> 46
ccgtcatctc taccagttgc t 21

<210> 47
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Troponin T HPB F

<400> 47
gagttgcagg cgctgattg 19

<210> 48
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Troponin T HPB R

<400> 48
tctggatgta acccccacaaa tg 22

<210> 49
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Dhand HPB F |

<400> 49
atgagtctgg tagtggttt tcc 23

<210> 50
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Dhand HPB R

<400> 50
cactactcggg gctgtaggac a 21

<210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> T HPB F primer

 <400> 51
 gatcacgcag ctcaagattg c 21

 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador T HPB R

 <400> 52
 tctctggtgt gttcctagac g 21

 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador T5 HPB F

 <400> 53
 cacttctccg ctcaactcac c 21

 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador T5 HPB R

 <400> 54
 tggcacgccca tgagagtaga 20

 <210> 55
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador · ETS-2 HPB F

 <400> 55
 aaagctacct tcagtgctt c 21

 <210> 56
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador ETS-2 HPB R

<400> 56

aatgtcacc c acaaagtcag g 21

<210> 57

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador Dkk-1 FP

<400> 57

attccaacgc tatcaagaac c 21

<210> 58

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador Dkk-1 RP

<400> 58

ccaagtgct atgatcatta cc 22

<210> 59

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador TBX 20 FP

<400> 59

tccagattct cctttaccg 20

<210> 60

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador TBX 20 RP

<400> 60

ttcagacttc aggttgagca 20

<210> 61

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador SM actin HBP F

<400> 61
 cggtgctgctc tctctatgcc 20

<210> 62
 <211> 21
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador SM actin HBP R

<400> 62
 cacgctcagt caggatcttc a 21

<210> 63
 <211> 21
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador hGATA1 F

<400> 63
 agaagcgctt gattgtcagt a 21

<210> 64
 <211> 21
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador hGATA1 R

<400> 64
 agagacttgg gttgtccaga a 21

<210> 65
 <211> 19
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador hGTAT2 F

<400> 65
 ggcccactct ctgtgtacc 19

<210> 66
 <211> 21
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador hGATA2 R

<400> 66

catcttcattg ctctcogtca g 21

<210> 67
 <211> 19
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX3-1 F

<400> 67
 gtgtctcggg cctggattc 19

<210> 68
 <211> 21
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX3-1 R |

<400> 68
 acgtgtaggg gtaaggaac a 21

<210> 69
 <211> 23
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX3-2 F

<400> 69
 ttaaagttag atgttctggg ctg 23

<210> 70
 <211> 22
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX3-2 R

<400> 70
 actataattc ccctgccacg ta 22

<210> 71
 <211> 22
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX4 F

<400> 71
 tgaccatgc tacaagttct gt 22

<210> 72

<211> 22
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador · TBX4 R

 <400> 72
 ggtggtgtt tgcagcttc ag 22

 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador TBX6 F

 <400> 73
 acaccctaa actggattgc t 21

 <210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador TBX6 R

 <400> 74
 cctcccagct ttggtgatga t 21

 <210> 75
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador, TBX10 F

 <400> 75
 cctoggcata cttgcaccc 19

 <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador TBX10 R

 <400> 76
 attcctccca cagaggcttc a 21

 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> .Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX18 F

<400> 77
 gccctgctg actattctgc 20

<210> 78
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX18 R

<400> 78
 ctgcatggat aagctgtct g 21

<210> 79
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX19 F

<400> 79
 aagaatggca gacggatgt t 21

<210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador TBX19 R

<400> 80
 cgggtgaat gtagacgag 20

<210> 81
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador RUNX2 F

<400> 81
 cggcaaatg agcgacgtg 19

<210> 82
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> ,Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador RunX2 R

<400> 82
 caccgagcac aggaagtg 19

 <210> 83
 <211> 20
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador · LMO2 F

 <400> 83
 ggccatcgaa aggaagagcc 20

 <210> 84
 <211> 21
 <212> · |ADN
 <213> · ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador LMO2 R

 <400> 84
 ggcccagttt gtagtagagg c 21

 <210> 85
 <211> 21
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador TAU F

 <400> 85
 cccctggagt tcacgttca c 21

 <210> 86
 <211> 20
 <212> |ADN
 <213> ,Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador TAU R

 <400> 86
 gcgagctttg agttgagga 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una célula progenitora cardiaca inducida, comprendiendo el procedimiento la suministro de un factor de reprogramación que comprende dos genes heterólogos a una célula somática,

5 **caracterizado porque** los genes heterólogos son ETS2 y Mesp1.

2. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la célula somática es una célula normal de fibroblastos dérmicos humanos.

10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el gen ETS2 comprende la secuencia de codificación de ETS2 (SEC ID NO: 9), el gen ETS2 (SEC ID NO: 7) o codifica la secuencia de proteínas ETS2 humanas (SEC ID NO: 8)

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el gen Mesp1 comprende la secuencia de codificación Mesp1 de ratón (SEC ID NO: 6), el gen Mesp1 de ratón (SEC ID NO: 4) o codifica la secuencia de proteínas Mesp1 de ratón (SEC ID NO: 5)

15 5. El procedimiento según lo reivindicado en cualquier reivindicación precedente en el que el factor de programación es suministrado a la célula utilizando un vector recombinante.

6. Un procedimiento según lo reivindicado en la reivindicación 5, en el que el factor de programación es suministrado a la célula utilizando el sistema de transducción lentiviral.

20

25

30

35

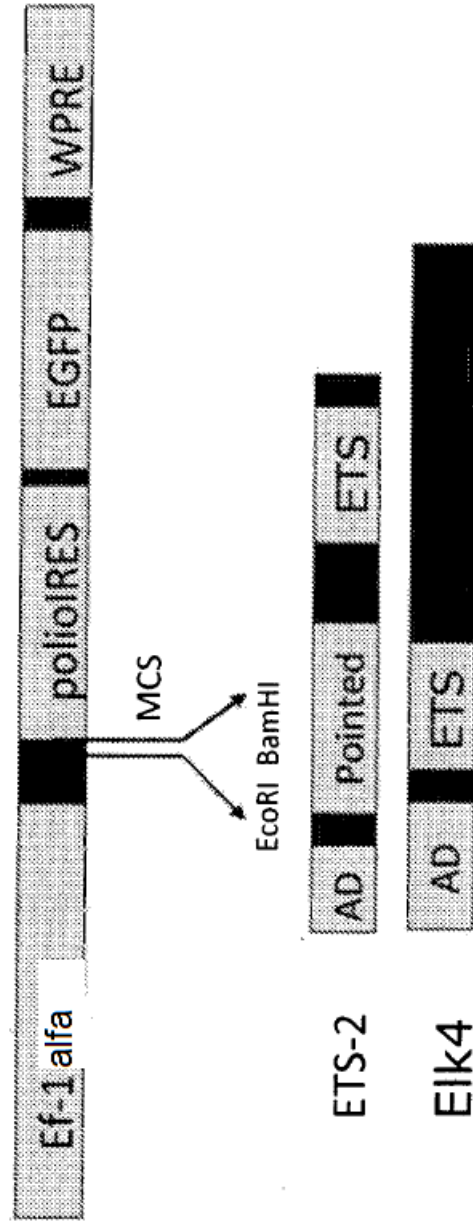


FIG. 1

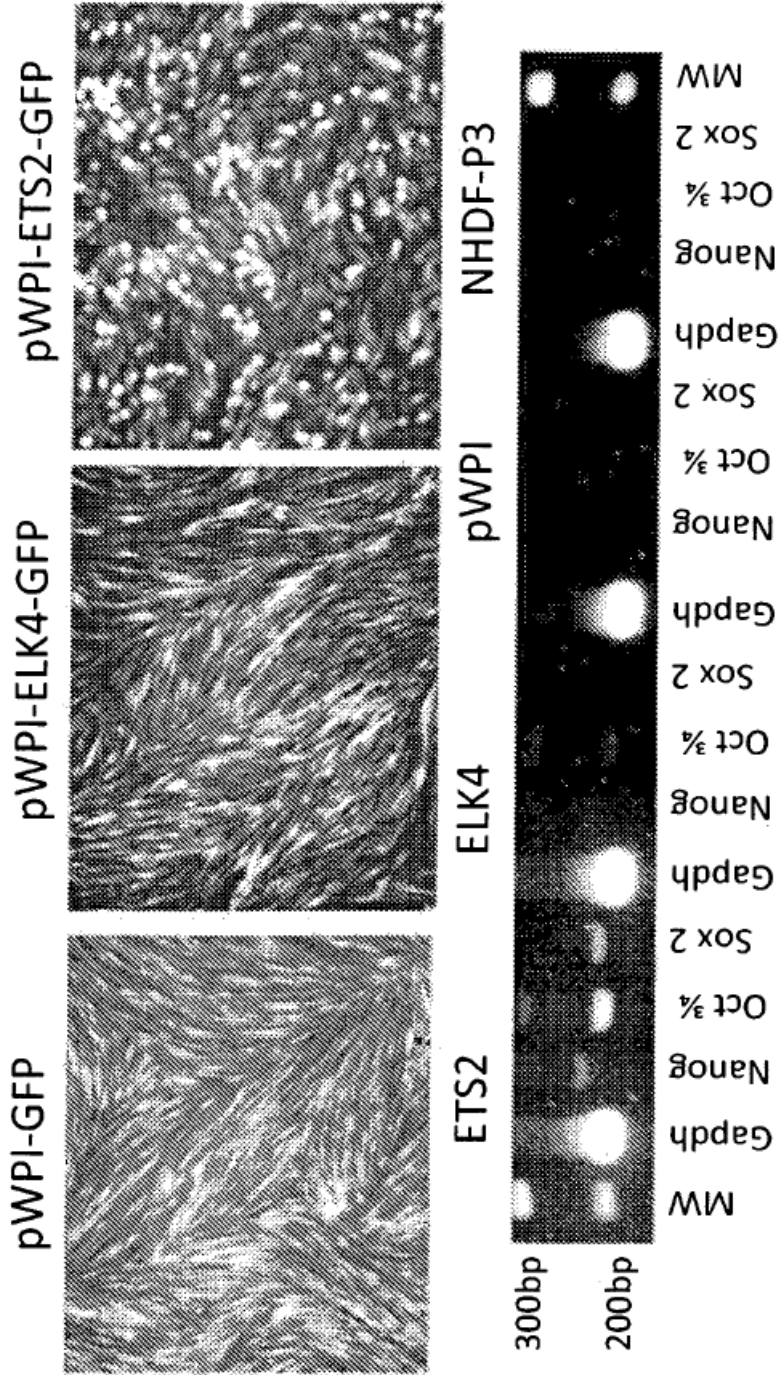


FIG. 2

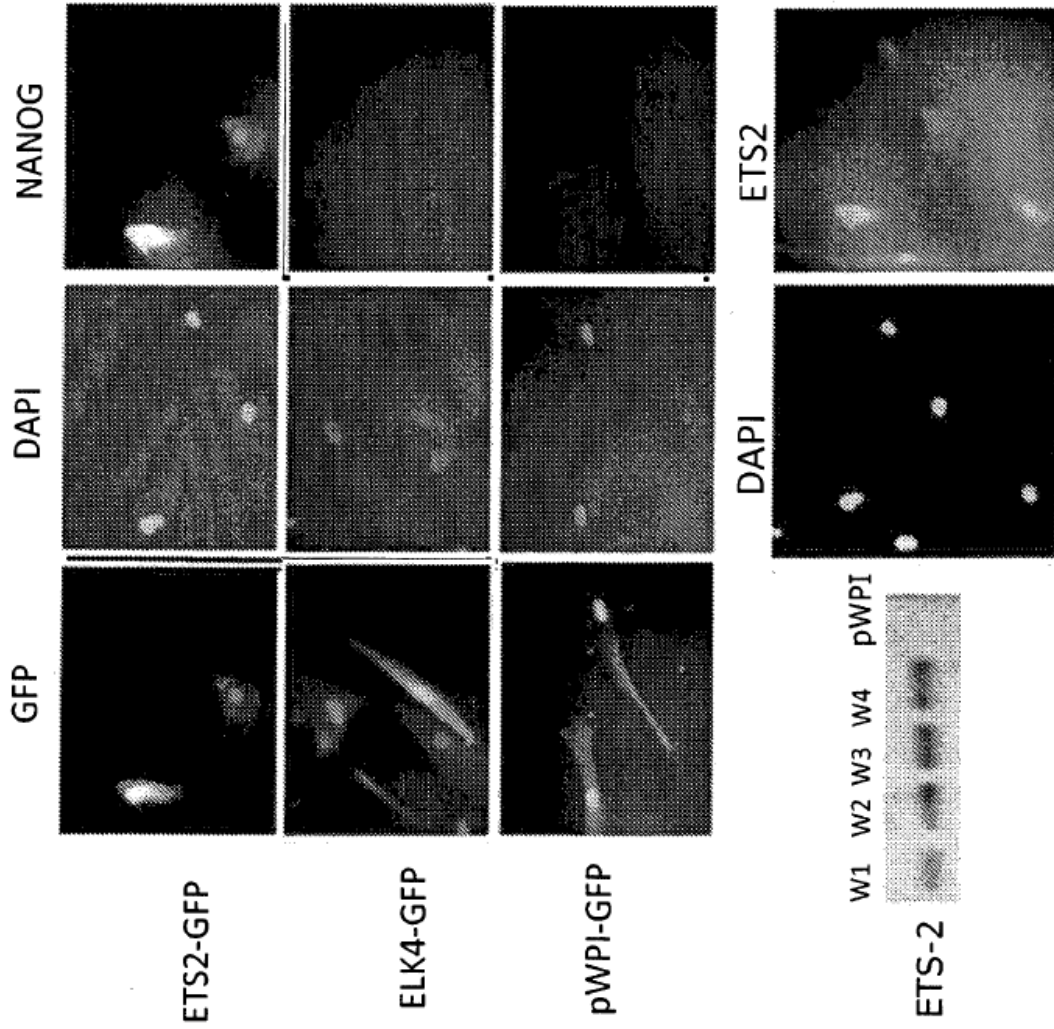


FIG. 3

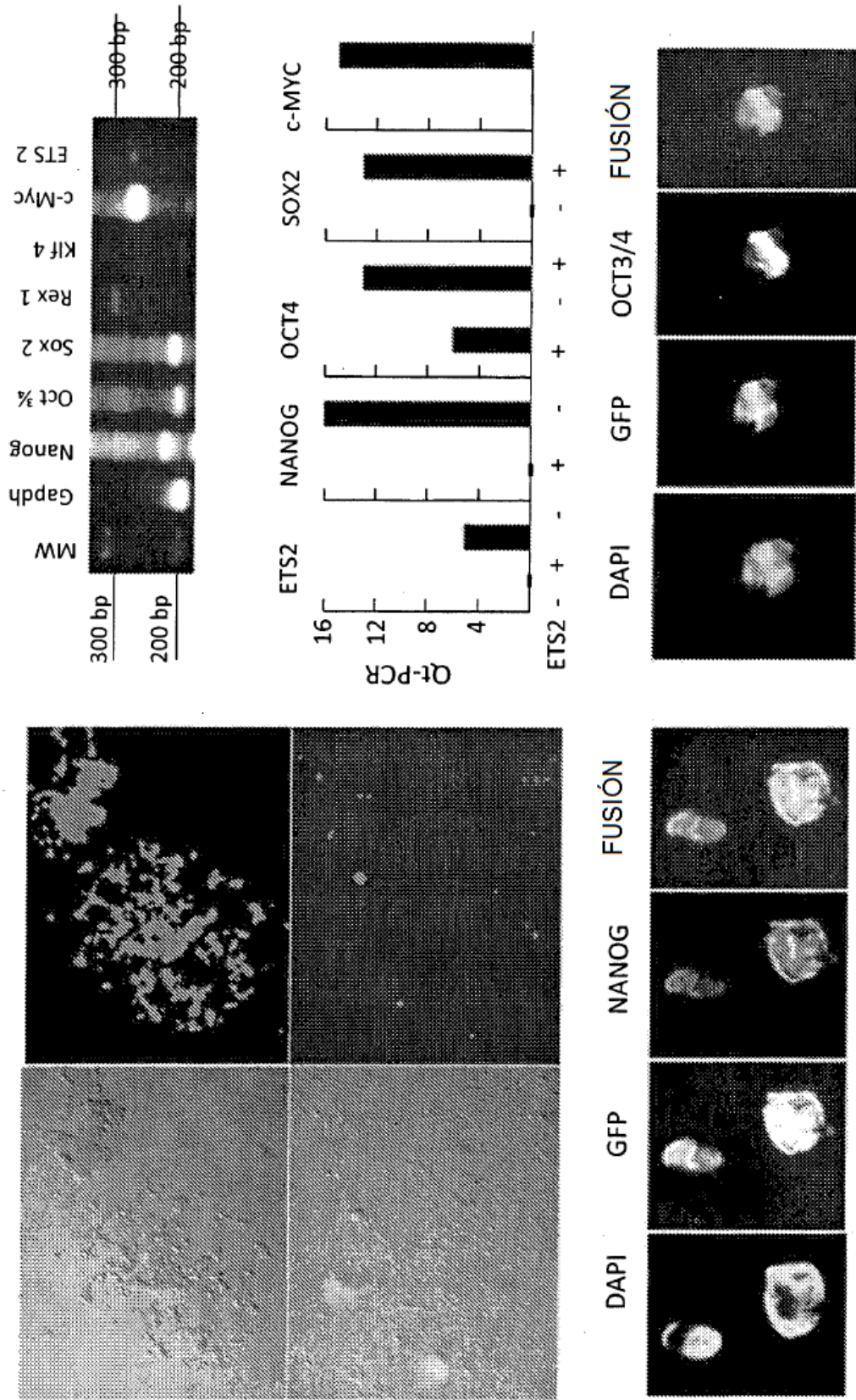


FIG. 4

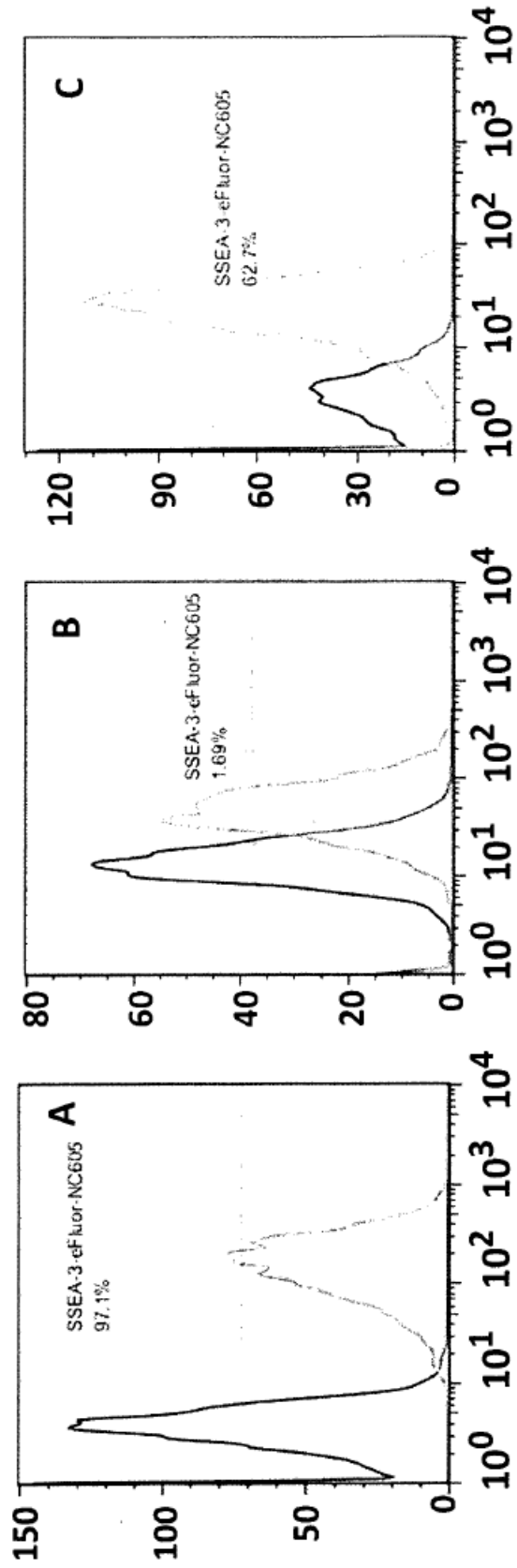


FIG. 5

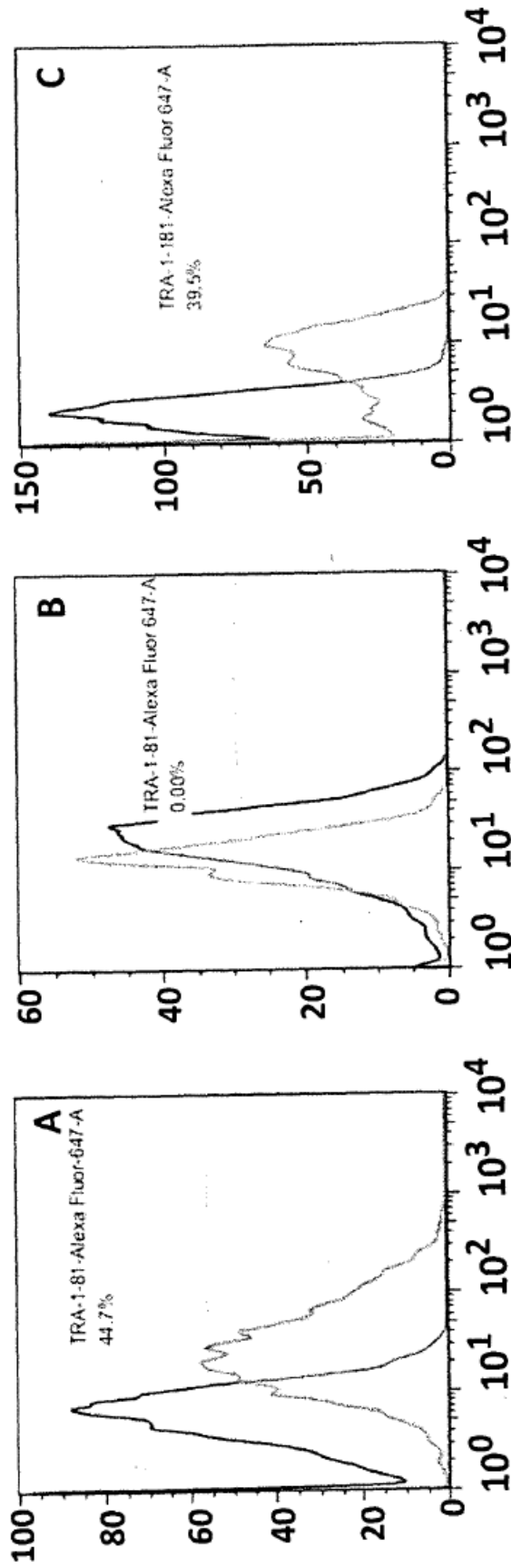


FIG. 6

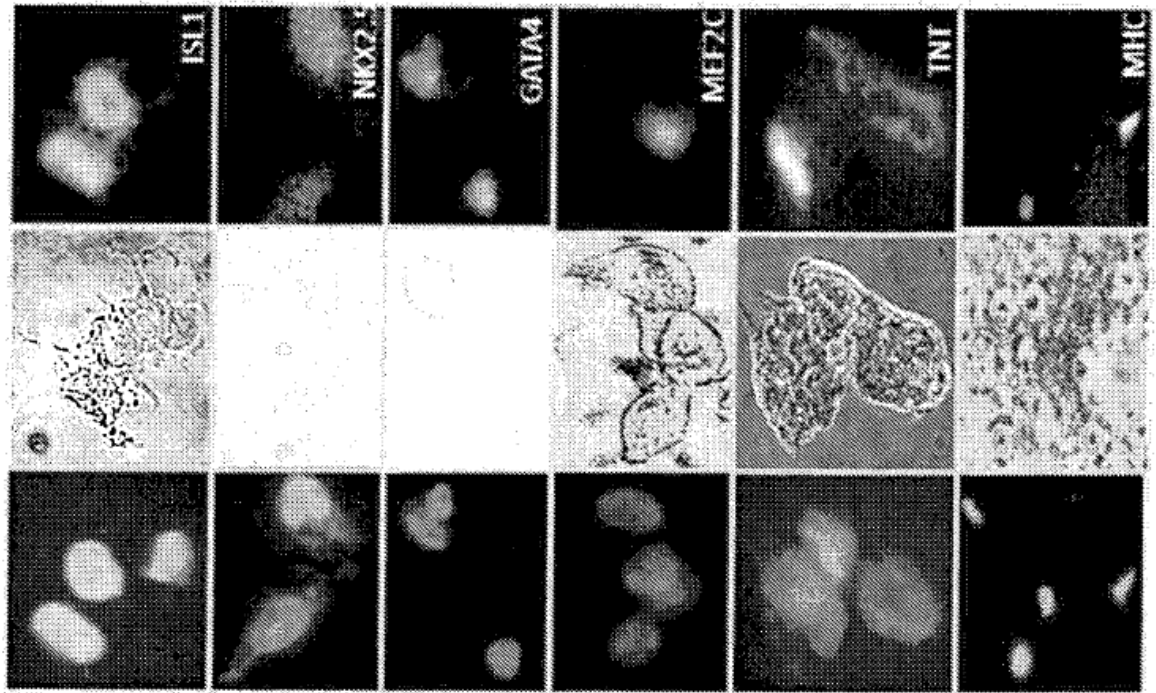


FIG. 7

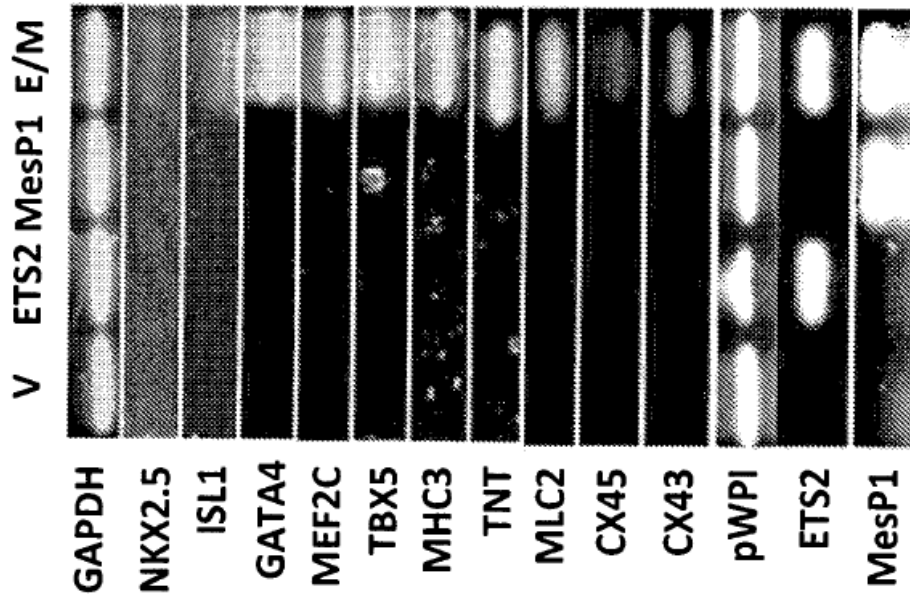


FIG. 8

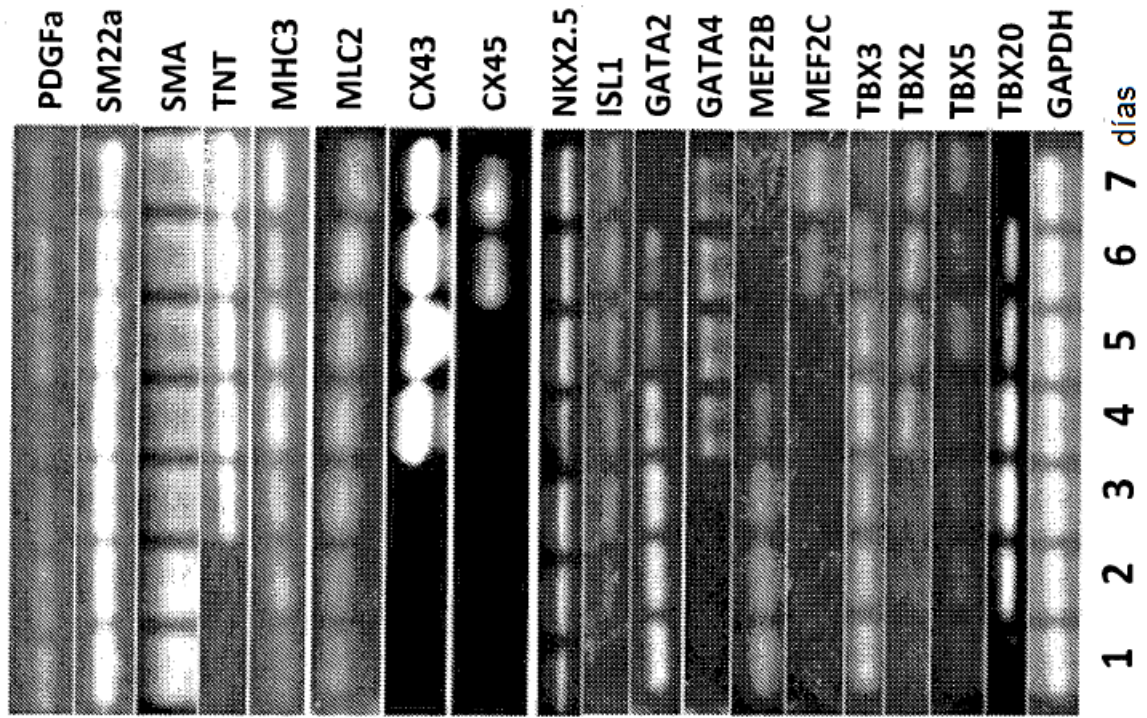
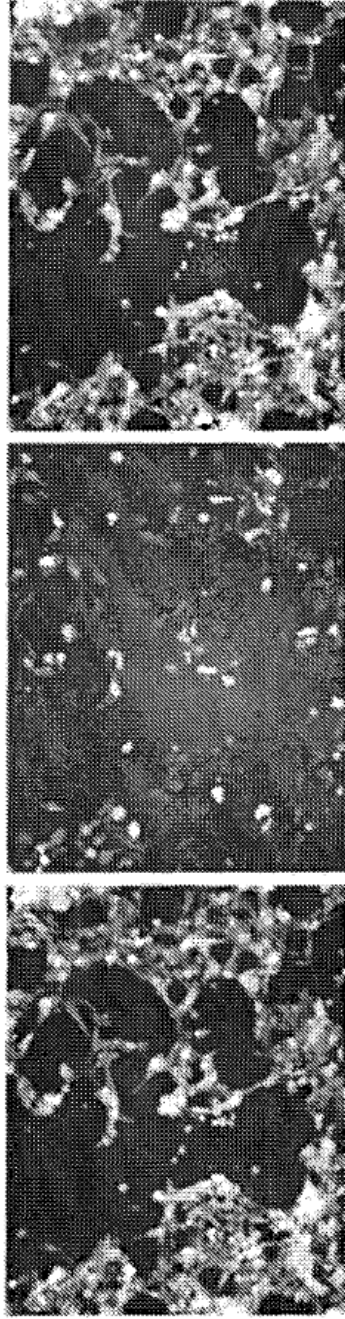


FIG. 9

ETS2 y Mesp1 indujeron la expresión génica del programa de progenitores cardíacos de novo: tinción de fluorescencia Rojo-Tomate a partir de la construcción indicadora NKX2.5 Rojo-Tomate



GFP

NKX2.5 Rojo-Tomate

Fusión

NKX2.5 Rojo-Tomate se clonó en pWPI

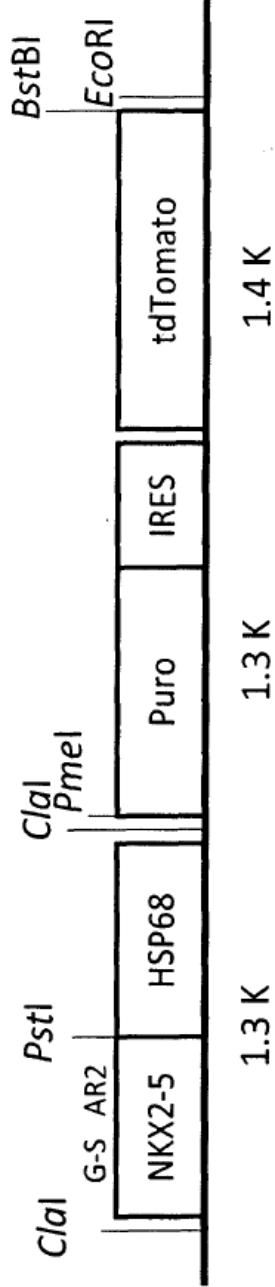


FIG. 10

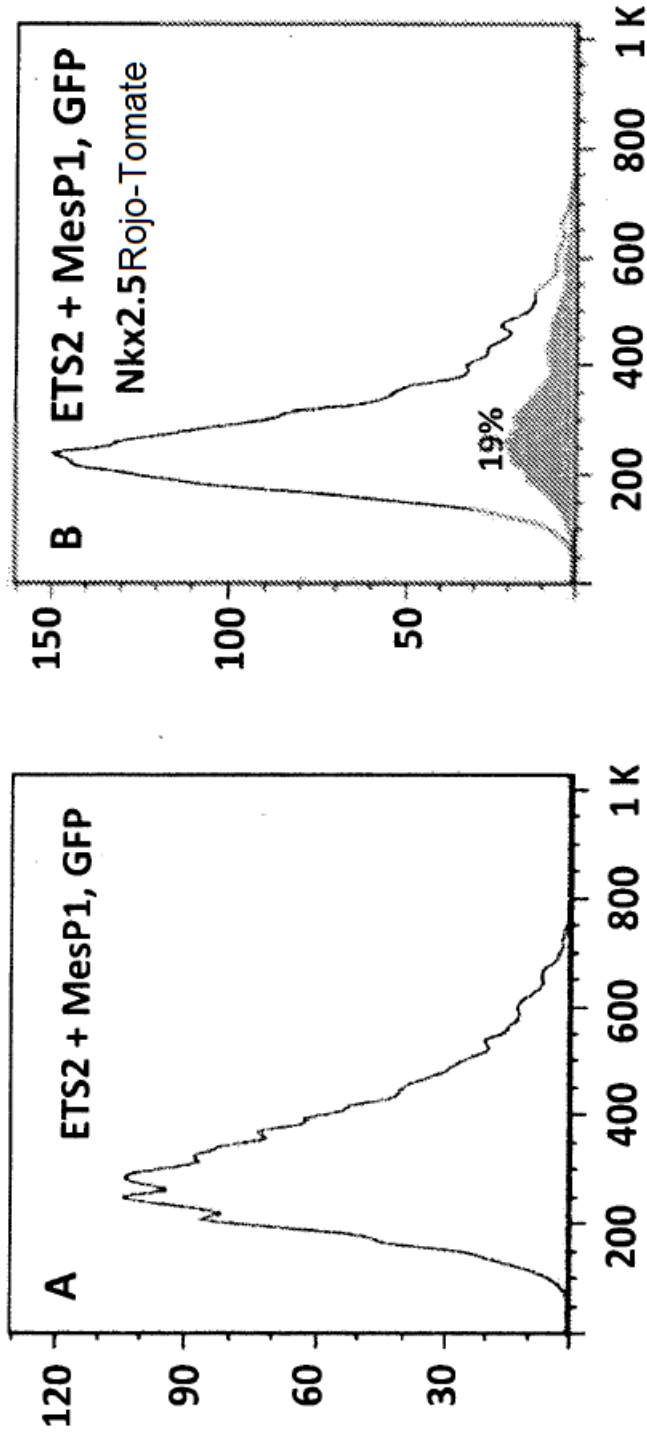


FIG. 11

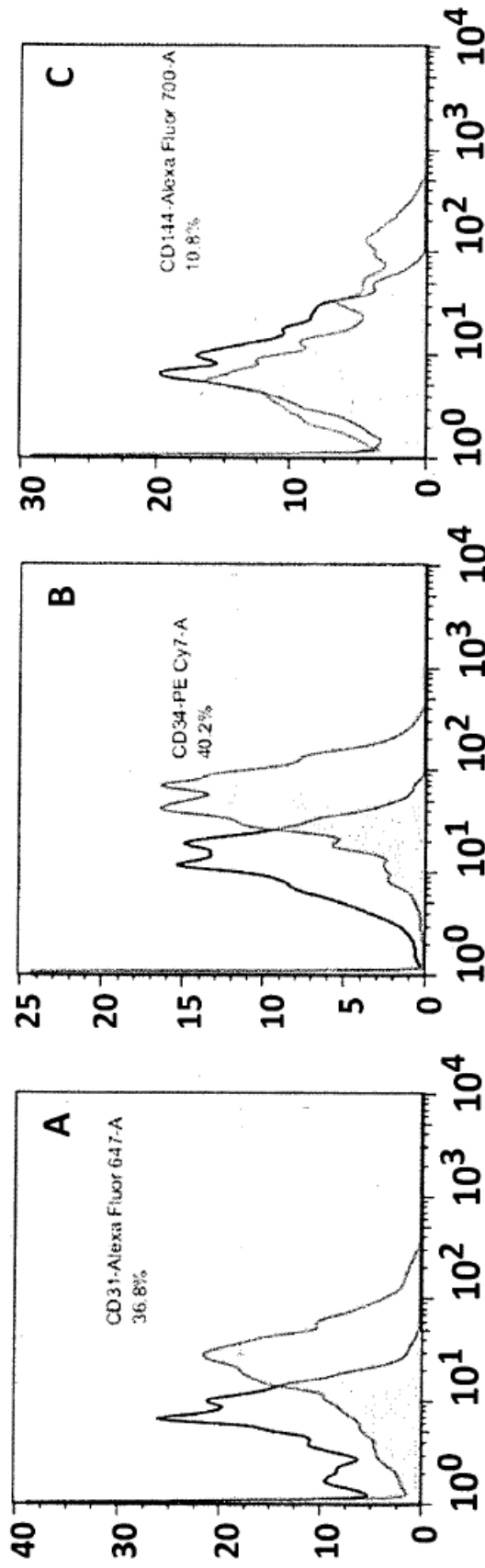


FIG. 12

Agregados ETS-2/Mesp1
9 días posterior a la selección de puromicina

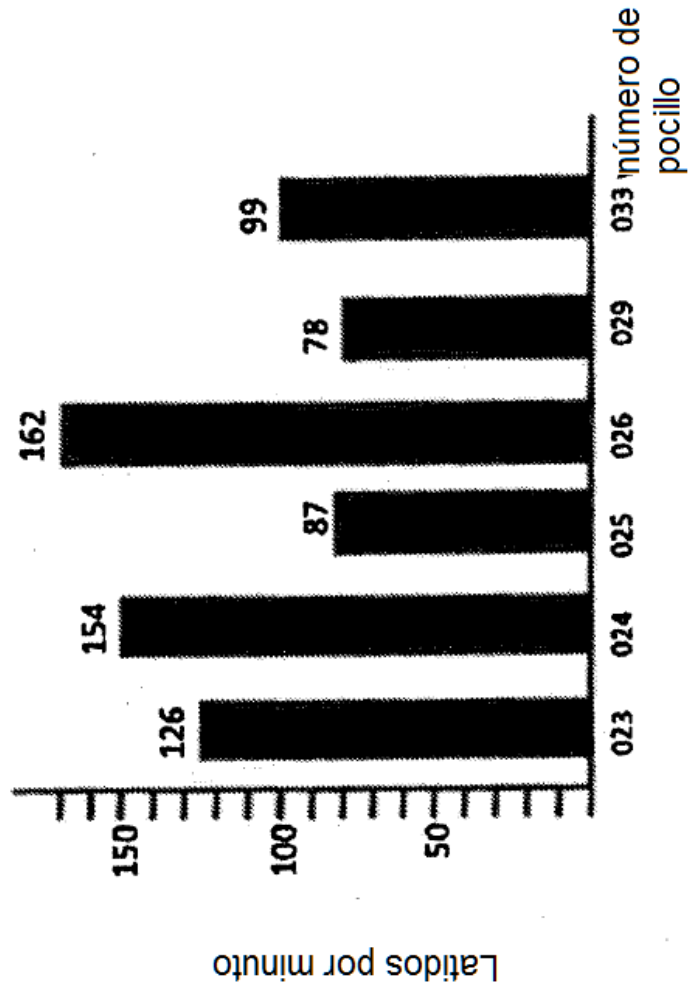


FIG. 13